



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.**  
**CARRERA QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.**  
**ORIENTACIÓN BIOQUÍMICA CLÍNICA.**

**ALUMNO:**  
**CARLOS ENRIQUE GUILLÉN BARRIOS.**

**NÚMERO DE CUENTA:**  
**099138909.**

**AÑO DE TÉRMINO DE LA CARRERA:**  
**2008.**

**TÍTULO:**  
**REVISIÓN DE LA PREVALENCIA DE HEMOGLOBINOPATÍAS EN MÉXICO Y SU ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.**

**ÁREA ESPECÍFICA:**  
**CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN EN QUÍMICA CLÍNICA.**

**ASESOR:**  
**DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD**

**OPCIÓN DE TITULACIÓN:**  
**PAQUETE DE EDUCACIÓN CONTINUA.**

**DIPLOMADO:**  
**CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

1. ABREVIACIONES	2
2. RESUMEN	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1 Hemoglobina	5
<i>La sangre.</i>	
<i>Descripción del Eritrocito.</i>	
<i>Estructura de la Hemoglobina</i>	
<i>Funciones de la hemoglobina.</i>	
4.2 Hemoglobinopatías	14
<i>Alteraciones en la hemoglobina.</i>	
<i>Hemoglobinopatías estructurales.</i>	
<i>Hemoglobinopatías talasémicas</i>	
4.3 Métodos para el estudio de hemoglobinopatías.	20
<i>Diagnostico de las hemoglobinopatías</i>	
<i>Evaluación Hematológica</i>	
<i>Técnicas de Análisis Protéico.</i>	
<i>Análisis de Ácidos Nucléicos</i>	
<i>Bases de Datos de Hemoglobinopatías</i>	
4.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución	28
<i>Cromatografía.</i>	
<i>Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.</i>	
<i>Tipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución</i>	
<i>Aplicaciones de la CLAR en muestras biológicas.</i>	
5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	35
6. OBJETIVOS	35
7. METODOLOGÍA	35
8. RESULTADOS	36
8.1 Presencia de hemoglobinopatías en México.	36
<i>Prevalencia mundial de las variantes de hemoglobina.</i>	
<i>Presencia de Hemoglobinopatías en México</i>	
8.2 Análisis de hemoglobinopatías por CLAR	40
<i>Papel de la CLAR en el análisis de Hemoglobinopatías.</i>	
<i>Análisis por CLAR</i>	
9. DISCUSIÓN	45
10. CONCLUSIÓN	48
11. REFERENCIAS	50

## 1. ABREVIACIONES

ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
CHC	Citometría hemática completa
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CLAR Af	Cromatografía de líquidos de alta resolución de afinidad
CLAR IC	Cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio catiónico
CLAR II	Cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio iónico
CLAR E	Cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión
CLAR FR	Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa
CMCH	Concentración media corpuscular de hemoglobina
DPG	Difosfoglicerato
EIE	Enfoque isoeléctrico
EIEC	Enfoque isoeléctrico capilar
EM	Espectroscopía de masas
FE	Fase estacionaria
FM	Fase móvil
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular media
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RDW	Índice de variación en el tamaño de los eritrocitos
VCM	Volumen corpuscular medio

## **2. RESUMEN**

Las hemoglobinopatías pertenecen a un grupo de desórdenes hereditarios caracterizados por la síntesis anormal o reducida de una o más cadenas de globina. La prevalencia de las hemoglobinopatías es elevada en determinadas razas, teniendo una distribución geográfica mundial, y una frecuencia significativa en determinadas zonas de México. Sin embargo, el estudio de las hemoglobinopatías en la República sigue basándose en la evaluación hematológica, para pasar a técnicas de electroforesis.

El objetivo de esta revisión fue describir a la CLAR aplicada al análisis de hemoglobinopatías, tomando en cuenta la frecuencia de la patología en el territorio Mexicano; y mencionar sus características frente a otras técnicas, mostrando las ventajas y desventajas de utilizarla. Encontramos que en México se han reportado, al menos 19 hemoglobinopatías diferentes con frecuencias de hasta el 15%, y en conclusión, la CLAR supone ser la mejor técnica para el monitoreo presuntivo y la caracterización final de hemoglobinopatías en territorio nacional por costos, efectividad y tiempos de análisis. La CLAR presenta un menor tiempo de análisis que el EIEC y tiene mayor resolución; es capaz de encontrar variantes que son silenciosas por electroforesis; y además resulta de utilidad en el mapeo de péptidos y el análisis molecular de las cadenas de globina.

### 3. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de las hemoglobinopatías es especialmente elevada en determinadas razas y su distribución geográfica es mundial. En ciertas zonas de la República Mexicana se han descubierto sitios con alta prevalencia de portadores de hemoglobina S y de  $\beta$ -talasemias; también se han descubierto dos nuevas variantes de la molécula, las hemoglobinas Hb México y Hb Chiapas. Sin embargo, el estudio de las hemoglobinopatías en México sigue estando basado en la evaluación hematológica, para pasar a técnicas de electroforesis. Es por esta razón que se realizó una revisión que pueda ser de utilidad para los laboratorios clínicos nacionales especializados, orientándolos en la obtención de diagnósticos más certeros para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen este grupo de patologías.

Si bien, los métodos basados en técnicas electroforéticas tienen la capacidad de identificar muchas variantes de hemoglobina en tiempos cortos, la CLAR IC y la CLAR FR son capaces de identificar variantes electroforéticamente silenciosas, utilizando menos equipos en un tiempo de preparación de la muestra más corto.

En la actualidad, la CLAR IC se ha convertido en el método de elección para la cuantificación de Hb A<sub>2</sub>, Hb F y otros subtipos resultando ser un método sensible, específico y reproducible, llegando a ser una alternativa útil para el estudio y cuantificación de hemoglobinas de significancia clínica. Además de esto, se han desarrollado equipos automatizados basados en CLAR IC por parte de diferentes firmas con el fin de identificar variantes de Hb y cuantificar algunas de ellas, de estos equipos cabe destacar el Sistema de Prueba de Variantes de Hemoglobina de Laboratorios BioRad.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Hemoglobina

#### *La sangre.*

La sangre está compuesta de líquido, plasma y elementos celulares que incluyen a los leucocitos, plaquetas y eritrocitos. Un adulto normalmente tiene alrededor de 6 litros de este líquido vital, esto es, entre el 7 y el 8% del peso corporal total. El plasma representa más o menos el 54% del volumen sanguíneo, mientras que los eritrocitos forman el 45% y los leucocitos el 1%.<sup>1</sup>

El componente principal del plasma es el agua, en la que están disueltos iones, proteínas, carbohidratos, lípidos, hormonas, vitaminas y enzimas. Los iones principales necesarios para la función celular son calcio, sodio, potasio, cloruro, magnesio e hidrógeno. El constituyente proteínico mayoritario del plasma es la albúmina, cuya función más importante es conservar la presión osmótica, pero también actúa como molécula transportadora, acarreado compuestos como la bilirrubina, el hem y otros nutrientes y metabolitos celulares, mientras que otras proteínas plasmáticas transportan vitaminas, minerales y lípidos. Las inmunoglobulinas y el complemento son proteínas sanguíneas especializadas que intervienen en la defensa inmunitaria. Las proteínas de la coagulación, encargadas de la hemostasis normal, circulan por la sangre como proteínas inactivas hasta que son requeridas para el proceso de coagulación. La perturbación del equilibrio de estos constituyentes plasmáticos puede indicar enfermedad en otros tejidos corporales.<sup>1</sup>

Los tres constituyentes celulares de la sangre son eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Los eritrocitos contienen la proteína hemoglobina, encargada del transporte de oxígeno y bióxido de carbono. Los leucocitos se encargan de la defensa inmunológica. Las plaquetas son necesarias para la coagulación. Las células sanguíneas viajan a través de los vasos y son distribuidas a todos los tejidos corporales. Los eritrocitos y plaquetas actúan sin abandonar la circulación; pero los leucocitos son capaces de atravesar las paredes vasculares por medio de un proceso denominado diapédesis, para llegar a los tejidos, en donde desarrollan su actividad de defensa contra antígenos extraños e invasores.<sup>1</sup>

Las variaciones de los elementos sanguíneos son con frecuencia signo de enfermedad y pueden descubrirse por análisis de laboratorio de hematología, ya que la hematología es, en principio, el estudio de los elementos celulares de la sangre.<sup>1</sup>

Los valores sanguíneos para varios grupos de edad se muestran en la siguiente página.<sup>1</sup>

	<b>Nacimiento</b>	<b>1 año</b>	<b>4 años</b>	<b>6 años</b>	<b>12 años</b>	<b>Varón</b>	<b>Mujer</b>
<b>Hemoglobina (g/100mL)</b>	19.0	11.6	12.6	12.7	13.0	13.3-17.7	11.7-15.7
<b>Hematocrito ( mL/mL )</b>	0.61	0.35	0.37	0.38	0.39	0.40-0.52	0.35-0.47
<b>Eritrocitos ( 10<sup>12</sup>/L )</b>	5.14	4.60	4.70	4.70	4.80	4.4-5.9	3.8-5.2
<b>Reticulocitos %</b>	3.2	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<b>VCM ( fL )</b>	119	77	80	80	80	80-100	80-100
<b>HCM ( pg )</b>	37	25	27	27	27	27-34	27-34
<b>CMCH ( g/100mL )</b>	32	33	34	33	33	31-36	31-36
<b>Plaquetas ( 10<sup>9</sup>/L )</b>	150-350	---	---	---	---	150-440	150-440
<b>Leucocitos ( 10<sup>9</sup>/L )</b>	9-30	12.0	8.0	8.5	---	3.9-10.6	3.5-11.0
<b>Neutrófilos ( 10<sup>9</sup>/L )</b>	40-80	30	40	54-62	---	54-62	55-62
<b>Neutrófilos %</b>	6-26	1.5-8.5	1.5-8.5	1.5-8.0	---	2.0-7.0	2.0-7.0
<b>Eosinófilos ( 10<sup>9</sup>/L )</b>	2-3	2-3	2-3	2-3	---	1-3	1-3
<b>Eosinófilos %</b>	0.02-0.85	0.05-0.07	0.02-0.65	0-0.65	---	0-0.45	0-0.45
<b>Basófilos ( 10<sup>9</sup>/L )</b>	0-1	0-1	0-1	0-1	---	0-1	0-1
<b>Basófilos %</b>	0-0.64	0-0.2	0-0.2	0-0.2	---	0-0.2	0-0.2
<b>Linfocitos ( 10<sup>9</sup>/L )</b>	30	61	50	38	---	20-40	20-40
<b>Linfocitos %</b>	2.0-11.0	4.0-10.5	2.0-8.0	1.5-6.5	---	1.5-4.0	1.5-4.0
<b>Monocitos ( 10<sup>9</sup>/L )</b>	6	5	5	4-5	---	4-10	4-10
<b>Monocitos %</b>	0.4-1.8	0.05-1.1	0-0.8	0-0.8	---	0.2-0.8	0.2-0.8

Tabla 1. Valores sanguíneos normales.



Los valores normales de los elementos celulares de la sangre pueden tener cambios fisiológicos según la edad sexo y ubicación geográfica, en tanto que los cambios patológicos en un valor específico pueden deberse a enfermedades o traumatismos. Las oscilaciones normales de los valores hematológicos deben ser determinadas por cada laboratorio, para que las diferencias fisiológicas de grupos de individuos dentro de un área geográfica específica tengan validez. Los valores normales se obtienen calculando la media para un grupo de individuos sanos y dando la oscilación normal como la media  $\pm 2$  desviaciones estándar. Estos límites representan los valores normales para el 95% de los individuos sanos. Un valor próximo a lo normal sea mayor o sea menor, no necesariamente indica anormalidad; hay valores en donde lo considerado normal y lo considerado anormal se sobreponen. La probabilidad estadística indica que 5% de los individuos normales estarán fuera de los límites de  $\pm 2$  desviaciones estándar, mientras más lejos de los límites normales esté un valor, mayor será la probabilidad de que sea anormal. <sup>1</sup>

### *Descripción del Eritrocito.*

Una de las funciones primordiales de la sangre es la oxigenación de los tejidos, para ello dispone de la hemoglobina que, transportada en los eritrocitos, lleva el oxígeno de los pulmones al resto de los tejidos y retira el bióxido de carbono llevándolo de regreso a los pulmones. La hemoglobina es la proteína líquida altamente especializada que se ocupa en forma directa de este transporte gaseoso, cada gramo de hemoglobina puede transportar 1.34 mL de oxígeno. El eritrocito tiene, por lo tanto, la misión fundamental de proteger y transportar la hemoglobina para que esta pueda realizar su función respiratoria. Cada  $\mu\text{L}$  de sangre contiene aproximadamente 5 millones de eritrocitos, los cuales son capaces de atravesar los territorios capilares mediante su elevada deformabilidad, garantizando la llegada del oxígeno a todo el organismo. <sup>1,2</sup>

Los eritrocitos se forman en la médula ósea a partir de una única célula madre pluripotencial o progenitora, mediante un proceso de maduración específico denominado eritropoyesis en el que interviene la eritropoyetina, una hormona diferenciadora. Después de abandonar la médula ósea, el eritrocito sobrevive en la circulación alrededor de 120 días, tiempo en que recorre cerca de 600 km de territorio vascular y en que debe de atravesar un elevado número de veces el filtro esplénico, constituido por espacios intercelulares de diámetro diez veces inferior al suyo. Esto es posible solamente porque su estructura y configuración le confieren una deformabilidad, la cual va perdiendo a medida que envejece hasta ser eliminado de la circulación por los macrófagos del bazo y la médula ósea. <sup>2</sup>

El eritrocito (FIGURA 1) es un disco bicóncavo sin núcleo, mitocondrias ni ARN, que mide entre 7.0 y 7.5  $\mu\text{m}$  de diámetro; es incapaz de sintetizar proteínas o lípidos nuevos y su única fuente energética es la glucólisis anaerobia que, aunque exigua, es suficiente para que el eritrocito desarrolle funciones que permiten su supervivencia en la circulación. Fue

uno de los primeros elementos microscópicos reconocidos y descritos después del descubrimiento del microscopio y al que por siglos se le consideró una partícula inerte sin funciones fisiológicas. La capacidad de la hemoglobina contenida en los eritrocitos para transportar oxígeno fue descubierta hasta 1865 por Hoppe y Seyler.<sup>1,2</sup>

El componente mayoritario del eritrocito es la hemoglobina, que ocupa alrededor de 33% de su volumen, y constituye el 90% del peso seco de la célula. Cada eritrocito contiene de 27 a 32 pg de hemoglobina. Tanto la membrana del eritrocito como las vías metabólicas se encargan de la protección y conservación del estado funcional de la molécula de hemoglobina, por lo que alteraciones en estos elementos pueden originar cambios en su estructura, función o ambas, afectando la capacidad de la hemoglobina para transportar el oxígeno.<sup>1</sup>

La concentración de hemoglobina en el cuerpo es resultado de un equilibrio entre la producción y la destrucción de eritrocitos. La concentración normal en un hombre adulto es de alrededor de 15 g / 100 mL, con un volumen sanguíneo de 5,000mL, por lo cual la masa corporal total de hemoglobina es de 750 g más o menos. Dado que la vida de un eritrocito es de 120 días, aproximadamente 6.25 g de hemoglobina nueva deben sintetizarse por día para mantener constante su concentración.<sup>1</sup>

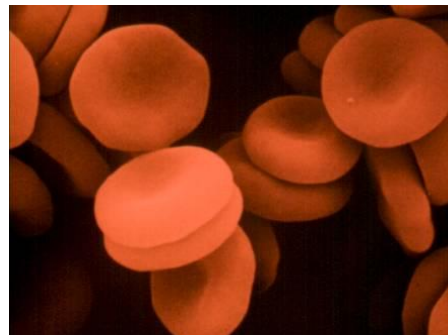


FIGURA 1  
El eritrocito es un disco bicóncavo sin núcleo, mitocondrias ni ARN, que mide entre 7.0 y 7.5 $\mu$ m de diámetro.<sup>1,3</sup>

### *Estructura de la Hemoglobina*

La Hemoglobina (FIGURA 2) es una proteína de 68 kDa, conformada por 4 subunidades, cada una de las cuales contiene un grupo hem anidado en una grieta hidrófoba de una cadena proteínica denominada globina. El hem es un anillo de hierro tetrapirrólico con un ión de hierro ferroso que se encuentra próximo al exterior del anillo (FIGURA 3). El hierro se une de manera covalente al hem de la histidina F8 de la cadena globínica anexa.<sup>1,2</sup>

La síntesis de las cadenas peptídicas de globina se realiza en polirribosomas libres del citoplasma. El tipo de cadena sintetizada está bajo control genético, la mayor parte de las células produce cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  para la formación de Hb A1, la Hb principal del adulto. Las cadenas  $\alpha$  libres se unen con las cadenas  $\beta$  cuando todavía están en el polirribosoma. Luego

las subunidades  $\alpha, \beta$  son liberadas al citoplasma, donde se unen de dos en dos para formar las tétradas de globina. El hem es insertado en la bolsa hidrófoba próxima a la superficie de cada cadena de globina.<sup>1</sup>

