

Identificación de β -talasemia en anemias microcíticas hipocrómicas refractarias al tratamiento con hierro en Nicaragua

(Identification of β -thalassemia in hypochromic microcytic anemias refractory to iron treatment in Nicaragua)

Allan X. Pernudy-Ubau¹, Valeska A. Campos-Gómez¹, Lucía L. Rojas-Vanegas¹, Milena L. Ramírez¹, Gerardo Mejía-Baltodano², Walter Rodríguez-Romero³

Resumen

Justificación y objetivo: gran parte de los casos descritos de anemias microcíticas-hipocrómicas corresponden a anemias ferropénicas y síndromes talasémicos. El diagnóstico diferencial se complementa con pruebas de laboratorio como el hierro sérico, ferritina, entre otras; sin embargo, estas son de baja disponibilidad en países en vías de desarrollo. En Nicaragua, el diagnóstico de estas patologías se basa en el historial clínico y análisis hematológicos de rutina. El objetivo de este trabajo fue la implementación de la técnica de cuantificación de hemoglobina A₂ en el diagnóstico clínico de β -talasemia.

Métodos: se realizó un estudio transversal con 30 pacientes que mostraban microcitosis e hipocromía después de 3 meses de tratamiento con sales de hierro. Se realizó electroforesis de hemoglobina y se utilizó el kit de la casa comercial Beta-Thal HbA₂ Quik Column para cuantificar la hemoglobina A₂ en cada paciente. El análisis estadístico utilizado fue la prueba de t de student. Se consideraron significativas las diferencias a $p < 0,05$. Esta investigación respetó los principios éticos que conciernen. Se contó con la aprobación del Comité de Ética Institucional, UNAN-Managua. Los participantes dieron su consentimiento informado.

Resultados: al aplicar el método para cuantificación de hemoglobina A₂, se obtuvo que el 67 % de las muestras presentaron una concentración de hemoglobina A₂ mayor al valor de referencia establecido (3,3 %), siendo pacientes diagnosticados para β -talasemia menor. El 33 % restante presentó valores normales de hemoglobina A₂ con microcitosis e hipocromía. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de glóbulos rojos, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y hemoglobina A₂, entre ambos grupos.

Conclusión: el diagnóstico diferencial de anemias microcíticas hipocrómicas refractarias al tratamiento con hierro, se realiza inicialmente por el historial clínico del paciente, pero es necesario contar con pruebas diagnósticas como la cuantificación de hemoglobina A₂ que permitan identificar las diversas patologías que cursan con microcitosis e hipocromía.

Descriptores: hemoglobina a₂, microcromatografía, β -talasemia menor, microcitosis, hipocromía.

Abstract

Justification and objective: much of the described cases of microcytic-hypochromic anemias are ferropenic anemias and Thalassemia syndromes. The differential diagnosis is complemented by laboratory tests as serum iron, ferritin, among others; However, these are of low availability in developing countries. In Nicaragua, the diagnosis of these diseases is based on clinical history and

Trabajo realizado en Laboratorio de Biología Molecular, POLISAL UNAN, Managua, Nicaragua.

Afiliación de los autores: ¹Laboratorio de Biología Molecular "MA. Elmer Cisneros in memoriam". Instituto Politécnico de la salud y ²Laboratorio Central de la Salud Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-Managua, Nicaragua. ³Facultad de Microbiología y CIHATA Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Fuente de apoyo: Fondos de proyecto de investigación (FPI), UNAN, Managua.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflictos de interés.

Abreviaturas: β TAL, β talasemia; Hb, hemoglobina, HCM, hemoglobina corpuscular media-pg.; HbA₂, hemoglobina A₂; HbF, hemoglobina fetal; CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media-gr/dL; VCM, volumen corpuscular medio-fl.

✉pernudi@gmail.com

routine blood analysis. The objective of this work was to implement a technique for quantification of hemoglobin A₂ in the clinical diagnosis of β -Thalassemia.