Existen seis tipos de globinas, denominadas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) y zeta ( $\zeta$ ); una molécula normal de Hb posee dos pares de globinas. La cadena  $\alpha$  contiene 141 amino ácidos, dispuestos en una secuencia lineal y unidos por enlaces peptídicos covalentes y la cadena  $\beta$  es mas larga y está compuesta por 146 residuos amino acídicos. Existe una gran homología estructural entre las cadenas  $\beta$ ,  $^G\gamma$ ,  $^A\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , por tanto la cadena  $\zeta$  contiene 141 amino ácidos a diferencia de las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  que contienen 146 amino ácidos. Las cadenas  $\delta$  difieren de las beta en 10 posiciones, las  $^G\gamma$  en 39 y las  $^A\gamma$  en 40 posiciones, mientras las cadenas  $\epsilon$  presentan más de 36 residuos amino acídicos diferentes a las cadenas  $\beta$ . Las cadenas  $^A\gamma$  y  $^G\gamma$  solamente se diferencian por la presencia de una Alanina (ALA) y una Glicina (GLY) respectivamente en la posición 136. A pesar de la rigidez del enlace peptídico, cada cadena polipeptídica tiene una libertad de rotación considerable, que da lugar a una configuración estable, en alfa hélice, que determina su estructura secundaria. La  $\alpha$  hélice contiene 3.6 amino ácidos por giro, con un movimiento trasnacional de 1.5 Å por residuo en torno al eje helicoidal. En su estado nativo, cerca del 80% de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  presentan esta configuración, que se estabiliza mediante puentes de hidrógeno intramoleculares, los cuales son relativamente débiles y pueden romperse fácilmente por la acción del calor o de diversos agentes desnaturizantes.<sup>1,2</sup>

La cadena  $\alpha$  contiene 7 segmentos helicoidales (A, B, C, E, F, G y H) y la cadena  $\beta$ , 8 (incluye una hélice D); estos segmentos están conectados mediante otros segmentos no helicoidales (inter-helicoidales) que también se encuentran en los extremos amino terminal (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal), y que son designados con las letras de las hélices en contacto. La disposición espacial que genera el plegamiento de la cadena polipeptídica y de sus estructuras helicoidales constituye la estructura terciaria de la hemoglobina.<sup>2</sup>

Cada grupo hem está situado en una cavidad (cavidad del hem) que forma la cadena polipeptídica, la cual está constituida por aminoácidos hidrofóbicos, localizados en las hélices B, C, E, F, G y H y en los segmentos inter-helicoidales CD y FG. En la cadena  $\alpha$  hay 19 residuos que forman regiones de contacto con el grupo hem, mientras que en la cadena  $\beta$  hay 21. Los residuos polares ionizados como el ácido aspártico o el ácido glutámico, y los grupos básicos como la histidina, la lisina o la arginina, están situados en la superficie externa de la cadena plegada. La presencia de residuos de prolina (PRO), constituye un factor adicional que influye en la forma de plegamiento de la cadena. La cadena lateral de este amino ácido puede formar una estructura cíclica sobre sí misma, destruir la configuración en alfa-hélice y provocar un giro en la cadena polipeptídica.<sup>2</sup>

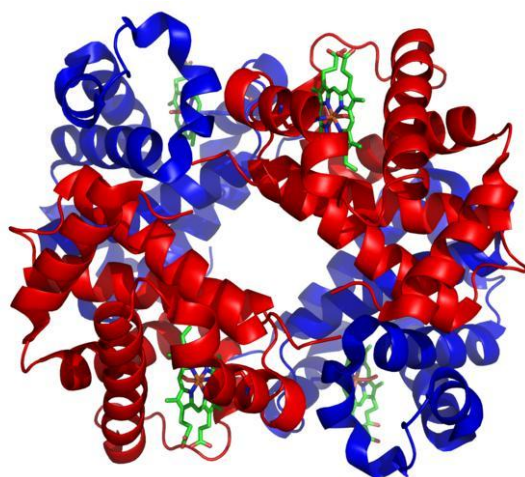


FIGURA 2.  
Imagen de la estructura  
cuaternaria de la molécula de  
hemoglobina.<sup>4</sup>

Las subunidades proteicas forman una estructura globular al unirse entre sí, conociéndose como estructura cuaternaria de la hemoglobina. En esta estructura se dispone de cavidades donde se alojan los grupos hem y, en su región central delimitan un espacio para que el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) pueda realizar su función reguladora del transporte de oxígeno. La estructura cuaternaria de la hemoglobina fue determinada por Perutz a finales de los años sesenta mediante el análisis cristalográfico por rayos X. Las cuatro cadenas que constituyen la hemoglobina están empaquetadas conjuntamente en posición tetraédrica, dando lugar a una estructura elipsoidal compacta, con unas dimensiones aproximadas de 64 x 55 x 50 Å. Entre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  pueden establecerse dos tipos de contacto:  $\alpha_1\text{-}\beta_1$  ó  $\alpha_2\text{-}\beta_2$  (más frecuente) y  $\alpha_1\text{-}\beta_2$  ó  $\alpha_2\text{-}\beta_1$ . Existen unos 40 contactos  $\alpha_1\text{-}\beta_1$ , incluyendo 9 puentes de hidrógeno, que son idénticos tanto en la hemoglobina oxigenada (oxihemoglobina) como en la no oxigenada (desoxihemoglobina). Los contactos del tipo  $\alpha_1\text{-}\beta_2$  son diferentes según el estado de oxigenación de la molécula; en la desoxihemoglobina (desoxi-Hb), existen unos 40 contactos incluyendo 19 puentes de hidrógeno, mientras que en la oxihemoglobina, existen 22 contactos, con 12 puentes de hidrógeno. Los residuos que participan en el contacto de tipo  $\alpha_1\text{-}\beta_2$  son invariables y han sido altamente conservados a través de la evolución, por lo que la substitución de alguno de ellos puede provocar alteraciones drásticas en las propiedades funcionales de la Hb.<sup>2</sup>

En la oxihemoglobina (oxi-Hb), los residuos C terminales participan en interacciones electrostáticas que sujetan el tetrámero, proporcionándole mayor estabilidad. Los grupos hem están localizados en cavidades cercanas al exterior de la molécula, uno en cada subunidad y situados equidistantemente unos de otros. Las distancias entre los átomos de hierro de los cuatro grupos hem también varían entre la oxi-Hb y la desoxi-Hb. La estructura cuaternaria de la Hb varía durante la oxigenación debido a que el átomo de hierro se introduce en el plano de la porfirina, arrastrando la histidina en posición F8 para poder

formar un enlace fuerte con el O<sub>2</sub>. Al estado desoxigenado o reducido de la Hb se le denomina forma T (tensa) y al estado oxigenado la forma R (relajada).<sup>2</sup>

La capacidad de la Hb para enlazar O<sub>2</sub> depende de la presencia de cuatro grupos prostéticos, es decir, no protéicos, denominados grupos hem, que confieren a la Hb su color rojo característico. La estructura del grupo hem fue establecida en 1912 por Kuster, y cada molécula de hemoglobina dispone de cuatro de ellos, cada uno con un PM aproximado de 614 kDa y alojado en una cavidad que forma cada subunidad proteica. Todos los aminoácidos de esta cavidad son no polares, excepto la His en posición F8 (His proximal), que está unida covalentemente al hierro hem; y la His E7 (His distal), que queda próxima al grupo hem pero sin unirse a él.<sup>2</sup>

El Hem consta de una estructura cíclica plana, llamada protoporfirina IX y de un átomo de hierro. La protoporfirina IX está constituida por cuatro anillos pirrólicos unidos entre sí por puentes metenos, que forman un anillo tetrapirrólico. La posición central de este anillo está ocupada por un átomo de hierro reducido. La estructura espacial que adopta el hierro en su unión a la protoporfirina IX presenta 6 posiciones de coordinación, una de las cuales se une directamente a la cadena globínica y la otra fija reversiblemente el O<sub>2</sub>. La unión del O<sub>2</sub> al grupo hem solo es posible cuando el hierro se encuentra en estado reducido (Fe<sup>+2</sup>) y la forma correspondiente de la Hb es la ferrohemoglobina (ferro-Hb); cuando se oxida el hierro (Fe<sup>+3</sup>), la hemoglobina se transforma en ferrihemoglobina (ferri-Hb) ó metahemoglobina (meta-Hb), que carece de la capacidad para captar O<sub>2</sub>.<sup>2</sup>

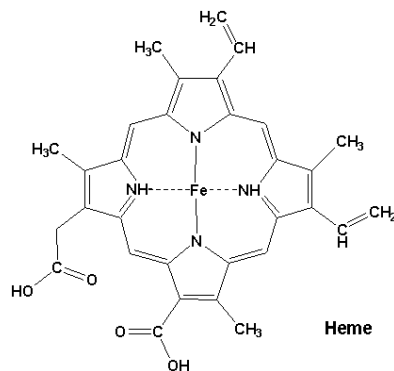


FIGURA 3.  
Estructura del grupo hem.<sup>5</sup>

La capacidad de la hemoglobina de transportar el oxígeno reside en su estructura oligomérica que permite la cooperación entre las subunidades de globina en su unión o liberación del oxígeno molecular. En este proceso, la molécula de Hb sufre un cambio (alostería) en el sentido de expansión cuando incorpora oxígeno y de contracción cuando lo libera. Los cambios conformacionales que se producen en las subunidades durante la oxigenación tienen su origen en la molécula del hem. Cuando el O<sub>2</sub> se une al hem, produce

una reducción de su diámetro atómico, por lo que puede moverse dentro del anillo de porfirina, resultando en una inclinación del hem en la cavidad en la que se encuentra. Esto produce un cambio en la estructura terciaria de las subunidades debido a la ruptura de los enlaces iónicos del extremo C-terminal. Al unirse el oxígeno a la molécula de hemoglobina, las cadenas de globina se aproximan entre sí (oxi-Hb ó forma R, por “relajada”), mientras que cuando esta se libera, esta distancia aumenta (desoxi-Hb, ó forma T, por “tensa”).<sup>2</sup>

### *Funciones de la hemoglobina.*

La Hb realiza su función respiratoria transportando el oxígeno desde los pulmones a los tejidos y participando en el transporte de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) desde los tejidos hacia los pulmones. Así mismo y a causa de su capacidad amortiguadora, interviene en la regulación de pH sanguíneo.<sup>2</sup>

El papel de la Hb como transportador de O<sub>2</sub> depende de su capacidad para captarlo y liberarlo como respuesta a los cambios de presión parcial de O<sub>2</sub> (P<sub>O2</sub>). Cada molécula de Hb puede unirse a un máximo de cuatro moléculas de O<sub>2</sub>, una molécula por cada hem. La unión hem - O<sub>2</sub> es reversible, de modo que cuando la concentración de O<sub>2</sub>, o la P<sub>O2</sub> es elevada, el O<sub>2</sub> se une a la Hb hasta saturarla, y cuando la P<sub>O2</sub> disminuye, el O<sub>2</sub> se libera en los tejidos.<sup>1,2</sup>

A cada P<sub>O2</sub> le corresponde un grado de saturación de la Hb, dado que la unión del O<sub>2</sub> sigue una cinética sigmoidea; esto significa que pequeños cambios de P<sub>O2</sub> inducen grandes cambios en la saturación. Fisiológicamente, esta propiedad facilita que la Hb se cargue de O<sub>2</sub> en el pulmón, donde la P<sub>O2</sub> es de aproximadamente 100 mmHg, y se libere en los tejidos, cuya P<sub>O2</sub> se aproxima a 25 mmHg. La forma sigmoidea de saturación es el resultado de la interacción de las 4 subunidades de la Hb, ya que por separado, cada una de ellas seguiría una cinética hiperbólica. Esta condición implica que cuando una subunidad de Hb fija O<sub>2</sub>, favorece la fijación en las otras tres, lo contrario ocurre cuando una subunidad libera O<sub>2</sub>. Estos cambios conformacionales de la molécula de hemoglobina en su unión con el oxígeno, se representan gráficamente mediante la curva de disociación de la oxihemoglobina, en la que puede observarse cómo la hemoglobina garantiza siempre la máxima capacidad de transporte y liberación de oxígeno.<sup>1,2</sup>

A través de esta curva puede determinarse la llamada P<sub>50</sub>, o valor de P<sub>O2</sub> para el cual la Hb presenta un 50% de saturación y corresponde al parámetro utilizado en la clínica para expresar la afinidad de la Hb por el oxígeno. Esta afinidad es regulada por diversos factores intraeritrocitarios, entre los que destacan la temperatura, el pH y la concentración de 2,3-DPG.<sup>1,2</sup>

La unión del O<sub>2</sub> a la Hb disminuye al aumentar la temperatura. En estados febriles las células aumentan su metabolismo y, por tanto, su necesidad de consumo de O<sub>2</sub>. Por ejemplo, a 40°C de fiebre, la capacidad de descarga de O<sub>2</sub> por la Hb se incrementa un 35%.<sup>2</sup>

Por otro lado, pequeños cambios de pH modifican de manera importante la capacidad de la Hb para unirse al oxígeno; cuanto mayor sea el pH a una determinada P<sub>O<sub>2</sub></sub>, mayor será el porcentaje de saturación con O<sub>2</sub>. Esto se debe a que, cuando la Hb se oxigena, libera un protón por cada molécula de O<sub>2</sub> unida, quedando ionizada de manera reversible de manera que un incremento en la concentración de H<sup>+</sup> provoca un descenso de la saturación de Hb; por el contrario, la disminución de la concentración de H<sup>+</sup> aumenta la saturación de Hb. El efecto del pH sobre el equilibrio O<sub>2</sub>-Hb recibe el nombre de efecto Böhr; esta propiedad tiene un gran significado fisiológico a través de sus efectos en el transporte de CO<sub>2</sub> en la sangre. La Hb también es responsable del transporte directo de un 10% del CO<sub>2</sub> respirado, el cual reacciona de manera reversible con el grupo N-terminal, principalmente de las cadenas α, dando lugar a la carbaminohemoglobina (HbCO<sub>2</sub>H).<sup>2</sup>

Dado que el CO<sub>2</sub> se une más fácilmente a la desoxi-Hb, esto facilita la liberación del CO<sub>2</sub> de la circulación. Tanto los iones hidrógeno a través del efecto Böhr, como el O<sub>2</sub>, uniéndose directamente a la Hb, contribuyen a disminuir la afinidad por el oxígeno, favoreciendo así la oxigenación de los tejidos.<sup>2</sup>

Algunos fosfatos orgánicos aumentan la estabilidad de la desoxi-Hb. En los eritrocitos humanos, el más importante es el 2,3-DPG, al cual se le encuentra en una concentración de 4 a 5 mM, correspondiente a la concentración de Hb intracelular. Una molécula de 2,3-DPG se introduce en la cavidad central que forman las subunidades de la desoxi-Hb, modificando su disposición espacial y dificultando la entrada del O<sub>2</sub>. Solo cuando la P<sub>O<sub>2</sub></sub> es elevada, el O<sub>2</sub> desplaza al 2,3-DPG y se une a la Hb. El 2,3-DPG reduce la afinidad de la Hb por el O<sub>2</sub>, estabilizando la forma T (desoxi-Hb). En términos cinéticos, el 2,3-DPG, desplaza el equilibrio respiratorio de la Hb hacia la forma desoxigenada y favorece la liberación del oxígeno. Este efecto se observa en la curva de disociación de la Hb por un desplazamiento hacia la derecha y un aumento de la P<sub>50</sub>.<sup>2</sup>

## 4.2 Hemoglobinopatías

### *Alteraciones en la hemoglobina.*

En los adultos normales se producen cuatro tipos de globinas: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ) y gama ( $\gamma$ ), que se presentan en pares idénticos; un par de cadenas  $\alpha$  se combina con un par de cadenas  $\beta$ ,  $\delta$  ó  $\gamma$  para formar tres tipos diferentes de Hb. <sup>1</sup>

La Hb humana normal consta de una mezcla de tres subtipos: Hb A<sub>1</sub>, Hb A<sub>2</sub>, y Hb F. La composición proteica de estos tres tipos de Hb varía. Así, la Hb A<sub>1</sub> tiene dos globinas  $\alpha$  y dos  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ), la Hb A<sub>2</sub> posee dos cadenas  $\alpha$  y dos  $\delta$  ( $\alpha_2\delta_2$ ), y la Hb F, dos cadenas  $\alpha$  y dos  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ). La Hb A<sub>1</sub> constituye del 95% al 97% de las proteínas del eritrocito maduro a una concentración aproximada de 35 g/dL, además, representa más del 90% de la Hb total por lo que funge como transportador mayoritario de oxígeno en la sangre. La Hb A<sub>2</sub> se encuentra hasta en un 2.5%, y la Hb F, hasta en el 1% en la edad adulta. A partir del nacimiento, aumentan los niveles de Hb A mientras los de Hb F disminuyen de manera que a los 6 meses de edad, la Hb F está presente solo en un 5%. <sup>1, 3, 6, 7</sup>

La estructura del hem es igual en todas las variantes de la hemoglobina, aunque existen genes para los diversos tipos de cadenas globínicas, de manera que las diferentes hemoglobinas se forman dependiendo del ensamblaje de la téttrada de cadenas de globina relacionadas. La composición de estas globinas es el factor que otorga algunas de las variadas propiedades funcionales y físicas de la hemoglobina. En los adultos normales, los tres tipos comunes de hemoglobina: Hb A<sub>1</sub>, Hb A<sub>2</sub> y Hb F, tienen un ordenamiento interno similar en cada globina. La cadena  $\alpha$  tiene 141 amino ácidos, en tanto que las cadenas  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  tienen 146. <sup>1</sup>

Las hemoglobinopatías pertenecen a un grupo diverso de desórdenes hereditarios que se caracterizan ya sea por la reducción en la síntesis de una o más cadenas de globina, conociéndose a estas alteraciones como hemoglobinopatías talasémicas; ó bien por una síntesis de hemoglobinas estructuralmente anormales ó hemoglobinopatías estructurales. Globalmente, se han descrito aproximadamente 900 variantes de Hb clasificadas por mutaciones que incluyen a las cadenas de globina  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ . <sup>2, 8</sup>

Tanto las hemoglobinopatías estructurales como las talasémicas son muy frecuentes y tienen una distribución geográfica muy amplia. Aunque algunas veces el sufijo *patía* da la impresión de tratarse de una enfermedad muy grave, en realidad la gran mayoría de los defectos estructurales son asintomáticos, obedeciendo por lo general al cambio de un aminoácido en la cadena de globina, como en los casos de Hb S y Hb C; con menor frecuencia pueden ser la consecuencia de deleciones, tal como lo encontramos en la Hb



Gun-Hill; hibridaciones anómalas entre dos cadenas diferentes, caso observado en Hb Lepore; o alargamiento de ellas, lo cual encontramos en la Hb Constant Spring.<sup>2</sup>

### *Hemoglobinopatías estructurales.*

Las hemoglobinopatías se transmiten por lo general con carácter autosómico dominante, por lo que en estado heterocigoto coexisten la Hb anómala y la Hb normal. La existencia de dos alelos con diferente mutación se conoce como doble heterocigoto y constituye una situación frecuente entre las hemoglobinopatías tanto estructurales como talasémicas. En la mayoría de los casos, el mecanismo molecular responsable de las hemoglobinopatías obedece a mutaciones puntuales, que consisten en la sustitución de una única base nitrogenada en uno de los genes que codifica para la globina, algunas veces son más de uno los aminoácidos sustituidos. Con menor frecuencia, la mutación es el resultado de deleciones, adiciones e incluso inserciones de bases nitrogenadas, o bien, el resultado del entrecruzamiento de material cromosómico no homólogo durante la meiosis, fenómeno conocido como *crossing-over*. Todas estas mutaciones tienden a afectar a los exones, que son las regiones codificadoras del gen, dando lugar a la síntesis de una cadena estructuralmente anómala de globina con una posible alteración de las propiedades fisicoquímicas o estructurales normales. Existen algunas variantes que son el resultado del alargamiento o acortamiento de las cadenas globínicas, o de la fusión de los productos de las cadenas  $\beta$  y  $\delta$  ó  $\beta$  y  $\gamma$ .<sup>2</sup>

Todas las hemoglobinopatías resultan de mutaciones situadas en genes del cluster  $\alpha$  o  $\beta$ , es decir, la región  $\alpha$  ó  $\beta$ , constituidos cada uno de ellos por tres exones y dos intrones. Si bien, las mutaciones que afectan los genes de globina suelen ser de varios tipos, las más frecuentes son las mutaciones puntuales que consisten en la sustitución de una única base nitrogenada. En algunos casos estas mutaciones alteran profundamente las estructuras secundaria y terciaria de la molécula de hemoglobina por el cambio de un aminoácido por otro o por el alargamiento de la cadena de globina, mientras que en otros no producen ningún cambio al sustituirse un triplete por otro que codifica el mismo aminoácido; o bien la alteración solo produce un cambio en la carga superficial de la molécula. Las mutaciones puntuales pueden ser homologas o heterólogas. Las segundas tienen, en general, una mayor repercusión clínica que las primeras. La mutación homóloga del ADN más frecuente es el cambio adenina-guanina (A-G). Un mismo triplete de bases nitrogenadas puede sufrir diferentes tipos de mutación puntual, lo que da lugar a diferentes tipos de hemoglobinas mutadas.<sup>2</sup>

Las inserciones o deleciones de uno o dos nucleótidos cambia el patrón de lectura de la cadena de ADN y da lugar a lo que se denomina *frameshift mutation* o *mutación por desviación de patrón de lectura*. Cuando esta mutación se produce al inicio de la transcripción, ésta puede quedar totalmente anulada originando un síndrome talasémico; o

dar lugar a una proteína sin significado biológico o inestable. Cuando se localiza al final, la globina resultante puede ser viable, aunque en general, presenta una modificación estructural o la adición de aminoácidos. Ejemplos de este tipo de mutaciones son la Hb Wayne, Hb Cranston y la Hb tak.<sup>2</sup>

Finalmente, otro tipo mutación obedece al intercambio de material genético entre cromosomas homólogos durante la meiosis, *crossover*, que puede dar lugar a dos mutaciones en el mismo gen, cadenas mixtas o variaciones en la longitud de las cadenas (acortamientos o alargamientos). Ejemplo de dos mutaciones en el mismo gen son las Hb C Harlem ( $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$ ,  $\beta 73 \text{ Asp} \rightarrow \text{Ans}$ ), Hb Arlington Park ( $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys} - \text{Lys} \rightarrow \text{Glu}$ ), Hb J Singapore ( $\beta 78 \text{ Ans} \rightarrow \text{Asp}$ ;  $79 \text{ Ala} \rightarrow \text{Gly}$ ), Hb C Ziguinchor ( $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$ ;  $\beta 58 \text{ Pro} \rightarrow \text{Arg}$ ) y Hb S Travis ( $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$ ;  $\beta 142 \text{ Val} \rightarrow \text{Ala}$ ).<sup>2</sup>

Ejemplos de deleciones  $\beta$  son las hemoglobinas Hb Freiburg, con la deleción de un aminoácido; Hb Lyon con la deleción de dos aminoácidos; y Hb Gun Hill que presenta la deleción de cinco aminoácidos. Un ejemplo de adición con duplicación de aminoácidos es la Hb Gardy. Otros ejemplos de este intercambio de material genético son las materias mixtas de globina, por ejemplo la Hb Lepore y anti-Lepore (cadena  $\beta - \delta$ ) o la Hb Kenya (cadenas  $\beta - \gamma$ ).<sup>2</sup>

Las mutaciones del gen  $\beta$  son más frecuentes que las del gen  $\alpha$  y cada gen es alélico, por lo que pueden compartir dos mutaciones diferentes en lo que se llama doble *heterocigoto*; o mutaciones idénticas en un estado *homocigoto*. Cuando solo uno de los alelos presenta la mutación se trata de un estado homocigoto. La transmisión hereditaria de las hemoglobinopatías es, en general, autosómica codominante lo que significa que el individuo heterocigoto expresa tanto la hemoglobina normal como la mutada. Dado que el ser humano posee dos genes  $\beta$  y 4  $\alpha$ , si la mutación afecta a un gen  $\beta$  se observa el 50% de cada una de las fracciones normal y patológica, mientras que si se halla afectando un solo gen  $\alpha$ , existirá únicamente un 25% de hemoglobina patológica. Esto solo deja de cumplirse en las hemoglobinas inestables, en donde la concentración de la fracción patológica es inferior a la esperada debido a la propia inestabilidad molecular. Desde el punto de vista clínico, la expresividad de la hemoglobinopatía solo se manifiesta en estado homocigoto o doble heterocigoto y, por lo general, el estado heterocigoto es asintomático. Esta regla no se cumple en caso de hemoglobinopatías inestables, en donde la expresividad clínica del defecto aparece ya en estado heterocigoto. Por tanto, a excepción de estas últimas, la expresividad clínica de las hemoglobinopatías sigue un patrón autosómico recesivo. Finalmente, las combinaciones entre genes no alélicos, por ejemplo  $\alpha$  y  $\beta$  pueden producir diferentes formas de expresividad clínica que difieren entre sí por la inestabilidad de la anemia hemolítica o el patrón electroforético de hemoglobinas.<sup>2</sup>

La repercusión de una mutación estructural sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la Hb, depende del tipo de aminoácidos mutados y de su localización en la cadena de globina. Las hemoglobinopatías estructurales pueden clasificarse en tres grandes grupos:<sup>2</sup>

a) Disminución de solubilidad, casi siempre acompañada de un cambio en la carga superficial (Hb S y Hb C, principalmente);<sup>2</sup>

b) Disminución de la estabilidad con precipitación intraeritrocitaria de la hemoglobina (hemoglobinas inestables), y<sup>2</sup>

c) Alteración de la función con aumento o disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno o por transformación permanente en metahemoglobina (Hb M, Hb Köln y Hb Tak asociada con talasemias  $\beta$ ).<sup>2,9</sup>

Las mutaciones que alteran la solubilidad de la Hb suelen situarse próximas a la superficie de la molécula, por lo que, en la mayoría de los casos, solo se acompañan también de un cambio de carga eléctrica (modificación de la movilidad electroforética). Las mutaciones restantes suelen ser internas y, a diferencia de las superficiales, pueden no acompañarse de variaciones de la carga eléctrica. La repercusión clínica de estas diferentes mutaciones depende de su efecto sobre la estructura o función de la molécula de hemoglobina. De acuerdo con ello, las hemoglobinopatías estructurales pueden presentar las siguientes formas de expresividad clínica:<sup>2</sup>

a) nula o asintomática, Hb G-Filadelfia y Hb J-Paris;<sup>2</sup>

b) anemia hemolítica, hemoglobinopatías con solubilidad alterada e inestabilidad;<sup>2</sup>

c) poliglobulia, aumento de la afinidad por el oxígeno.<sup>2</sup>

d) cianosis, disminución de la afinidad por el oxígeno y hemoglobinopatías M;<sup>2</sup>

e) fenotipo talasémico, hemoglobinopatías estructurales - talasémicas.<sup>2</sup>

En el último caso, la mutación responsable del cambio estructural en la cadena globínica va acompañada de una disminución de la síntesis proteica. En las hemoglobinopatías asintomáticas, la mutación se halla generalmente situada en la superficie de la molécula de hemoglobina y su consecuencia es un cambio en la carga eléctrica. Dado que esta suele ser la única característica de este tipo de hemoglobinopatías, su hallazgo suele ser casual y casi siempre con motivo de un escrutinio electroforético. Un ejemplo de esta situación es la Hb G-Filadelfia, totalmente asintomática.<sup>2</sup>

## *Hemoglobinopatías talasémicas*

Las hemoglobinopatías talasémicas incluyen un grupo heterogéneo de alteraciones congénitas de la síntesis de hemoglobina. Estas alteraciones se caracterizan por provocar una disminución parcial o total de la producción de una o varias cadenas de globina, llegando a lo que se conoce como síndrome talasémico o talasemia.<sup>2, 10</sup>

Etimológicamente, el término talasemia procede de la unión de dos vocablos griegos: thalassa (θηλασσα) que significa mar y aimá (αίμα), sangre. Con esta denominación, George Whipple hizo referencia a la alta incidencia que observó en las cercanías del mar mediterráneo. Durante el correr del tiempo, también se ha encontrado que esta enfermedad no es exclusiva de dicha zona, sino que se puede encontrar en individuos de diversas razas, incluyendo árabes, africanos, indúes y sudasiáticos. Estas hemoglobinopatías se heredan de manera autosómica dominante, siendo de frecuencia variable por zonas y presentando una distribución universal, y al igual que con las hemoglobinopatías estructurales, las talasémicas se relacionan con zonas en que existe o ha existido el paludismo endémico, debido al efecto protector que ejerce esta enfermedad frente al parásito, proporcionando una selección genética positiva a la población afectada.<sup>2</sup>

Las talasemias se denominan en función de la cadena de globina afectada; la talasemia  $\alpha$  consiste en la disminución en la producción de cadenas  $\alpha$ , la talasemia  $\beta$  en la disminución de cadenas  $\beta$  y así sucesivamente. El resultado de las talasemias es una síntesis deficiente de una o más globinas, lo cual tiene un efecto cuantitativo sobre las hemoglobinas, a diferencia de las hemoglobinopatías estructurales que provocan cambios cualitativos en la hemoglobina.<sup>2, 10</sup>

Las consecuencias del déficit de cadenas  $\alpha$  ó  $\beta$  mantienen un polimorfismo clínico característico en este grupo de trastornos debido a que predomina uno u otro de los siguientes mecanismos fisiopatológicos:<sup>2</sup>

a) La producción ineficiente de hemoglobina da lugar a microcitosis y a hipocromía, es decir, valores de volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) marcadamente disminuidos.<sup>2, 10</sup>

b) El exceso de cadenas sobrantes provoca una eritropoyesis ineficaz al precipitar en el citoplasma de los eritroblastos, impidiendo su maduración<sup>2</sup>

c) Las alteraciones morfológicas de los eritrocitos maduros comprometen seriamente su supervivencia en la circulación, dando lugar a hemólisis.<sup>2</sup>

Las formas mejor caracterizadas y clínicamente más importantes de talasemias son las talasemias  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta\beta$  que pueden subclasificarse por la deficiencia o parcialidad de la síntesis de la globina por parte del cromosoma afectado, expresadas como talasemias  $\alpha^+$ ,  $\beta^+$  y  $\delta\beta^+$ ; ó bien, por una ausencia total de la síntesis, que se describen como talasemias  $\alpha^0$ ,  $\beta^0$  y  $\delta\beta^0$ .<sup>2</sup>

En algunas poblaciones, las hemoglobinopatías talasémicas coexisten con una gran cantidad de hemoglobinopatías estructurales por lo que resulta muy frecuente la asociación de ambas alteraciones genéticas. Del mismo modo, puede ocurrir que un mismo individuo reciba genes para más de un tipo de talasemia, estas complejas interacciones dan lugar a un amplio espectro de fenotipos cuya expresividad clínica puede variar desde una anemia hemolítica muy intensa, hasta formas prácticamente asintomáticas, que presentan solamente el rasgo talasémico.<sup>2</sup>

La talasemia  $\alpha$  constituye la alteración genética más frecuente a nivel mundial y está ampliamente distribuida a través de los países mediterráneos. Es resultado de la disminución de las globinas  $\alpha$  y sus formas más frecuentes se asocian con anemias microcíticas e hipocromías no ferropénicas sin expresividad electroforética, y las más graves son la hemoglobinopatía H por presencia de Hb H y la hidrops fetalís, determinada por la presencia de Hb Bart. La síntesis de globina  $\alpha$  está determinada por los genes de la región de la globina  $\alpha$  (región  $\alpha$ ), situada en el brazo corto del cromosoma 16, siendo la delección la patología molecular más frecuente para esta cadena.<sup>2</sup>

Las hemoglobinopatías talasémicas  $\beta$  tienen diferentes expresividades clínicas, resultado de la posibilidad de su combinación con un gen normal u otro también afectado. Principalmente, esta patología se origina en mutaciones puntuales que afectan el gen de la globina  $\beta$  situado en el cromosoma 11, pudiendo producir defectos en la transcripción ó en la traducción a ARNm. La talasemia  $\beta$  va desde una talasemia mínima, asintomática; pasando por una anemia discreta con disminución en el VCM; o hasta una talasemia mayor con anemia hemolítica crónica e intensa, esplenomegalia gigante y requerimiento transfusional.<sup>2</sup>

Las talasemias  $\delta\beta$  presentan una disminución o desaparición de la síntesis de cadenas  $\delta$  y  $\beta$ . Su incidencia es mucho menor que la talasemia  $\beta$ , pero al igual que esta, es muy heterogénea tanto clínica como molecularmente. A menudo obedece a delecciones largas que implican la región de la globina  $\beta$  y eliminan ambos genes,  $\beta$  y  $\delta$ , dejando intacto uno o ambos de los genes  $\gamma$ , por lo que se produce una síntesis compensadora de globina  $\gamma$  y la resultante Hb F mayor que la que se observa en la talasemia  $\beta$ .<sup>2</sup>

### 4.3 Métodos para el estudio de hemoglobinopatías.

#### *Diagnostico de las hemoglobinopatías*

Algunos comités de hematología proporcionan recomendaciones a los laboratorios para desarrollar pruebas para el diagnostico de hemoglobinopatías estructurales y talasémicas. La identificación certera de hemoglobinopatías puede alcanzarse si se siguen los pasos de un diagrama algorítmico, iniciando un historial clínico detallado que contenga: <sup>11, 12</sup>

- Una evaluación hematológica: CHC, recuento de reticulocitos, inducción de drepanocitos (FIGURA 4), formación de cuerpos de Heinz y curva de disociación del oxígeno. <sup>9, 11, 12</sup>
- Técnicas de análisis proteico: Electroforesis o enfoque isoelectrico (EIE), CLAR FR, CLAR IC. <sup>11, 12</sup>
- Análisis de ácidos nucleicos: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de transcripción reversa (PCR RT), secuenciación del ADN genómico y secuenciación del ADN del gen correspondiente a la globina de interés con amplificación por PCR RT. <sup>12</sup>

Una vez que se sospecha un desorden de este tipo, las pruebas con las que se recomienda iniciar incluyen una electroforesis a pH de 9.2, pruebas de solubilidad e inducción de drepanocitos. En el caso de encontrarse alguna Hb anormal en las pruebas preliminares, se recomienda utilizar técnicas posteriores de identificación de la variante. Estas técnicas incluyen a la electroforesis a pH 6, la separación de las cadenas de globina y el EIE. Aunque la electroforesis ha sido utilizada desde hace años, la CLAR IC ha emergido como el método de elección para la cuantificación de Hb A y Hb F, así como en la identificación de variantes de Hb. También se encuentran disponibles métodos inmunológicos para la detección de diversas hemoglobinopatías. Cabe denotar que la identificación de hemoglobinopatías es a menudo presuntiva, para una identificación definitiva, se requieren métodos de secuenciación de aminoácidos o de análisis de ADN. <sup>13, 14</sup>

El diagnóstico se requiere en los siguientes casos: <sup>14</sup>

- ✓ Para confirmar un diagnostico provisional como en el caso de anemia falciforme o beta talasemia.
- ✓ Para explicar una anomalía hematológica como anemia o microcitosis.
- ✓ Para identificar una anomalía en la fase presintomática, como es el caso del tamiz neonatal.