Methods: We conducted a cross-sectional study with 30 patients showing hypochromia and microcytosis after 3 months of treatment with iron salts. Hemoglobin electrophoresis was performed, a kit from Beta-Thal HbA₂ Quik Column was used to quantify the hemoglobin A₂ in each patient. The statistical analysis used was the student's t test. The differences were considered significant at $p < 0.05$. This research respected ethical principles that concern. It had the approval of the committee of ethics institutional, UNAN-Managua and the participants gave their informed consent.

Results: when applying the method for quantification of hemoglobin A₂, 67% of samples presented a concentration of hemoglobin A₂ greater than the reference value set at 3.3%, these patients were diagnosed with β -Thalassemia minor. The remaining 33% presented normal values of hemoglobin A₂ with hypochromia and microcytosis. Statistically significant differences between the averages of red blood cells, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and hemoglobin A₂ between the two groups was observed.

Conclusion: The differential diagnosis of microcytic hypochromic anemias refractory to treatment with iron, is initially performed by the clinical history of the patient, but it is necessary to have diagnostic tests such as the quantification of hemoglobin A₂, which allow the identification of patients with β -Thalassemia minor within this group. In our study 67% of the studied samples were identified as β -Thalassemia minor.

Keywords: Hemoglobin A₂, Microchromatography, β -thalassemia minor, Microcytosis, Hypochromia.

Fecha recibido: 20 de marzo 2018

Fecha aprobado: 16 de agosto 2018

Las anemias microcíticas se caracterizan por la formación de glóbulos rojos más pequeños de lo normal. El tamaño reducido de estas células se debe a la disminución en la producción de hemoglobina, la cual es el principal componente de los eritrocitos.¹ Las principales causas de microcitosis son el déficit de hierro, la anemia de trastorno inflamatorio crónico y la alfa o beta talasemia.²

La talasemia es una enfermedad hemolítica congénita que se hereda según las leyes de Mendel. Consiste en una síntesis y producción de hemoglobina defectuosa. En los precursores eritroides, las cadenas adicionales no se emparejan, lo que conduce a un daño desequilibrado de la cadena de hemoglobina y la lisis celular.³ Son alteraciones en la molécula de hemoglobina, que pueden deberse a defectos, en la síntesis completa o parcial de las cadenas de hemoglobina, y la patología recibe el nombre según la cadena en la que se encuentre el déficit.⁴

Los síndromes de β -talasemia son trastornos hereditarios de la sangre caracterizados por la síntesis reducida de cadenas β que da lugar a una reducción en la producción total de hemoglobina del eritrocito.⁵ La anemia ferropénica y la β -talasemia presentan un desarrollo clínico similar, ya que ambas cursan con anemia microcítica hipocrómica, diferenciándose en los síntomas, el grado de anemia existente y hallazgos distintos de laboratorio.⁶

La sospecha diagnóstica de los síndromes talasémicos es fácil a partir de la anemia leve marcada con microcitosis hipocromía, ausencia indudable de ferropenia y cuadro familiar positivo. La coexistencia de una ferropenia puede muchas veces dificultar

el diagnóstico de un síndrome talasémico.⁷ Su diagnóstico diferencial se complementa con pruebas de laboratorio como hierro sérico, ferritina, entre otras. Sin embargo, dichas pruebas son de difícil acceso en países en vías de desarrollo, por su alto costo.

El patrón microcítico hipocrómico de anemias asociadas con niveles de hemoglobina mayores de 10 g/dL, índices eritrocitarios bajos y policitemia (aumento de glóbulos rojos), es característico del rasgo talasémico, los cuales son aplicables para el escrutinio de esta condición. La anemia ferropénica se determina por la disminución del hierro sérico, ferritina y la β -talasemia por el aumento de HbA₂ o HbF.

El diagnóstico médico de β -talasemia en Nicaragua se basa en el historial clínico del paciente, antecedentes familiares y hemograma. Ante esto, la determinación de HbA₂ resulta fundamental en el diagnóstico de esta patología.