- ✓ Para predecir desordenes serios en la síntesis de las globinas en el feto y ofrecer la opción de finalizar el embarazo.
- ✓ Para brindar consejo genético a los futuros padres.
- ✓ Como monitoreo preoperatorio de Hb S.<sup>14</sup>

### *Evaluación Hematológica*

Por lo regular se requisita una CHC que incluya un recuento de células rojas, hemoglobina, hemoglobina corpuscular media, volumen corpuscular medio en todos los individuos de los que se sospechan desordenes en la síntesis de globinas, con excepción del tamiz en neonatos. También puede haber impacto en la CHC de pacientes con hemoglobinopatías estructurales.<sup>13,14</sup>

A menudo las talasemias son clasificadas como anemias hipocrómicas microcíticas, por lo que el VCM es un indicador clave ya que los individuos talasémicos presentan un VCM menor que 72 fL y una HCM menor que 27 pg<sup>11</sup>. Algunas de las causas de anemia microcítica, por lo regular la deficiencia en hierro, se caracterizan por un incremento en el RDW, que es la medición del índice de variación en el tamaño de los eritrocitos; en contraste, algunas talasemias producen eritrocitos microcíticos uniformes de manera que el RDW se encuentra disminuido y también una compensación con un número elevado de células rojas. Las talasemias también están acompañadas de una disminución en la concentración de hemoglobina.<sup>13</sup>

Un rasgo de la Hb H es la presencia de inclusiones eritrocitarias debidas a la precipitación de la Hb H al oxidarse. La Hb H es un tetrámero de cuatro globinas  $\beta$ , que tiene un exceso de concentración en la presencia de  $\alpha$  talasemia debido a la disminución en la producción de globinas  $\alpha$ . Para observar las inclusiones se utilizan tinciones oxidantes como azul de metileno nuevo o azul brillante de cresilo.<sup>2</sup>

El hallazgo de cuerpos de Heinz no es muy específico, pero es útil en la detección de variantes inestables de hemoglobina<sup>11,15</sup>. La precipitación del Hem se debe a una disminución en la afinidad hacia este grupo, debidas a sustituciones en los aminoácidos que se enlazan a él.<sup>15</sup>

La inducción de drepanocitos (FIGURA 4), también llamada prueba de la desoxigenación, consiste en exponer la sangre a un estado de hipoxia en el cual, los eritrocitos que contienen Hb S adoptan una forma de hoz conociéndose como drepanocitos o eritrocitos falciformes. En esta técnica, se coloca una suspensión de eritrocitos en un portaobjetos, se añade un agente reductor para desoxigenar, como es el caso del metabisulfito, y se coloca un cubreobjetos sellando las esquinas para evitar en lo posible el contacto de la sangre con el

oxígeno ambiental. Pasados unos minutos se observa al microscopio en busca de drepanocitos.<sup>2,13,16</sup>

En individuos con anemia falciforme no es común encontrar deficiencias de hierro dado que tienen una disponibilidad normal de hierro además de la elevación provocada por los altos índices de eritrocitos en la sangre y por las transfusiones que se hayan podido requerir. Por otra parte, un artículo publicado en abril de 2008 en el Indian Journal of medical research demuestra que en ciertos casos, la anemia ferropénica puede pasar desapercibida en casos de anemia falciforme, y la omisión de un tratamiento adecuado resulta en una baja concentración intracelular de hemoglobina, lo que puede intensificar el estado falciforme. El grupo de investigadores encabezado por Mohanty, utilizan los niveles de protoporfirina como indicador de anemia por déficit de hierro, considerando anormales a los casos con niveles elevados sobre los 80  $\mu\text{mol}$  de protoporfirina / mol de hem; ellos indican que solo en estos casos de anomalía, es importante proporcionar hierro como suplemento alimenticio.<sup>17</sup>

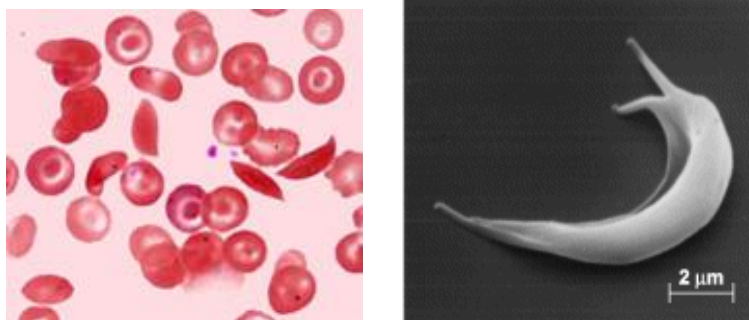


FIGURA 4  
Micrografías óptica y  
electrónica de  
drepanocitos.<sup>18,19</sup>

El uso de las curvas completas de disociación del oxígeno determinadas por métodos automatizados en suspensiones de eritrocitos, ha resultado ser de importancia como auxiliar en la detección de variantes de Hb, en especial de aquellas que no presentan migraciones diferentes de la Hb A en la electroforesis y es un método útil para inferir las propiedades funcionales de componentes de la hemoglobina que no son de fácil aislamiento. Se ha encontrado una desviación hacia la izquierda en la curva de disociación de la Hb H, Hb Köln y Hb Tak asociada con talasemia  $\beta$ ; también se reporta una elevada afinidad de la Hb Ypsilanti por el oxígeno, además de que para 2007 son ya más de 100 las variantes de hemoglobina que presentan una alteración en su afinidad por el oxígeno.<sup>9, 11, 20</sup>

#### *Técnicas de Análisis Protéico.*

El análisis protéico de las variantes de hemoglobina consta de dos pasos, la detección y la determinación de la estructura. Una estrategia común es utilizar la electroforesis en la



detección y la cromatografía para separar los péptidos cuya secuencia de aminoácidos se va a determinar, sin embargo el desarrollo de la cromatografía y la espectrometría de masas han hecho que esta estrategia cambiara en los últimos años.<sup>21</sup>

Actualmente se encuentran disponibles equipos para inmunoensayo de Hb S, Hb C, Hb E y Hb A. El inmunoensayo es potencialmente útil para una detección inicial, sin embargo hay problemas debidos a fallas intermitentes del método.<sup>14</sup>

Tradicionalmente se ha utilizado la electroforesis como método de monitoreo para variantes de hemoglobina por ser la proteína más abundante en la sangre y no requerir un tinte especial para su visualización. Esta técnica se fundamenta en que cada globina migra a una velocidad característica que depende principalmente de su carga, y esta puede variar según el pH o la composición del regulador en que se corra la prueba. Se han desarrollado métodos electroforéticos comerciales rápidos para la separación alcalina a pH de 8.4 ó ácida a 6.2 en geles de agarosa que permiten la cuantificación de la Hb presente por detección densitométrica. En estos casos, la visualización de las bandas de hemoglobina es posible gracias a la tinción con Amino Negro o Ácido Violeta.<sup>13, 22, 23, 24</sup>

El enfoque isoelectrico EIE es una técnica electroforética con una resolución excelente (FIGURA 5). Aunque es laboriosa y lleva tiempo realizarla, esta técnica se ha utilizado para identificar y cuantificar ciertas Hbs. El EIE es un proceso de equilibrio en el cual la Hb migra en un gradiente de pH hasta una posición en que su carga neta alcanza el valor de cero. El orden de migración en el EIE es el mismo que en la Electroforesis Alcalina, solo que presenta mejor resolución de la Hb C a la Hb E y de las Hb O y Hb S a la Hb D y Hb G. Además, la Hb A y la Hb F están claramente resuelta.<sup>13, 25</sup>

La electroforesis capilar resulta ser una técnica analítica de desempeño rápido y versátil, con una amplia aplicación a diferentes tipos de analitos y en diversas modalidades, incluyendo el enfoque isoelectrico capilar. Los instrumentos para electroforesis capilar están manipulados por computador y utilizan un detector en línea de los analitos separados electroforéticamente en capilares microboro, que proporciona sensibilidad a la detección y una adquisición de datos similar a la que se observa por HPLC. Las ventajas son que requiere menor cantidad de muestra, que los reactivos utilizados son menos costosos y se usan en menor cantidad; y que los capilares como medio de separación también son menos caros que una columna cromatográfica.<sup>26</sup>

El enfoque isoelectrico capilar EIEC es una técnica híbrida que combina la sensibilidad en la detección de la electroforesis capilar con el automuestreo y adquisición de datos de la CLAR. La separación de la Hb por esta técnica está relacionada con el punto isoelectrico de la Hb y esto puede ser motivo de mejora en la reproductibilidad interlaboratorio. Las globinas obtenidas por precipitación de hemolisados en acetona fría pueden analizarse

directamente por electroforesis capilar sin un tratamiento previo; la velocidad y resolución de este método permiten una diferenciación rápida entre hemoglobinas de cargas semejantes. También se puede realizar el mapeo del digerido de cada globina con tripsina, obteniendo una caracterización más completa de la variante al comparar el mapa con el de una hemoglobina normal. Por otro lado, el acoplamiento de los datos electroforéticos con el análisis de los digeridos enzimáticos por espectrometría de masas con mapeo por bombardeo atómico rápido, hace posible identificar la variación de los aminoácidos.<sup>13, 23</sup>

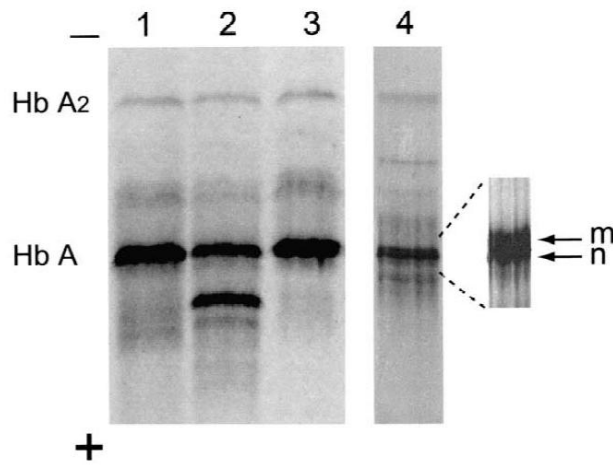


FIGURA 5  
Enfoque Isoeléctrico de Hb.  
Línea 1: Hemolisado Normal.  
Línea 2: Hb Moriguchi ( $\beta 97H \rightarrow Y$ ).  
Línea 3: Hb Miyazono ( $\beta 79D \rightarrow E$ ).  
Línea 4: Hb Meilahti ( $\beta 36P \rightarrow V$ ).<sup>21</sup>

La CLAR IC ha emergido como la técnica de elección para el monitoreo inicial de variantes de Hb, incluyendo el monitoreo neonatal; y para la cuantificación de Hb A<sub>2</sub> y Hb F. La cuantificación de la Hb F es de suma importancia en el diagnóstico de la persistencia hereditaria de Hb F (PHHF), leucemia mielogena crónica juvenil y síndrome de monosomía 7, y de igual modo en el monitoreo terapéutico de pacientes con anemia falciforme.<sup>13</sup>

La CLAR FR (FIGURA 6) se ha utilizado como una mejora en la espectroscopía por ionización con electro spray, y junto a la CLAR con espectroscopía de masas, se ha utilizado para caracterizar variantes de Hb. Cuando se utiliza la CLAR en la medición de Hb glucosilada, llamada Hb A<sub>1C</sub>, algunas variantes pueden afectar adversamente su cuantificación, entre ellas se encuentran la Hb Niigata, Hb Sherwood Forest, Hb Rambam y Hb Raleigh, que provocan elevaciones falsas de la Hb A<sub>1C</sub>.<sup>13</sup>

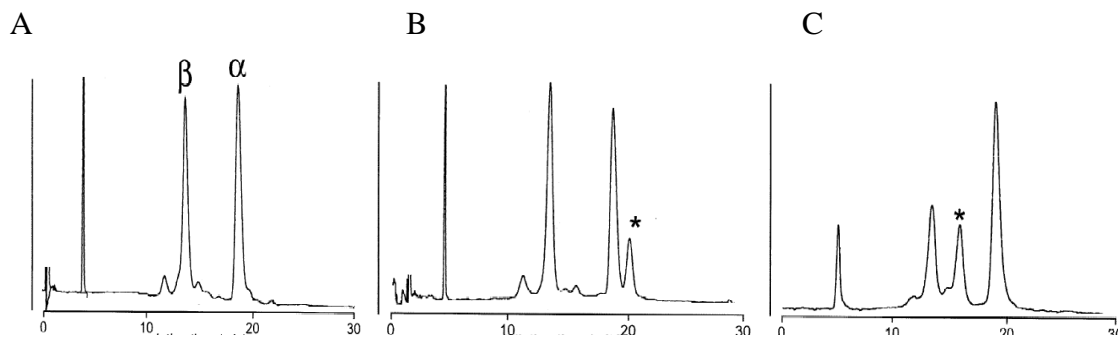


FIGURA 6

CLAR-FR de globinas en una columna C4 con un gradiente de acetonitrilo del 38% al 50% en buffer de ácido tricloroacético. A) Cromatograma de Hemoglobina Normal. B) Hb Tokyo II ( $\alpha 89H \rightarrow N$ ). C) Hb Moriguchi ( $\beta 97H \rightarrow Y$ ).<sup>21</sup>

Existen actualmente algunos estándares de laboratorio que establecen que al utilizar CLAR como una prueba de monitoreo para hemoglobinopatías, todas las variantes no Hb A y no Hb S deben confirmarse por un método alternativo, incluyendo electroforesis ácida y alcalina.<sup>24</sup>

La espectroscopía de masas (EM) es otra opción para la detección de variantes de Hb. La masa molecular de las proteínas se puede determinar por ionización con electro spray o por desorción / ionización asistida por matriz laser. Las masas promedio de las globinas  $\alpha$  y  $\beta$  son Mr 15126.4 y Mr 15867.3 respectivamente. La diferencia en la masa molecular entre los aminoácidos varía de 0 a 129 unidades de masa, de manera que muchas de las sustituciones de aminoácidos en la Hb se analizan eficientemente por EM, excepto por las sustituciones Leu / Ile y Lys / Gln, que suponen un silencio en la masa nominal.<sup>21</sup>

### *Análisis de Ácidos Nucléicos*

Después de la identificación presuntiva de hemoglobinopatías estructurales o talasémicas, y particularmente con el fin de dar un consejo genético, puede requerirse definir la mutación o delección que se encuentra presente, para lo cual se encuentran disponibles varias técnicas moleculares.<sup>13</sup>

En el caso de hacer un estudio prenatal, existen 3 procedimientos posibles: el muestro de vellosidad coriónica, la amniocentesis y el muestreo de sangre fetal. Estos tres se utilizan para el análisis molecular por contener suficiente ADN para analizar por métodos basados en PCR. Las muestras de sangre fetal pueden utilizarse tanto para el análisis molecular como para estudios de biosíntesis de la cadena de globina, esto último cuando no se

conocen las mutaciones de los padres, o si el padre no se encuentra disponible para realizar las pruebas necesarias aunque muchos de los centros dedicados a este tipo de estudios han optado por no realizar estudios de la biosíntesis de la cadena de globina. Al tratarse de individuos adultos el ADN de las células blancas sanguíneas es la fuente a elegir para el análisis molecular.<sup>11</sup>

Tradicionalmente las mutaciones delecionales que provocan síndromes talasémicos  $\alpha$  y raros síndromes  $\beta$  se diagnostican utilizando hibridación de Southern Blot en los productos de una endonucleasa particular para encontrar los genes complementarios de una sonda.

Usando sondas para alelos específicos después de la amplificación de los genes de la globina, o bien, *primers* para alelos específicos, se lleva a cabo la técnica de PCR en términos de mutaciones o deleciones ya conocidas, como los son la Hb S, Hb E, Hb F y Hb O, además de una gran cantidad de talasemias  $\beta$ .

Para mutaciones desconocidas, hay muchos métodos basados en la PCR, incluyendo a la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización y el análisis del polimorfismo conformacional de una sola hebra, o bien la secuenciación del ADN del gen de la globina amplificado.<sup>13</sup>

#### *Bases de Datos de Hemoglobinopatías*

Continuamente se actualizan diferentes bases de datos de hemoglobinopatías, así como guías para la recolección, documentación, almacenamiento y organización de la enorme cantidad de datos genómicos, relacionados a desórdenes hereditarios.<sup>27</sup>

A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias es una base de datos en línea que contiene información acerca de variantes de hemoglobina y mutaciones que provocan talasemias. Fue desarrollada en 2001 por el esfuerzo de un multicentro académico para proveer información oportuna de cambios en la secuencia genómica de las hemoglobinas estructurales y talasémicas. Esta base de datos incluye descripciones fenotípicas, efectos bioquímicos y hematológicos asociados con la patología y la frecuencia étnica, en compañía de frecuencias y referencias de la mutación.

La página de búsqueda de esta base de datos tiene una interface amigable para el usuario, y puede encontrarse en el sitio: <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html><sup>27,28</sup>

Por otro lado, XPRbase es una base de datos independiente, pero vinculada con la página web de HbVar y desarrollada para proveer una lista de varios protocolos experimentales

para el monitoreo de las mutaciones en los genes de las globinas. El sitio de XPRbase es: <http://www.goldenhelix.org/xprbase><sup>27,29</sup>

Finalmente, como parte del *Globin Gene Server*, del *National Human Genome Research Institute* de estados unidos, se encuentra ENCODE, la Enciclopedia de Elementos del ADN. En ENCODE encontramos una adaptación de las bases de datos de HbVar y GenPhen, una base de datos enfocada a mejorar la comprensión entre fenotipo y genotipo en humanos. ENCODE completa la trayectoria desde la secuenciación del genoma al análisis funcional de las mutaciones humanas y a los fenotipos clínicos de grupos de pacientes. La página del proyecto ENCODE es: <http://www.genome.gov/10005107><sup>27,30</sup>

## 4.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución

### *Cromatografía.*

Hasta mediados del siglo XX, las separaciones analíticas se llevaban a cabo en su mayor parte por métodos clásicos como gravimetría, destilación o extracción, sin embargo en la actualidad las separaciones analíticas se realizan en la mayoría de los casos por métodos de cromatografía ó electroforesis, especialmente en el caso de mezclas complejas y multicomponentes.<sup>31</sup>

En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el que los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil y retenidos selectivamente por una fase estacionaria. De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en cromatografía de gases y cromatografía de líquidos.

El éxito en la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, incluyendo la preparación de la muestra, el tipo, longitud y diámetro de la columna; la naturaleza y la velocidad de la fase móvil, el tipo de detector y el método de integración de los cromatogramas, entre alguna otra condición capaz de influir en los resultados.<sup>32</sup>

El fenómeno de la migración diferencial en la CLAR es el resultado de la divergencia en la retención de los componentes de una mezcla, provocado por el proceso básico de sus distribuciones diferenciales entre las fases móvil y estacionaria. Los componentes se separan en la columna y al salir de ella son transportados en el orden en que emergieron hacia un detector en el que se registra una respuesta proporcional a sus concentraciones en función del tiempo ó volumen de la fase móvil utilizado por el equipo hasta ese momento, el gráfico resultante se denomina cromatograma y en él se muestran, en forma de picos, cada uno de los compuestos que sale de la columna. Los picos tienen tiempos de retención característicos de la sustancia, por lo cual pueden utilizarse para identificarla, además su tamaño es proporcional a su concentración, de manera que el cromatograma también proporciona datos para la cuantificación.<sup>31, 32, 33</sup>

El tiempo de retención se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.<sup>32</sup>

Los mecanismos o procesos de separación que resultan en la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria, dan lugar a los diferentes métodos de cromatografía de líquidos. La modalidad exacta de cromatografía en cierta operación, está

dada principalmente por la naturaleza del empaque de la columna, es decir, la fase estacionaria.<sup>32, 34</sup>

### *Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.*

El aparato de CLAR (FIGURA 7) está diseñado y producido para asegurar la liberación de volúmenes correctos de fase móvil, incluyendo la muestra inyectada; posee detectores que producen poco ruido, de manera que puedan analizarse convenientemente pequeñas concentraciones de una muestra. Esencialmente, un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de 5 partes: un sistema de bombeo, un sistema de inyección, la columna, el detector y un registrador de señales.<sup>32, 35</sup>

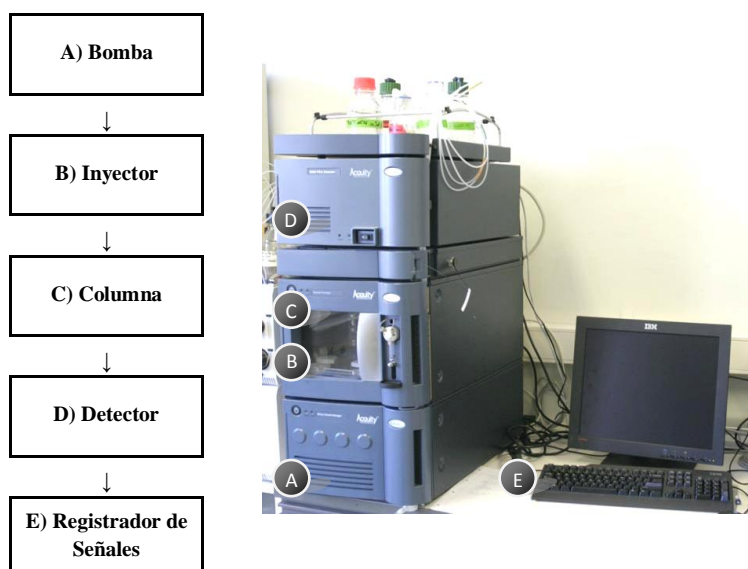


FIGURA 7  
Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.<sup>36</sup>

A. Sistema de bombeo. El objetivo del sistema de bombeo es impulsar la fase móvil a través de la columna, cumpliendo funciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo laminar y de velocidad constante. Los sistemas de bombeo constan de una o más bombas, reservorios para los disolventes y un sistema de degasificación. Una bomba típica tiene un rango de flujo que va desde 0.001 mL/min y llegando a los 10 mL/min.<sup>32,35</sup>

Muchos cromatógrafos se limitan a flujos isocráticos, es decir, que mantienen constante la proporción de disolvente, pasando por gradientes binarios e incluso terciarios que cambian la proporción entre 2 y 3 componentes respectivamente.<sup>35</sup>

B. Sistema de Inyección. Existen varios mecanismos de inyección, el más sencillo consiste en introducir la muestra mediante una jeringa que debe atravesar un septo y soportar la presión del sistema. El segundo sistema consiste en inyectoros con asas intercambiables de volumen fijo, que pueden llenarse con un exceso de muestra; estos dispositivos desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra y lo reanudan posteriormente a través del inyector, arrastrando un volumen constante de muestra. Los inyectoros automáticos representan un tercer sistema, capaz de minimizar errores al momento de introducir la muestra.<sup>32</sup>

C. Columna. La columna se considera la parte fundamental de la cromatografía, pues en esta es donde se lleva a cabo la separación. El material de empaque y las dimensiones de la columna seleccionados dependerán básicamente de la separación que se desee hacer.

Si el objeto de la separación es aislar sustancias de una mezcla, se emplean columnas preparativas en las que las partículas del empaque son de dimensiones mayores que en las columnas analíticas y tanto la longitud como el diámetro interno son mayores ya que deben tener la capacidad de contener cantidades elevadas de la muestra. Su longitud, puede ser variable, desde 10 cm hasta 1 m; dependiendo del número de platos teóricos deseado, ya que este aumenta con la longitud, mejorando la resolución, aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula de este, ya que al elevar el área de superficie del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la FE.

El relleno de las columnas analíticas puede ser a base de partículas de una cerámica inorgánica de sílica o alúmina; o un polímero orgánico de poliestireno-divinilbenceno o metacrilatos. Se debe considerar la influencia de la geometría de la partícula en el empacamiento de la columna, y por lo tanto, en la eficiencia de la separación. También se debe considerar la porosidad de la partícula y la influencia que el tamaño del poro puede tener, sobre todo en separaciones fundamentadas en la diferencia de pesos moleculares. Se considera que un tamaño promedio del poro en la partícula de sílica para aplicaciones analíticas es de  $100 \pm 20 \text{ \AA}$ . Aunado al tamaño de poro, está la cantidad de poros que cada partícula presenta, lo cual le dará cierto grado de rigidez, las menos porosas serán mecánicamente más resistentes. Un material de sílica con poro específico de 1 mL/g se considera como promedio.

Otro parámetro importante asociado con la partícula es su tamaño; usualmente en la cromatografía preparativa se utilizan partículas de gran tamaño, en tanto que las partículas pequeñas se utilizan en separaciones rápidas. Comercialmente hay varios tamaños de partícula:<sup>32</sup>



- > 10  $\mu\text{m}$  para las técnicas preparativas.
- 10  $\mu\text{m}$  en cromatografía semipreparativa.
- 5  $\mu\text{m}$  es común en técnicas analíticas.
- 3  $\mu\text{m}$  para separaciones muy rápidas.

D. Detector. Uno de los mayores retos en el desarrollo de la CLAR ha sido el perfeccionamiento de los detectores. Un detector ideal para CLAR sería aquel que cumpliera con lo siguiente:<sup>31</sup>

- ✓ Sensibilidad adecuada.
- ✓ Buena estabilidad y reproducibilidad.
- ✓ Respuesta lineal a varios rangos de concentración.
- ✓ Tiempo de respuesta corto.
- ✓ Manejo sencillo y confiable.
- ✓ Respuesta similar para todos los solutos, o bien altamente selectiva.
- ✓ No destructivo de la muestra.
- ✓ Volumen interno mínimo para no aumentar el ancho de banda.

Los principales detectores disponibles se enlistan a continuación:<sup>35</sup>

- ✓ Detector de Absorbancia
- ✓ Detector de Arreglo de Fotodiodos
- ✓ Detector de Fluorescencia
- ✓ Detector de Dispersión de luz evaporativa
- ✓ Detector de Electroquímica
- ✓ Detector de Índice de refracción
- ✓ Detector de Conductividad
- ✓ Detector de Radiactividad
- ✓ Detector de Espectrometría de masas

E. Registrador de señales. Tras su paso por la columna, el eluyente debe dejar una señal en el detector, el cual, a su vez, debe registrarla en uno de tres sistemas: un graficador, un integrador electrónico o un sistema computarizado de procesamiento de datos. El uso de una computadora con un software adecuado hace fácil el procesamiento de los datos, proporcionando un algoritmo que se emplea para la integración y facilitando la construcción de curvas de calibración para la cuantificación del contenido de analito en los picos.<sup>32</sup>

## *Tipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución*

### A. Cromatografía de Fase Normal.

También conocida como cromatografía sólido líquido o de adsorción, es la modalidad de separación tradicional, basada en la adsorción y la desorción del analito en una fase estacionaria polar, por lo general de sílica o alúmina. Las partículas de sílica porosa con grupos silanol que residen en toda su superficie, incluyendo los poros, provocan que los analitos polares migren lentamente a través de la columna debido a las fuertes interacciones con los grupos silanol. La retención de la muestra se incrementa con la polaridad del soluto, y al incrementar la polaridad de la fase móvil, se reducen todas las retenciones.<sup>35,37</sup>

Se encuentran disponibles en el mercado columnas de fase enlazada que contienen grupos funcionales diol, ciano, dietilamino, amino o diamino.<sup>35</sup>

### B. Cromatografía de Fase Reversa.

La retención en la CLAR FR se debe a interacciones hidrofóbicas inespecíficas entre el soluto y la fase estacionaria. La aplicación casi universal de la CLAR FR se deriva del hecho de que virtualmente todas las moléculas orgánicas poseen regiones hidrofóbicas en su estructura, lo que las hace capaces de interactuar con la FE.

La CLAR FR se lleva a cabo en columnas cuya fase estacionaria tiene una superficie menos polar que la fase móvil. Los empaques más comunes para separaciones por FR poseen ligandos que se encuentran enlazados covalentemente a las partículas de sílica porosa, entre estos ligandos encontramos al octadecilo, octilo, fenilo o cianopropilo.

Los disolventes más frecuentemente utilizados en CLAR FR son metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano, utilizados en combinación binaria, ternaria o cuaternaria con agua.<sup>35</sup>

### C. Cromatografía de Intercambio Iónico.

La CLAR II utiliza las interacciones dinámicas entre los iones de los solutos cargados y la fase estacionaria que posee grupos con la carga opuesta. En este tipo de separación, los iones de la muestra y los de carga similar en la fase móvil compitan por sitios en la fase estacionaria. Además la retención puede verse afectada por la partición de los solutos entre las fases móvil y estacionaria, al igual que en la CLAR FR. La cantidad de iones que compiten por el sitio cargado determinará la retención. En general, este tipo de CLAR puede utilizarse para separar especies iónicas tales como ácidos o bases, que pueden ionizarse a ciertas condiciones de pH.<sup>35</sup>

#### D. Cromatografía de Exclusión.

La cromatografía de exclusión, también conocida como cromatografía en gel, es, fundamentalmente diferente de las otras modalidades y utiliza la difusión selectiva de moléculas de soluto dentro de los poros llenos de solvente. Las moléculas más pequeñas ingresaran en los poros, perneándolos mientras que las moléculas más grandes y espaciosas serán excluidas. Así que la separación se lleva a cabo basándose en el peso y el tamaño molecular, en donde las moléculas más grandes son eluidas más rápidamente de la columna.

Son principalmente dos los materiales disponibles para CLAR E ya sean polímeros semi rígidos entrecruzados, o cristales rígidos de sílica inerte. El rango de tamaño de poro en ambos casos va de 5 a 10  $\mu\text{m}$ .<sup>34</sup>

#### E. Cromatografía de Afinidad.

Este tipo de cromatografía es una variación de la cromatografía en gel que explota la interacción específica donador ligando; muchas aplicaciones implican el enlace bioespecífico entre una molécula bioquímica y una proteína. Esta técnica utiliza empaques basados típicamente en geles suaves como la agarosa dentro de cuya matriz se inmoviliza el ligando por enlaces covalentes. A menudo es un grupo alquilo o un espaciador el que se inserta entre el ligando y la matriz para eliminar el impedimento estérico causado cuando la zona de enlace queda oculta. Algunas aplicaciones utilizan sílica de amplio tamaño de poro como soporte. La muestra se ingresa en la columna por medio de un eluyente tal que permita que el sustrato sea específico pero sin causar la unión irreversible de la molécula a su ligando.

Posteriormente, la composición o el pH del eluyente se alteran, de manera que se debilite el enlace ligando sustrato, promoviendo la disociación y facilitando la elución de los compuestos retenidos. Por la naturaleza de la técnica, los empaques se sintetizan para aplicaciones particulares. Así, la CLAR Af tiene un potencial considerable por su utilidad en aplicaciones bioquímicas y clínicas, como la purificación de antígenos, enzimas, proteínas, virus y hormonas.<sup>34</sup>

#### *Aplicaciones de la CLAR en muestras biológicas.*

La CLAR es una técnica analítica muy popular en el análisis de fármacos y de muestras biológicas debido a la facilidad de operación de todos los métodos y a la capacidad de separar analitos estrechamente relacionados entre sí con excelente selectividad y sensibilidad. El costo de la adquisición de los aparatos para CLAR suele estar al alcance de muchos laboratorios, la instrumentación es altamente confiable y su mantenimiento puede

llevarse a cabo por un amplio rango de personal de laboratorio. Las implicaciones ambientales que tiene la disposición de disolventes orgánicos han sido minimizadas aún más con la introducción de columnas microbora y de sílica no porosa de 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

La detección de un fármaco o una sustancia en una muestra biológica, incluyendo sangre, plasma, suero, heces, saliva, tejidos o cabello, suele ser complicada dada la complejidad de compuestos en la muestra, además de que la eficiencia de los procedimientos que se emplean para separar el fármaco de otros materiales endógenos limita la sensibilidad y la selectividad en la cuantificación. Cabe mencionar que entre la detección de fármacos y compuestos biológicamente activos, ninguno es de mayor importancia que otro y que en ambos casos se ha desatado un incremento en la publicación de literatura para la detección de analitos de diversos orígenes por CLAR.<sup>33</sup>

En el análisis de una muestra biológica es importante buscar la mayor precisión y exactitud, en donde la precisión es la cercanía de las mediciones en un mismo ensayo repetido y la exactitud es la cercanía entre el valor obtenido y el valor real. Por estas razones la preparación de la muestra, la manera en que se almacena, los procedimientos a seguir y la validación de los métodos analíticos son pasos importantes en los ensayos biológicos.<sup>33</sup>

## **5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

Se han encontrado diferentes reportes que indican que hay hemoglobinopatías presentes en México, sin embargo son pocos los documentos que proponen el uso de metodologías actualizadas para su estudio. Se requiere hacer una revisión que pueda ser de utilidad para laboratorios clínicos nacionales especializados y que describa la presencia de las hemoglobinopatías en el país, mencionando las ventajas de la aplicación de la CLAR como técnica a elegir para su análisis, ya que se encuentra incluida entre las metodologías actuales para el estudio de hemoglobinopatías; una revisión de esta índole puede orientar al laboratorio clínico en la obtención de diagnósticos más certeros para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen este grupo de patologías.

## **6. OBJETIVOS**

Realizar una descripción de la CLAR aplicada al análisis de hemoglobinopatías, tomando en cuenta la frecuencia de la patología en el territorio Mexicano.