La electroforesis de hemoglobina con cuantificación de las hemoglobinas A₂ y fetal permite una primera orientación diagnóstica: una hemoglobina A₂ mayor de 3,5 % prácticamente confirma el diagnóstico de una β -talasemia menor, mientras que una hemoglobina A₂ normal o disminuida hará sospechar una α -talasemia leve (o una $\delta\beta$ -talasemia si la hemoglobina fetal está aumentada). La coexistencia de una ferropenia puede muchas veces dificultar el diagnóstico de un síndrome talasémico.⁸

El objetivo de este trabajo fue la implementación de la técnica de cuantificación de hemoglobina A₂ en el diagnóstico

clínico de β -talasemia, constituyendo el primer reporte de esta condición en Nicaragua.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio transversal en el cual se cuantificó la HbA₂ en 30 pacientes que presentaban microcitosis e hipocromía, con 3 meses de tratamiento con sales de hierro sin respuesta adecuada. Estos pacientes fueron remitidos de diferentes unidades de salud del país y se les solicitó el consentimiento informado en la investigación, adjuntando una hoja de recolección de datos para obtener la información y la biometría hemática completa. Las muestras ingresaron al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Politécnico de la Salud UNAN-Managua, entre marzo 2016 y junio 2017, y fueron obtenidas por punción venosa, en tubos con anticoagulante (EDTA k3).

Se utilizó paquete globular libre de plasma, obtenido mediante tres lavados con solución salina al 0,9 % para realizar el hemolizado de cada muestra. Las diferentes bandas de hemoglobina se identificaron mediante electroforesis de hemoglobina en tiras de acetato de celulosa, con solución tampón TRIS-EDTA-bórico pH 8,5, revelándose posteriormente con Ponceau S.⁹

La HbA₂ fue cuantificada por el método microcromatográfico de columna rápida (Beta-Thal HbA₂ Quik Column – Helena Laboratories, Texas). Se determinó el porcentaje de HbA₂ de cada muestra usando un lector de ELISA, realizándose las lecturas de ambos tubos (tubo con fracción de HbA₂ y tubo de fracción total) a una longitud de onda de 405nm, calibrando a cero con agua destilada. Se calculó el porcentaje de HbA₂ (%) según la fórmula:

$$\frac{\text{Abs de la fracción de HbA}_2}{5 (\text{Abs de la solución fracción total})} \times 100 = \text{HbA}_2 \%$$

Se utilizaron como criterios diagnósticos para anemias valores de glóbulos rojos $<3,5 \times 10^{12}/L$; hemoglobina $<12 \text{ g/dL}$; hematocrito $<36 \%$; volumen corpuscular medio $<80\text{fL}$; hemoglobina corpuscular media $<27 \text{ pg}$; concentración de hemoglobina corpuscular media $<32 \text{ gr/dL}$; hemoglobina A₂ $<3,3 \%$.

Para el análisis estadístico se calculó la media y se realizaron comparaciones por el método de *t de Student*; se tomó un nivel de significación de 0,05.

Resultados

En 20 (67 %) de los pacientes estudiados se confirmó la presencia de β -talasemia menor, ya que presentaron un aumento en las concentraciones de hemoglobina A₂ y 10 (33 %) resultaron con una concentración normal de hemoglobina A₂