Mencionar las características de la CLAR, mostrando sus ventajas y desventajas frente a otras técnicas

## **7. METODOLOGÍA**

Se realizó una revisión bibliográfica en libros y artículos científicos que abordan el tema del análisis de hemoglobina para la detección de hemoglobinopatías, y de aquellos que buscan la presencia de este tipo de patologías en el territorio nacional. Se realizó una búsqueda de las metodologías utilizadas para el estudio de este grupo de padecimientos, haciendo énfasis en aquellas basadas en la CLAR, haciendo hincapié en los puntos de comparación con otras técnicas utilizadas con el mismo fin.

## **5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

Se han encontrado diferentes reportes que indican que hay hemoglobinopatías presentes en México, sin embargo son pocos los documentos que proponen el uso de metodologías actualizadas para su estudio. Se requiere hacer una revisión que pueda ser de utilidad para laboratorios clínicos nacionales especializados y que describa la presencia de las hemoglobinopatías en el país, mencionando las ventajas de la aplicación de la CLAR como técnica a elegir para su análisis, ya que se encuentra incluida entre las metodologías actuales para el estudio de hemoglobinopatías; una revisión de esta índole puede orientar al laboratorio clínico en la obtención de diagnósticos más certeros para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen este grupo de patologías.

## **6. OBJETIVOS**

Realizar una descripción de la CLAR aplicada al análisis de hemoglobinopatías, tomando en cuenta la frecuencia de la patología en el territorio Mexicano.

Mencionar las características de la CLAR, mostrando sus ventajas y desventajas frente a otras técnicas

## **7. METODOLOGÍA**

Se realizó una revisión bibliográfica en libros y artículos científicos que abordan el tema del análisis de hemoglobina para la detección de hemoglobinopatías, y de aquellos que buscan la presencia de este tipo de patologías en el territorio nacional. Se realizó una búsqueda de las metodologías utilizadas para el estudio de este grupo de padecimientos, haciendo énfasis en aquellas basadas en la CLAR, haciendo hincapié en los puntos de comparación con otras técnicas utilizadas con el mismo fin.

## **5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

Se han encontrado diferentes reportes que indican que hay hemoglobinopatías presentes en México, sin embargo son pocos los documentos que proponen el uso de metodologías actualizadas para su estudio. Se requiere hacer una revisión que pueda ser de utilidad para laboratorios clínicos nacionales especializados y que describa la presencia de las hemoglobinopatías en el país, mencionando las ventajas de la aplicación de la CLAR como técnica a elegir para su análisis, ya que se encuentra incluida entre las metodologías actuales para el estudio de hemoglobinopatías; una revisión de esta índole puede orientar al laboratorio clínico en la obtención de diagnósticos más certeros para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen este grupo de patologías.

## **6. OBJETIVOS**

Realizar una descripción de la CLAR aplicada al análisis de hemoglobinopatías, tomando en cuenta la frecuencia de la patología en el territorio Mexicano.

Mencionar las características de la CLAR, mostrando sus ventajas y desventajas frente a otras técnicas

## **7. METODOLOGÍA**

Se realizó una revisión bibliográfica en libros y artículos científicos que abordan el tema del análisis de hemoglobina para la detección de hemoglobinopatías, y de aquellos que buscan la presencia de este tipo de patologías en el territorio nacional. Se realizó una búsqueda de las metodologías utilizadas para el estudio de este grupo de padecimientos, haciendo énfasis en aquellas basadas en la CLAR, haciendo hincapié en los puntos de comparación con otras técnicas utilizadas con el mismo fin.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Presencia de hemoglobinopatías en México.

#### *Prevalencia mundial de las variantes de hemoglobina.*

La prevalencia de las hemoglobinopatías es especialmente elevada en determinadas razas y su distribución geográfica es mundial, con énfasis de incidencia en áreas que son ó han sido afectadas por *Plasmodium spp.*, protozoarios cuyas especies son causantes de paludismo o malaria. Este hecho pone de manifiesto que estos trastornos genéticos han ejercido una presión genética positiva frente a dichas enfermedades en las poblaciones afectadas. Las hemoglobinopatías más ampliamente distribuidas son la Hb S, Hb C, Hb E y Hb D-Punjab, todas ellas presentes en individuos de raza negra hasta en un 19%, en especial Hb S y Hb C. La Hb E es muy característica en el Sudeste asiático y la Hb D-Punjab de Irán e India. En el Sureste de Asia y el suroeste de China, existe una amplia variedad de talasemias. En Hong Kong predomina la Hb H.<sup>2, 38, 39, 40</sup>

Se considera que las talasemias son uno de los desordenes genéticos más comunes globalmente, tan es así que se calcula que cerca del 3% de la población mundial (180 millones de personas) son portadores de los genes de beta talasemia.<sup>10</sup>

En América también se han realizado estudios sobre hemoglobinopatías, demostrando que estas han llegado a constituir un problema de salud pública. Un estudio encabezado por Arends<sup>39</sup> en el año 2007 demuestra la importancia clínica, genética y antropológica de las hemoglobinopatías en Venezuela, además de reportar la frecuencia de ciertas estructuras génicas; en su estudio realizado a 80,400 individuos que reportaron algún tipo de anemia, según el Laboratorio de Investigación de Hemoglobinas Anormales del Hospital Universitario de Caracas, el 9% de la población estudiada presentó alguna hemoglobinopatía, y el 57% de estas resultó ser el estado portador de Hb S. Entre otras alteraciones mencionadas se encontraron la Hb C y Hb D, así como beta talasemias asociadas y no asociadas con Hb S y Hb C.<sup>39, 41</sup>

#### *Presencia de Hemoglobinopatías en México*

En 1980 se realizó un estudio en el IMSS en el Noroeste de México, en el cual se investigaron las muestras sanguíneas de 1,000 individuos con la finalidad de detectar anomalías en la hemoglobina. Se utilizaron técnicas electroforéticas e inducción de drepanocitos, encontrando dos heterocigotos de  $\beta$  talasemias (0.2%), cinco heterocigotos de Hb S (0.5%) y tres variantes de Hb tentativamente nuevas (0.3%). Con este estudio se obtuvo una idea general de la presencia de variantes de Hb en la población y dos años más tarde se estudiaron 9,929 individuos más en la misma población encontrando frecuencias bajas de patologías de la Hb de hasta el 0.45%. Solamente se identificaron 8 de 11 variantes detectadas: tres Hb Riyadh, una Hb J Georgia, una Hb Fannin-Lubbock, una Hb Chiapas y



dos Hb Tarrant. Los resultados no sugirieron que las Hb anormales constituyeran un problema de salud regional en la zona, sino que reflejaron una amplia heterogeneidad genética.<sup>42,43</sup>

Hacia el año de 1988, en Guadalajara, el IMSS detectó 28 hemoglobinopatías en 131 pacientes con anemia hemolítica, de dichas hemoglobinopatías 12 fueron estructurales y 16 talasémicas. Se consideró la posibilidad de un origen nativo de algunos de los genotipos talasémicos encontrados.<sup>44</sup>

La prevalencia de  $\beta$  talasemia en México no es baja, datos de 1990 sugieren que los genes de este padecimiento son autóctonos en Tamiahua, Veracruz, en donde la prevalencia del gen fue del 15% en el grupo estudiado, el mayor porcentaje de una población dentro de la república, y dentro de este porcentaje, el 6% también demostró tener alelos de anemia falciforme. Tras realizar este estudio, Laboratorios Clínicos de Puebla consideró la posibilidad de que el gen no es derivado del mestizaje con Negros Africanos, sino directamente de los Europeos, e inclusive, a decir por la prevalencia tan alta de la beta talasemia en poblaciones pertenecientes a grupos mayas, llegaron a suponer la posibilidad de que el gen haya estado presente en nuestro territorio desde antes de que los españoles arribaran en México.<sup>45</sup> Sin embargo, el IMSS y la Secretaría de Salud del Estado de Guerrero determinaron el origen africano de la talasemia  $\beta$  tras un análisis de los genes  $\beta^S$  y  $\beta^A$  en poblaciones de la región de costa chica que comprende a los estados de Guerrero y Oaxaca; se encontró una presencia del 12.8% del alelo de la anemia falciforme, lo cual puede considerarse como un problema de salud pública. El análisis genético de los genes de talasemia beta mostró que existe una gran contribución del mestizaje con la raza negra africana a esta patología, pero también, aunque en menor grado, existió un mestizaje marcado con poblaciones de Australia, Benin y Bantú.<sup>46</sup>

Durante un estudio de más de 3,000 individuos en poblaciones seleccionadas de México se encontró que las variantes de Hb están virtualmente ausentes en indígenas mexicanos y que la esporádica presencia de Hb S en ellos se debe a su mestizaje con africanos durante la colonia española. En nativos se encontraron dos nuevas variantes, la Hb México y la Hb Chiapas. En Guadalajara y Puebla se reportaron casos de variantes de Hb, identificadas como Hb C, Hb SC, Hb Riyadh, Hb Baltimore, Hb Tarrant, Hb Fannin-Lubbock y Hb Mexico; en casos aislados, principalmente en pacientes con anemia hemolítica, se observan casos de Hb I-Philadelphia, Hb G-San José y Hb D-Los Angeles.<sup>47</sup> Por otra parte, se demostró con el estudio de 1,639 pacientes con posibles variantes de Hb entre 1987 y 2000, que las anormalidades de la Hb más frecuentes son las talasemias, estando presentes en el 15% de la población estudiada, seguidas por la Hb S presente en el 6%. De los 429 individuos que mostraron anormalidades en los resultados, 319 fueron diagnosticados con talasemia  $\beta$  tras encontrarse niveles elevados de Hb A<sup>48</sup>. También se detectaron pacientes

con Hb H, Persistencia Hereditaria de Hb F, y sus combinaciones con Hb S y con Hb S y talasemia  $\beta$  simultáneamente; además de Hb E con talasemia  $\beta$ .<sup>47</sup>

En cuanto a la talasemia, se buscó la presencia de talasemias  $\alpha$  y  $\beta$  en 106 individuos con hipocromía y/o microcitosis sin deficiencia de hierro con o sin anemia. Resultaron 48 casos con talasemias, de los que 37 fueron talasemias  $\beta$  y 11 talasemias  $\alpha$ , mientras que en los 58 casos restantes no se estableció un diagnóstico definitivo. En la caracterización molecular se encontró que las mutaciones son heterogéneas en las poblaciones estudiadas. Por otro lado, el centro de investigación biomédica de occidente del IMSS busca en pacientes mexicanos el alelo SEA, común en individuos asiáticos que padecen de la presencia de Hb H, mediante secuenciación de ADN, encontrando que esta mutación también está presente en la población mexicana con HbH. También, durante el estudio de otros alelos se encontró que ciertos alelos anormales de la cadena  $\alpha$ , los alelos  $-\alpha(3.7)$  y  $\alpha\alpha$  (anti3.7), tienen una incidencia del 19% y del 2% en las poblaciones estudiadas, resaltando la necesidad de estudiar sistemáticamente las mutaciones en los genes de las globinas  $\alpha$  en cada caso de hemoglobinopatías presentes en todas las poblaciones mexicanas.<sup>10, 46, 49, 50</sup>

En 2008 se publicaron los resultados de un estudio de la frecuencia de Hb S en el cual se observa que de cinco poblaciones indígenas, solo en dos, coras y chontales, se observaron portadores de hemoglobinopatías en 1 y 2 % respectivamente; del mismo modo los indígenas totonacos pobladores de las regiones norte de Puebla y Veracruz en los que se han informado proporciones del 2 y 1% en ese orden. En relación con los mestizos de la costa de Veracruz, la frecuencia de Hb S, de 14%, es un poco mayor de lo comunicado en ambas costas de México, lo que se explica por el mestizaje indígena – caucásico – africano en grado variable con africanos que llegaron a México en la época de la Colonia. La tabla Inferior muestra la proporción de ancestros indígena – caucásico – africano en diferentes poblaciones mexicanas.<sup>51</sup>

TABLA 2. Cálculo de la mezcla trihíbrida de ancestros en México. Tomado de Peñaloza-Espinosa, 2008.<sup>51</sup>

Ciudad	Estado	n	Frecuencia génica		
			Negros	Indígenas	Blancos
Tlaxcala	Tlaxcala	138	0.079	0.762	0.159
Saltillo (La Minita)	Coahuila	123	0.152	0.610	0.238
Puebla	Puebla	393	0.107	0.563	0.330
México	DF	510	0.029	0.562	0.409
Saltillo (Chamizal)	Coahuila	104	0.042	0.556	0.402
Paraiso	Campeche	161	0.217	0.474	0.309
El Carmen	Campeche	109	0.284	0.432	0.284
Veracruz	Veracruz	148	0.256	0.394	0.350
Saladero	Veracruz	119	0.302	0.386	0.312
Tamiahua	Veracruz	109	0.405	0.307	0.288
México*	DF	474	0.014	0.276	0.708

En septiembre de 2009, Cobián<sup>52</sup> y sus colaboradores realizaron, por parte del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, del IMSS, un estudio en los estados de Jalisco, Colima, Nayarit y Michoacán. Se tomó una población compuesta de 1 513 individuos mestizos nacidos en las regiones de las costas del Océano Pacífico de los estados mencionados. La frecuencia encontrada de hemoglobinopatías fue de 1.258% de las cuales 0.462% fueron portadores de Hb S, 0.066% presentaron la anomalía Hb S, 0.066% fue heterocigoto a Hb C, 0.066% Hb Fannin-Lubbock, y 0.066% Hb Colima. La talasemia alfa representó el 0.066%, mientras que la beta el 0.400%. La Persistencia Hereditaria de Hb F se encontró en un 0.066% de la población, pero en estado heterocigoto, presentando 8.7% de Hb F con respecto a la Hb total. La mayor frecuencia de Hemoglobinopatías fue la presentada por Jalisco con el 3.015%, mientras que en Nayarit no se encontró ninguna anomalía. Por otro lado, la población de Colima presentó 6 diferentes tipos de hemoglobinopatías, mostrando gran heterogeneidad, con predominio de Hb S y talasemias beta.

Peñaloza-Espinoza<sup>51</sup> menciona la importancia de analizar la presencia de hemoglobinopatías en los recién nacidos de las regiones en que se ha detectado su prevalencia, de manera que se pueda instituir un tratamiento oportuno y adecuado y prevenir así complicaciones que pongan en riesgo la salud e incluso la vida de los pacientes. Las recomendaciones emitidas en este estudio se ajustan a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud acerca de la anemia drepanocítica instando a “elaborar, aplicar y reforzar de manera sistemática, equitativa y eficaz, programas nacionales integrados y amplios de prevención y gestión de la anemia drepanocítica que incluyan elementos de vigilancia, difusión de información, sensibilización, asesoramiento y detección de la enfermedad a fin de que los pacientes reciban tratamiento inmediato y los padres tengan la información necesaria para mantener la salud”.<sup>51,53</sup>

## 8.2 Análisis de hemoglobinopatías por CLAR

### *Papel de la CLAR en el análisis de Hemoglobinopatías.*

En los últimos años, se han desarrollado muchos instrumentos para el monitoreo de variantes de hemoglobina y de talasemias, pero en costo y efectividad, ninguno basado en electroforesis capilar ha superado a aquellos que se basan en la técnica de CLAR, que puede presentar resultados muy precisos de 3 a 4 minutos.<sup>54,55</sup>

Se han desarrollado sistemas automatizados de CLAR enfocados a la detección de hemoglobinopatías, incluyendo el Variant de Bio-Rad, el ultra2 Hb Variant Assay de Primus Corporation<sup>20</sup>, el Beta-Thal HbA2 Quick Column Kit de Helena Laboratories<sup>10</sup> ó el Haemoglobin System PV de Kronton.<sup>14,20</sup>

Con CLAR pueden llevarse a cabo desde el aislamiento de proteínas hasta el análisis de aminoácidos, ya que esta permite separaciones efectivas y rápidas de microcantidades de muestras. La CLAR ha mejorado la eficiencia en la separación, la velocidad de análisis y el nivel de detección de las proteínas, fragmentos de péptidos y aminoácidos, de manera que la caracterización completa de una variante de Hb que requiera de únicamente un equipamiento limitado, puede ahora llevarse a cabo en un número cada vez mayor de laboratorios.<sup>54</sup>

Algunas variantes son electroforéticamente silenciosas y no se espera que el péptido anormal sea diferente del normal en un sistema de separación basado en la carga de las moléculas, sin embargo, la sustitución de un aminoácido introduce en muchos casos un cambio de polaridad. El péptido modificado es revelado entonces por CLAR FR, esto ocurre por ejemplo para las hemoglobinas Hb Saint Jacques y Hb San Diego.<sup>54</sup>

La caracterización del sitio específico del aminoácido modificado, continúa siendo una herramienta invaluable en la comprensión de la interacción y función de las proteínas, y aún cuando la variante natural no se encuentre disponible, pueden crearse moléculas modelo mediante técnicas de mutagénesis dirigida.<sup>54</sup>

En algunos casos, es posible determinar cuáles péptidos se comportan anormalmente mediante el análisis de un digerido triptico de la mezcla no fraccionada que contenga todas las cadenas, tanto normales como anormales. Un único análisis cromatográfico basta para aislar el péptido anormal. Desafortunadamente, esta no es una regla constante, en muchos casos, los análisis de mayor exactitud deben llevarse a cabo en digeridos de cadenas aisladas y aminoetiladas.<sup>54</sup>

### *Análisis por CLAR*

## A. Muestra.

Se recolecta sangre por punción venosa en tubos con EDTA, como sugieren Bravo Urquiola<sup>41</sup>, Head<sup>56</sup>, Mais<sup>20</sup>, Peñaloza Espinoza<sup>51</sup> y Mandal<sup>57</sup>, entre otros,<sup>24,58</sup> También puede utilizarse Heparina como anticoagulante de acuerdo con Baudin.<sup>54</sup>

Mario N<sup>58</sup>, Riou<sup>59</sup>, Mais<sup>20</sup>, De Caterina<sup>60</sup> y Wild<sup>61</sup> lisan la sangre total directamente utilizando 1 mL de solución para hemolisis de cianuro de potasio 5 mM para cada 20 a 30 mL de sangre, llegando a una dilución final del hemolisado de 4 g/L como muestra para CLAR IC. Mario<sup>54</sup> agrega además, una centrifugación del hemolisado por 3 minutos a 12 000 g, utilizando el sobrenadante para CLAR IC.

Pocos autores reportan una metodología específica para la separación del paquete celular antes de la lisis, y quienes la reportan varían en su procedimiento. Así, Mandal logra la separación centrifugando a 805 g por 10 minutos a 25°C<sup>57</sup>; mientras que Baudín lo hace a 2500 g durante 15 minutos a 4°C<sup>54</sup>. Cualquiera de las dos condiciones de centrifugado será efectiva. Después de la separación del paquete celular, los eritrocitos se lavan tres veces con una solución de cloruro de sodio 0.9%.<sup>54, 57</sup> Los eritrocitos lavados se lisan con 8 volúmenes de agua destilada helada.<sup>54,57</sup> Esta solución puede utilizarse para CLAR IC.<sup>54,58</sup> Para CLAR acoplada a EM, el hemolisado se centrifuga a 12 000 g por 3 a 10 minutos, se descarta el precipitado y se hace una dilución 1:100 con agua destilada.<sup>54, 58, 57</sup> Wild hace una dilución de 1:50 para utilizar como muestra para la EM<sup>61</sup>.

De acuerdo con Ferranti y Baudin, para CLAR FR, las globinas se separan por precipitación del hemolisado con ácido clorhídrico al 1% en acetona a -20°C y se realizan 3 lavados con acetona.<sup>54, 62</sup>

Para el mapa tríptico por CLAR FR acoplada a EM, Ferranti<sup>62</sup> lleva a cabo una hidrólisis tríptica en regulador de carbonato de amonio pH 8.5, incubando a 37°C por cuatro horas con una relación de 1g de tripsina por cada 50g de sustrato

Una opción de almacenamiento a largo plazo consiste en disolver el precipitado en ácido acético al 10%, liofilizarlo y almacenar en refrigeración a 4°C, siendo estable por varias semanas.<sup>54,64, 63</sup>

Comercialmente existen controles normales y patológicos para hemoglobinas, entre ellos destaca Lyphochek Hemoglobin A2 Bi-Level de Bio-Rad. El almacenamiento y uso de los controles depende de las instrucciones que proporcione el fabricante. Los controles deben incluirse en cada serie de análisis.<sup>54,58</sup>

## B. Análisis por fase reversa.

La mayor aplicación de la CLAR FR en la identificación de variantes de Hb se encuentra en la separación y cuantificación de las cadenas de globina, lo cual a menudo ayuda en el diagnóstico presuntivo de variantes poco frecuentes.<sup>54,64,65</sup>

Baudin y Ferranti concuerdan en que las columnas de 25 x 0.46 cm, con fase estacionaria C8 y de poro de 300 Å son apropiadas para la separación.<sup>54,64</sup>

El volumen de inyección que sugieren los mismos autores es de 500 µL de muestra. La fase móvil que utiliza Baudin<sup>54</sup> consiste en un gradiente lineal de acetonitrilo de un regulador inicial A: acetonitrilo, metanol y agua 36:10:54; a un regulador final B: acetonitrilo, metanol, agua 50:5:45. Por otro lado, Ferranti<sup>64</sup> utiliza un regulador inicial A: acetonitrilo, agua 20:80 para pasar a un regulador final B: acetonitrilo, agua 60:40. En ambos casos se utiliza un Flujo de 1 mL/min y se recolectan las fracciones monitoreando las absorbancias a 280 nm.<sup>54, 64</sup>

### C. Análisis por intercambio catiónico.

En la actualidad, la CLAR IC se ha convertido en el método de elección para la cuantificación de Hb A2, Hb F y otros subtipos resultando ser un método sensible, específico y reproducible, llegando a ser una alternativa útil para el estudio de hemoglobinas de significancia clínica, incluso en el monitoreo neonatal.<sup>41,13</sup>

Entre las columnas recomendadas están: Poly Cat A, columna de 100 x 4 mm con empaque de sílica-ácido poliaspártico con 5 µm de diámetro y poro de 100nm<sup>58</sup>, ó de 35 x 4.6 mm, sílica de 5 µm de diámetro y poro de 1000 Å<sup>66</sup>; la columna analítica de intercambio catiónico ProPac SCX-10, de 4x250 mm, producida por Dionex<sup>67</sup>; y la columna Mono Q, de Pharmacia<sup>60</sup>.

Bravo Urquiola logra la elusión y separación de los diferentes componentes utilizando dos tampones fosfato de sodio, los cuales forman un gradiente de 4 g/L a 14 g/L 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.<sup>41</sup> De la Calle utiliza un regulador de fosfatos 0.01M, variando la fuerza iónica con la adición de cloruro de sodio de 0 a 10.5 M; además incluye la adición de azida de sodio para eliminar la presencia de meta Hb, la cual, asegura, frecuentemente está presente en los estándares comerciales, generando disturbios en la separación de las isoformas de la Hb.<sup>67</sup> El regulador utilizado por Mario es de Bis-Tris 20mM pH 8.0 al cual agrega cianuro de potasio y el gradiente lo hace con citrato de sodio de 25 a 75 mM.<sup>58</sup> De manera similar, De Catherina utiliza regulador Tris 50 mM, pero el gradiente consiste en incrementar

linealmente el pH de 6.5 a 8.5<sup>60</sup>. Un flujo de 1.5 mL/min es adecuado<sup>58</sup> y la detección se hace a 415 ó 690 nm<sup>20,59</sup>.

Los equipos comerciales Bio-Rad VARIANT y Primus Resolution, utilizan columnas de intercambio catiónico para la detección de hemoglobinopatías. Por un lado, el método de Bio-Rad utiliza un gradiente escalonado de 2 mL/min, creado por 2 reguladores de fosfatos, con diferentes valores de pH y de fuerza iónica<sup>20, 59</sup> con detección a 415 y 690 nm. En cuanto al sistema de Primus, este usa un gradiente de elución conformado por 2 fases móviles de Bis-Tris y cianuro de potasio con diferentes valores de pH y de fuerza iónica<sup>20, 24,65</sup>.

Riou asegura que el sistema de Bio-Rad presenta ligeras diferencias en los tiempos de elución entre una columna y otra, demostrando, además, que el tiempo de elución varía según la concentración de la muestra. Riou encuentra que la calibración del sistema tiene mayor precisión utilizando Hb A2 como referencia, que siguiendo la metodología del fabricante.<sup>59</sup>

La CLAR IC permite analizar y cuantificar simultáneamente las Hb A, Hb A2 y Hb F, así como alguna variante de hemoglobina, en una sola preparación, lo cual se traduce en un menor tiempo y costo. También permite el estudio de numerosas muestras en un corto período de tiempo manteniendo un alto nivel de reproducibilidad y precisión. Es el único método que permite diferenciar a la Hb A2 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. Este hecho representa una gran ventaja, especialmente en poblaciones mestizas donde la Hb C tiene una alta incidencia.<sup>41,68</sup>

#### D. Mapeo de Péptidos por CLAR.

El mapeo de los péptidos de las hemoglobinas que realiza Baudin<sup>54</sup>, consiste en digerir con tripsina las cadenas purificadas. 1 mg de globina se digiere en un medio de bicarbonato de sodio 25mM a pH 8.8 con 0.01mg de tripsina. Los péptidos solubles se separan por CLAR con un gradiente de acetonitrilo y un regulador de acetato de amonio 10 mM, pH 6.2. Las fracciones se colectan supervisando los picos con una detección a 214 nm.

Para el análisis de la composición de aminoácidos, los péptidos se hidrolizan al vacío por 24 horas a 110°C en ácido clorhídrico 6N. Las muestras se secan con una corriente de aire y las trazas de ácido se remueven lavando con acetonitrilo, trietil amina, agua 2:1:2. Los aminoácidos obtenidos se transforman en feniltiocarbamil derivados, que son más cromóforos e hidrofóbicos que las moléculas iniciales; la derivatización se realiza agregando una mezcla de acetonitrilo, trietilamina, agua, fenilisotiocianato 7.5:1:1:0.5

durante 10 minutos a temperatura ambiente, después de los cuales se secan las muestras al vacío y se mantienen a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El análisis de los derivados se realiza en una columna C18 con poro de  $5\ \mu\text{m}$  a  $51^{\circ}\text{C}$ , utilizando como fase móvil un regulador de acetato de sodio 140 mM a pH 6.4 con trietilamina al 0.05% que gradualmente contendrá acetonitrilo hasta llegar a una proporción 40:60.<sup>54</sup>

El mapa triptico por CLAR FR acoplada a EM, según la metodología utilizada por Ferranti, se logra inyectando una muestra de 100 pg de la muestra obtenida con hidrólisis triptica, en un sistema que utiliza una columna C18, de 250 x 4.6 mm, equilibrada con acetonitrilo 5% y ácido trifluoroacético 0.1 % en agua, generando un gradiente lineal desde los 5 minutos hasta llegar a una concentración de acetonitrilo de 40% a los 90 minutos. El Flujo utilizado es de 1 mL/min, monitoreándolo a 206 nm y por bombardeo atómico rápido / EM. Los picos se identifican mediante el análisis de los pesos moleculares en relación a los esperados del digerido triptico de las cadenas normales o con patologías ya conocidas.<sup>62</sup>

#### E. Análisis Molecular y CLAR

Un grupo de investigadores italianos encabezado por Valentina Guida<sup>69</sup>, describe en 2004 un método para el análisis molecular de mutaciones no delecionales de la Hb basado en CLAR.

La muestra que se utiliza es ADN genómico proveniente de leucocitos de sangre periférica, solubilizado en TRIS 10 mM – EDTA 1 mM pH 8, que se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ellos contaron con 4 *primers* diseñados para amplificar las regiones de los genes de globina incluyendo las regiones 5' y 3' no codificantes. Tras realizar la amplificación por PCR, realizan un análisis cromatográfico a los productos de esta por fase reversa con un gradiente formado con los reguladores A: Acetato de trietilamonio 0.1 mM, pH 7.0; y B: acetato de trietilamonio 0.1 mM, Acetonitrilo 25%, pH 7.0. El flujo es 1.5 mL/min. Cada fracción con una elución anormal se secuencía con un analizador genético, ellos utilizan el de Applied Biosystems.<sup>69</sup>

La CLAR resulta ser un método de monitoreo sensible, confiable y específico para la detección rápida de mutaciones de nucleótidos. El corto tiempo de análisis, de 2.5 min por muestra, ofrece la posibilidad de un análisis semiautomatizado de hasta 96 muestras en 12 horas, lo cual, aunado a sus bajos costos de análisis por muestra, hacen a este método atractivo para realizarse en monitoreos rápidos a gran escala de mutaciones frecuentes o raras.<sup>69</sup>



## 9. DISCUSIÓN

En los diferentes estudios que se han realizado para conocer la presencia de desórdenes de la hemoglobina en territorio mexicano, se ha hecho mención de talasemias alfa y beta, Hb S, Hb Riyadh, Hb J Georgia, Hb Fannin-Lubbock, Hb Tarrant, Hb C, Hb H, Hb SC, Hb Baltimore, Hb I-Philadelphia, Hb G-San José, Hb D-Los Angeles, persistencia hereditaria de Hb F, y sus combinaciones con Hb S y con Hb S y talasemia  $\beta$  simultáneamente; además de Hb E con talasemia  $\beta$ . Cabe mencionar las variantes encontradas en poblaciones indígenas, la Hb México, Hb Colima y la Hb Chiapas.

La incidencia de hemoglobinopatías es variable según la zona y heterogeneidad genética, principalmente como producto del mestizaje posterior a la conquista española; es así como se han encontrado frecuencias génicas de hasta 40.5% de genes de raza negra en la población de Tamiahua, Veracruz; se ha mencionado también que la raza negra ha sido ampliamente afectada por paludismo y malaria y qué, por ende, han presentado una enfática ocurrencia de variantes estructurales. Se han arrojado cifras que indican que la frecuencia de hemoglobinopatías en diferentes estados van desde el 0% al 2% ó hasta el 3% de las poblaciones estudiadas. En Tamiahua, Veracruz, se llegó a la cifra de 15% en cuanto a la presencia del gen de talasemia beta.

La metodología utilizada por las diferentes instituciones que han realizado esfuerzos para detectar hemoglobinopatías en pacientes con síndromes hemolíticos se ha basado en técnicas electroforéticas de análisis proteico y no siempre consideran las ventajas que proporciona el uso de las modalidades de la CLAR para esta tarea.

Como ya fue visto, los métodos proteicos para detectar variantes de Hb son las técnicas electroforéticas, el inmunoensayo y la CLAR. Posteriormente a la detección, se pasa a la caracterización, en donde podemos mencionar a las mismas técnicas, incluyendo a las de Análisis de Ácidos Nucléicos.

El inmunoensayo podría resultar de utilidad en poblaciones mexicanas con alta incidencia de Hb S ó Hb C, con la limitante de que, por las fallas intermitentes que se han llegado a encontrar, el método carece de confiabilidad diagnóstica y tendría que estar avalado completamente por hallazgos clínicos, y confirmado por otra técnica analítica.

Las técnicas electroforéticas cuentan con presentaciones comerciales enfocadas a la determinación de variantes de hemoglobina. Aunque todas las técnicas derivadas de la electroforesis se basan en la migración diferencial de las hemoglobinas por su diferencia de cargas y su cuantificación por densitometría; el EIE logra aumentar la resolución de la separación, de manera que se hace más fácil distinguir a la Hb C de la Hb E; y a las Hb O y Hb S de la Hb D y la Hb G.

Como ya se ha visto, en la actualidad los métodos de elección para detectar y cuantificar variantes de Hb, están basados en la CLAR IC, encontrándola como una técnica sensible, específica y reproducible; capaz de cuantificar las Hb A, Hb A<sub>2</sub> y Hb F, y otras variantes en una sola muestra. Tiene la gran ventaja de ser el único método que permite diferenciar a la Hb A<sub>2</sub> de la Hb C, mientras que con electroforesis alcalina éstas migran en la misma posición. Es completamente aplicable en poblaciones mestizas donde la Hb C tiene una alta incidencia.

El EIEC es una técnica electroforética de alta sensibilidad que compite con la CLAR IC, con las ventajas de requerir menor cantidad de muestra, y de que los capilares como medio de separación son menos caros que una columna cromatográfica. Pero pese a las mejoras en la resolución, existen algunas variantes electroforéticamente silenciosas cuya sustitución de aminoácidos introduce un cambio de polaridad detectable por CLAR FR, un ejemplo de este caso son las hemoglobinas Hb Saint Jacques y Hb San Diego.

Es cierto que las globinas obtenidas por precipitación de hemolisados en acetona fría pueden analizarse directamente por EIEC sin tratamiento previo; la velocidad y resolución de este método permiten una diferenciación rápida entre hemoglobinas de cargas semejantes. También se puede realizar el mapeo del digerido de cada globina con tripsina, obteniendo una caracterización más completa de la variante al comparar el mapa con el de una hemoglobina normal. Por otro lado, el acoplamiento de los datos electroforéticos con el análisis de los digeridos enzimáticos por EM y mapeo por bombardeo atómico rápido, hace posible identificar la variación de los aminoácidos y caracterizar la Hb que se está analizando.

Sin embargo, a favor de la CLAR encontramos su amplia aplicación en la identificación de variantes al separar y cuantificar las cadenas de globina, ayudando en el diagnóstico presuntivo de Hb poco frecuentes; y no solo en el diagnóstico presuntivo, sino también en la confirmación al poder realizar mapeos de péptidos de los digeridos de tripsina, mejorando los resultados al utilizar una detección por EM, o simplemente derivando los péptidos hidrolizados transformándolos en derivados de feniltiocarbamilos, que son más cromóforos.

Una ventaja más de la CLAR es que también encuentra aplicación en el campo del análisis molecular de mutaciones no delecionales de la Hb. Para ello parte de una muestra de ADN genómico proveniente de leucocitos de sangre periférica, amplificada por PCR utilizando algunos primers diseñados para amplificar las regiones en que se encuentran los genes de la globina. Tras la amplificación se realiza un análisis cromatográfico por FR y se recolectan las fracciones con elución anormal para ser secuenciadas con un analizador genético.

La CLAR resulta ser un método de monitoreo sensible, confiable y específico para la detección rápida de mutaciones de nucleótidos; pero también ha mejorado la eficiencia en la separación, la velocidad de análisis y el nivel de detección de las proteínas, fragmentos de péptidos y aminoácidos, de manera que la caracterización completa de una variante de Hb que requiera de únicamente un equipamiento limitado, puede ahora llevarse a cabo en un número cada vez mayor de laboratorios. Se ha reportado el análisis de hasta 96 muestras en 12 horas, lo que, en conjunto con sus bajos costos de análisis, hacen de la CLAR un método atractivo para monitoreos rápidos a gran escala de mutaciones frecuentes o raras.

Algunos investigadores citados consideran que de los instrumentos dedicados al monitoreo de variantes de hemoglobina y de talasemias desarrollados actualmente, por costo y efectividad, ninguno basado en electroforesis capilar ha superado a aquellos que se basan en la CLAR.

Se ha sugerido analizar la presencia de hemoglobinopatías en los recién nacidos en aquellos estados que han presentado algún porcentaje de incidencia de estas para poder instituir un tratamiento oportuno y adecuado, y prevenir así complicaciones que pongan en riesgo la salud, e incluso la vida de los pacientes. Para estos fines, la posibilidad de incluir a la CLAR IC promete una alta cantidad de análisis en tiempos cortos y costos bajos, además de que permite el análisis posterior por CLAR FR acoplada a EM para caracterizar a la molécula por mapeo del digerido tríplico, o bien para la secuenciación de nucleótidos en un analizador genético, según sea necesario.

## 10. CONCLUSIÓN

En México encontramos presentes hemoglobinopatías tanto talasémicas como estructurales en proporciones de la población que llegan hasta el 15% según el estado de la República, siendo Veracruz el estado en que se ha reportado la mayor frecuencia de este tipo de desórdenes.

Las hemoglobinopatías que se han encontrado en territorio nacional y que han sido mencionadas en los estudios citados son:

- Talasemias alfa
- Talasemias beta
- Hb Baltimore
- Hb C
- Hb Chiapas
- Hb Colima
- Hb D-Los Angeles
- Hb E
- Hb G-San José
- Hb H
- Hb I-Philadelphia
- Hb Fannin-Lubbock
- Hb J Georgia
- Hb México
- Hb Riyadh
- Hb S
- Hb SC
- Hb Tarrant
- Persistencia hereditaria de Hb F

La mayoría de los estudios a nivel nacional han optado por el uso de técnicas electroforéticas para el análisis de la hemoglobina, sin embargo esta estrategia presenta desventajas al enfrentarse con la CLAR, entre ellas que esta última es capaz de diferenciar variantes de Hb estructuralmente silenciosas, ó pares de Hb que tengan un corrimiento electroforético similar, como es el caso de las Hb C, Hb E, Hb O, Hb S, Hb D y Hb G., todas presentes en el país.

Aunque la CLAR y el EIEC tienen aplicaciones muy similares, presentan ciertas diferencias; la gran ventaja del EIEC es el costo de los capilares, comparados con el de una columna cromatográfica de IC, considerando que la CLAR IC compite con el EIEC en cuanto a su manera de adquirir muestras, de desplegar resultados, en tiempos de análisis y en sensibilidades. El EIEC también compite con la CLAR FR en cuanto a que permite el análisis de digeridos trópticos para el mapeo de péptidos; es cierto que el EIEC requiere menor cantidad de tratamientos en la muestra, y que puede acoplarse a EM, pero el tiempo de análisis comparado con CLAR FR es mayor y la resolución menor.

El inmunoensayo podría resultar de utilidad únicamente en situaciones en que se buscara la presencia o ausencia de una hemoglobinopatía en particular en una población, pero sus resultados no son confiables y los positivos deben confirmarse por otra técnica, de manera que no compiten con la CLAR.

La electroforesis simple carece de sensibilidad para diferenciar variantes de Hb que no tengan un corrimiento notorio comparadas entre si o con las cadenas normales. El tiempo de preparación y de análisis es largo, así que tampoco es apta para compararse con las modalidades de la CLAR.

La CLAR supone ser la mejor técnica para el monitoreo presuntivo y la caracterización final de hemoglobinopatías en territorio nacional por costos, efectividad y tiempos de análisis.

## 11. REFERENCIAS

1. McKenzie SB. Hematología clínica. México DF: El manual moderno; 1991.
2. Sans-Sabrafen J, Besses RC, Vives JLC. Hematología Clínica. 4 ed. Madrid: Harcourt; 2001.
3. [fotografía en línea]. Disponible en:  
<http://images.encarta.msn.com/xrefmedia/sharemed/targets/images/pho/t012/T012342B.jpg>
4. [fotografía en línea]. Disponible en:  
[http://www.argenbio.org/adc/uploads/imagenes\\_doc/composicion\\_%20delas\\_%20celulas/hemoglobina.JPG](http://www.argenbio.org/adc/uploads/imagenes_doc/composicion_%20delas_%20celulas/hemoglobina.JPG)
5. [ilustración en línea]. Disponible en: <http://www.aw-bc.com/mathews/GH/HEME.GIF>
6. Yu X, Kong Y, Dore LC, Abdulmalik O, Katein AM, Zhou S, *et al.* An erythroid chaperone that facilitates folding of  $\alpha$ -globin subunits for hemoglobin synthesis. *J Clin Invest* 2007 Jul;117(7):1856-65.
7. Gooding KM, Regnier FE. HPLC of biological macromolecules. 2 ed. New York: Marcel Dekker Inc; 2001.
8. Zamaro PJ. Contribution to the study of molecular defects of hemoglobin in the Brazilian population. *Genet Mol Res* 2008 Feb 1;7(1):85-6.
9. Imai K, Tientadakul P, Opartkiattikul N, Luenee P, Winichagoon P, Svasti J, Fucharoen S. Detection of haemoglobin variants and inference of their functional properties using complete oxygen dissociation curve measurements. *Br J Haematol* 2001 Feb;112(2):483-7.
10. Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J, Jorge S, Kimura E, Ferreira-Costa F, Sonati Mde F, Ruiz-Reyes G. Molecular characterization of alpha-thalassemia in the Mexican population. *Rev Invest Clin* 2006 May-Jun;58(3):234-6.
11. Traeger-Synodinos J, Old JM, Petrou M, Galanello R. Best practice guidelines for carrier identification and prenatal diagnosis of haemoglobinopathies. Manchester: European Molecular Genetics Quality Network workshop; 2002.
12. Kutlar F, Titus H.J. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. *Hemoglobin* 2007;31(2):243-50.
13. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem* 2000 Aug;46(8B):1284-90.
14. The British Committee for Standards in Haematology (BCSH). Guidelines on the laboratory Bournazos SN, Tserga A, Patrinos GP, Papadakis MN. A versatile denaturing HPLC approach for human beta-globin gene mutation screening. *Am J Hematol* 2007 Feb;82(2):168-70.
15. Jacob HS, Winterhalter KH. The role of hemoglobin heme loss in Heinz body formation: studies with a partially heme-deficient hemoglobin and with genetically unstable hemoglobins. *J Clin Invest* 1970 Nov;49(11):2008-16.

16. Lubin BH, Witkowska HE, Kleman K. Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. *Clin Biochem* 1991 Aug;24(4):363-74.
17. Mohanty D, Mukherjee MB, Colah RB, Wadia M, Ghosh K, Chottray GP, *et al.* Iron deficiency anaemia in sickle cell disorders in India. *Indian J Med Res* 2008 Apr;127(4):366-9.
18. [fotografía en línea]. Disponible en: [http://www.rsc.org/images/b613381a-for-TRIDION-300\\_tcm18-74963.jpg](http://www.rsc.org/images/b613381a-for-TRIDION-300_tcm18-74963.jpg)
19. [fotografía en línea]. Disponible en: <http://content.answers.com/main/content/img/McGrawHill/Encyclopedia/images/CE621650FG0010.gif>
20. Mais DD, Boxer LA, Gulbranson RD, Keren DF. Hemoglobin Ypsilanti: a high-oxygen-affinity hemoglobin demonstrated by two automated high-pressure liquid chromatography systems. *Am J Clin Pathol* 2007 Nov;128(5):850-3.
21. Wada Y. Advanced analytical methods for hemoglobin variants. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002 Dec 5;781(1-2):291-301.
22. Wada Y, Hayashi A, Fujita T, Matsuo T, Katakuse I, Matsuda H. Structural analysis of human hemoglobin variants with field desorption mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1981 Feb 27;667(2):233-41.
23. Ferranti P, Malorni A, Pucci P, Fanali S, Nardi A, Ossicini L. Capillary zone electrophoresis and mass spectrometry for the characterization of genetic variants of human hemoglobin. *Anal Biochem* 1991 Apr;194(1):1-8.
24. Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clin Chem* 2004 Oct;50(10):1736-47.
25. Krishnamoorthy R, Wajcman H, Labie D. Isoelectrofocusing: a method of multiple applications for hemoglobin studies. *Clin Chim Acta* 1976 Jun 1;69(2):203-9.
26. Hempe JM, Craver RD. Quantification of hemoglobin variants by capillary isoelectric focusing. *Clin Chem* 1994 Dec;40(12):2288-95.
27. Hardison RC, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DHK, Wajcman H, *et al.* HbVar database for human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38:120-91.
28. Hb Var. A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. Disponible en: <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>
29. Asclepion Genetics, Golden Helix. The HbVar-XPRbase. 2006. Disponible en: <http://www.goldenhelix.org/xprbase>
30. National Human Genome Research Institute. The ENCODE Project: ENCyclopedia Of DNA Elements. 2009. Disponible en: <http://www.genome.gov/10005107>
31. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. 5 ed. Madrid: Mc Graw Hill; 2001.
32. Comisión permanente de la FEUM. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8 ed. México (DF): SSA; 1998.

33. Mori S, Katz E, Eksteen R, Schoenmakers P. Handbook of HPLC. 2 ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1998.
34. Braithwaite A, Smith FJ. Chromatographic Methods. 5 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1999.
35. Ahuja S, Jespersen N. Modern Instrumental Analysis. New York: Elsevier; 2006.
36. [fotografía en línea]. Disponible en: <http://www.uni-koeln.de/math-nat-fak/botanik/bot2/agflue/HOME/equipment/uplc.jpg>
37. Dong MW. Modern HPLC for Practicing Scientists. 2 ed. New Jersey: Wiley-Interscience; 2006.
38. Bournazos SN, Tserga A, Patrinos GP, Papadakis MN. A versatile denaturing HPLC approach for human beta-globin gene mutation screening. *Am J Hematol* 2007 Feb;82(2):168-70.
39. Arends A, Chacín M, Bravo-Urquiola M, Montilla S, Guevara JM, Velásquez D, et al. Hemoglobinopatías en Venezuela. *Interciencia* 2007;32(8):516-21.
40. Chan AY, So CC, Ma ES, Chan LC. A laboratory strategy for genotyping haemoglobin H disease in the Chinese. *J Clin Pathol* 2007 Aug;60(8):931-4.
41. Bravo-Urquiola M, 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 Dec;45(4):309-15.
42. Ibarra B, Zúñiga P, Ramírez ML, Martínez-Orozco LC, Cantú JM. Detection of hemoglobin alterations in a sample population in northwest Mexico. Preliminary report. *Arch Invest Med* 1980;11(4):491-6.
43. Ibarra B, Vaca G, Franco-Gamboa E, Garcia-Cruz D, de la Mora E, Castro-Felix LP, et al. Abnormal hemoglobins in Northwestern Mexico. *Acta Anthropogenet* 1982;6(4):217-23.
44. Ibarra B, Vaca G, de la Mora E, Romero F, Aguilar-Luna C, Mejía A, et al. Genetic heterogeneity of thalassemias in Mexican mestizo patients with hemolytic anemia. *Hum Hered* 1988;38(2):95-100.
45. Reyes C, Hernandez A, Ruiz R, Identificación de un foco de talasemia beta en Tamiahua, Veracruz. *Rev Invest Clin* 1990 Jul-Sep;42(3):189-92.
46. Magaña MT, Ongay Z, Tagle J, Bentura G, Cobián JG, Perea JF, et al. Analysis of  $\beta^S$  and  $\beta^A$  Genes in a Mexican Population with African Roots. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2002 Mar-Apr;28(2): 121–126
47. Ruiz-Reyes G. Abnormal hemoglobins and thalassemias in Mexico. *Rev Invest Clin* 1998 Mar-Apr;50(2):163-70.
48. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Ruiz-Reyes G. Heterozygous beta-thalassemia: not infrequent in Mexico. *Arch Med Res* 2001 Jul-Aug;32(4):293-5.
49. Nava MP, Trejo JM, Aguilar-Luna C, Barros-Núñez P, Chávez Mde L, Magaña MT, et al. Molecular characterization of the--SEA alpha thalassemia allele in Mexican patients with HbH disease. *Rev Invest Clin* 2006 Jul-Aug;58(4):313-7.



50. Nava MP, Ibarra B, Magaña MT, Chávez ML, Perea FJ. Prevalence of  $\alpha$ 3.7 and  $\alpha$ anti3.7 alleles in sickle cell trait and  $\beta$ -thalassemia patients in Mexico. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:255–258.
51. Peñaloza-Espinosa RI, Buentello-Malo L, Hernández-Maya MA, Nieva-García B, Lisker-Yurkowitzki R, Salamanca-Gómez F. Frecuencia de la hemoglobina S en cinco poblaciones mexicanas y su importancia en la salud pública. *Salud Publica Mex* 2008;50:325-329.
52. Cobián JG, Sánchez-López JY, Magaña MT, Chávez ML, Perea FJ, Ibarra B. Types and frequencies of hemoglobin disorders in the pacific coast of four states of Mexico. *Rev Invest Clin*. 2009 Sep-Oct;61(5):399-404.
53. Organización Mundial de la Salud. Drepanocitosis y otras hemoglobinopatías. WHO Media Centre [artículo en línea] 2006 Ago:1. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/es/index.html>
54. Baudin V, Wajcman H. Extended application of RP-HPLC for characterization of human hemoglobin variants. *Clin Chim Acta* 1987 Jan 15;162(1):75-83.
55. Jenkins M, Ratnaik S. Capillary electrophoresis of hemoglobin. *Clin Chem Lab Med* 2003 Jun;41(6):747-54.
56. Head CE, Conroy M, Jarvis M, Phelan L, Bain BJ. Some observations on the measurement of haemoglobin A2 and S percentages by high performance liquid chromatography in the presence and absence of alpha thalassaemia. *J Clin Pathol* 2004 Mar;57(3):276-80.
57. Mandal AK, Bisht S, Bhat VS, Krishnaswamy PR, Balaram P. Electrospray mass spectrometric characterization of hemoglobin Q (Hb Q-India) and a double mutant hemoglobin S/D in clinical samples. *Clin Biochem* 2008 Jan;41(1-2):75-81.
58. Mario N, Baudin B, Aussel C, Giboudeau J. Capillary isoelectric focusing and high-performance cation-exchange chromatography compared for qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. *Clin Chem* 1997 Nov;43(11):2137-42.
59. Riou J, Godart C, Hurtrel D, Mathis M, Bimet C, Bardakdjian-Michau J, *et al.* Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. *Clin Chem* 1997 Jan;43(1):34-9.
60. De Caterina M, Esposito P, Grimaldi E, Di Maro G, Scopacasa F, Ferranti P, Parlapiano A, Malorni A, Pucci P, Marino G. Characterization of hemoglobin lepore variants by advanced mass-spectrometric procedures. *Clin Chem* 1992 Aug;38(8):1444-8.
61. Wild BJ, Green BN, Cooper EK, Lalloz MR, Erten S, Stephens AD, Layton DM. Rapid identification of hemoglobin variants by electrospray ionization mass spectrometry. *Blood Cells Mol Dis* 2001 May-Jun;27(3):691-704.
62. Ferranti P, Malorni A, Pucci P, Fanali S, Nardi A, Ossicini L. Capillary zone electrophoresis and mass spectrometry for the characterization of genetic variants of human hemoglobin. *Anal Biochem* 1991 Apr;194(1):1-8.

63. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem* 1993 Aug;39(8):1717-23.
64. Ferranti P, Malorni A, Pucci P. Structural characterization of hemoglobin variants using capillary electrophoresis and fast atom bombardment mass spectrometry. *Methods Enzymol* 1994;231:45-65.
65. Colah RB, Surve R, Sawant P, D'Souza E, Italia K, Phanasgaonkar S, et al. HPLC studies in hemoglobinopathies. *Indian J Pediatr* 2007 Jul;74(7):657-62.
66. Ou CN, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. *Clin Chim Acta* 2001 Nov;313(1-2):187-94.
67. Beatriz de la Calle Guntiñas M, Wissiack R, Bordin G, Rodríguez AR. Determination of haemoglobin A(1c) by liquid chromatography using a new cation-exchange column. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003 Jul 5;791(1-2):73-83.
68. Kutlar A, Kutlar F, Wilson JB, Headlee MG, Huisman TH. Quantitation of hemoglobin components by high-performance cation-exchange liquid chromatography: its use in diagnosis and in the assessment of cellular distribution of hemoglobin variants. *Am J Hematol* 1984 Jul;17(1):39-53.
69. Guida V, Colosimo A, Fiorito M, Foglietta E, Bianco I, Ivaldi G, et al. Denaturing HPLC-based assay for molecular screening of nondeletional mutations causing alpha-thalassemias. *Clin Chem* 2004 Jul;50(7):1242-5.