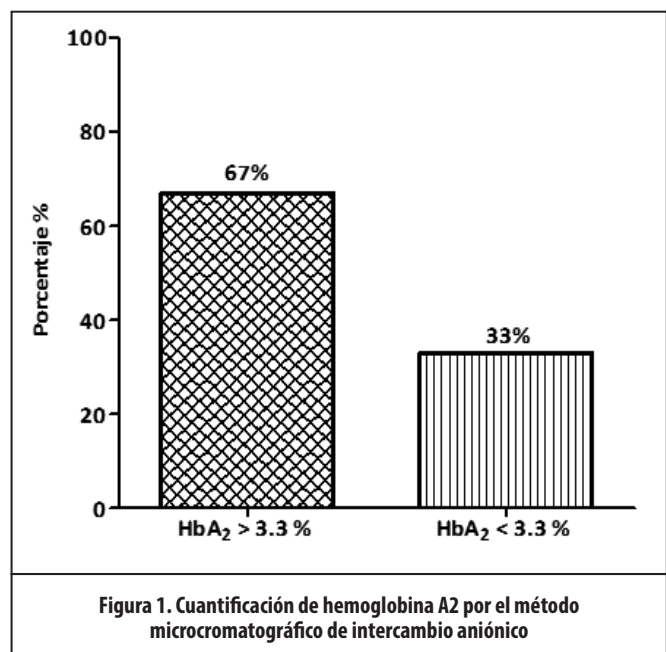
según la técnica descrita. Cabe destacar que todos manifestaban microcitosis hipocromía con 3 meses de tratamiento con sales de hierro, sin respuesta (Figura 1). A cada una de las muestras se les realizó electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa a un pH alcalino, en donde se evidenció un patrón electroforético normal (Hb AA) en todas las muestras y un aumento característico de la fracción de HbA₂ en pacientes con β talasemia menor ($>3,3 \%$).

Con los datos del hemograma de cada uno de los pacientes, se calculó el valor medio de cada parámetro hematológico. El Cuadro 1 muestra que, en general, los pacientes con anemia microcítica hipocrómica no fueron β talasémicos y viceversa. Los valores corresponden al valor medio de 7 determinaciones. El análisis estadístico demostró variaciones significativas ($p<0,05$) en el recuento de eritrocitos, VCM, HCM y HbA₂, al comparar la población portadora de β -talasemia y anemia microcítica hipocrómica.

Discusión

La anemia microcítica es la más encontrada en la práctica médica general. Puede ser el resultado de un defecto en los genes de globina, en la síntesis de hemo¹⁰ por deficiencia de hierro, la cual está asociada a pérdidas de sangre, inadecuada ingesta de hierro, inflamación y mayor prevalencia de hemoglobinopatías.¹¹

Las anemias de procesos crónicos generalmente son normocíticas, pero en determinadas circunstancias, pueden ser microcíticas. Es importante establecer el diagnóstico diferencial, buscar parámetros de laboratorio que permitan una detección precoz de la enfermedad y establecer una adecuada y sencilla discriminación entre ellas.



Aixala,¹ en una población de 1936 pacientes derivados para estudios de anemias microcíticas hipocrómicas en Buenos Aires, detectó el 27 % de portadores de β -talasemia menor; también Lazarte¹² et al. encontraron el 46 % de portadores de síndromes β -talasémicos en un total de 52 pacientes. Con respecto a nuestro estudio, no existe una distribución homogénea en el porcentaje de portadores, debido a los diferentes criterios de selección empleados en la población de los distintos países y aun dentro de ellos, en diferentes regiones.

Con respecto al 33 % de los pacientes que presentaban valores normales de hemoglobina A₂ con microcitosis e hipocromía, respectivamente, sin respuesta al tratamiento oral con hierro, no se excluyen otros padecimientos como α y $\delta\beta$ talasemias, los cuales se relacionan con niveles de hemoglobina fetal elevados (prueba no evaluada en este estudio).

Los parámetros hematológicos que se tomaron en cuenta para la evaluación de β talasemia y anemia microcítica hipocrómica fueron: el recuento de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito; a partir de estos se definen los índices hematimétrico (VCM, HCM, CHCM) y HbA₂. En nuestro medio es vital establecer el diagnóstico diferencial, ya que en la anemia microcítica hipocrómica existe una disminución del VCM con el hematocrito y la hemoglobina, en el hemograma de las talasemias se destaca una eritrocitemia microcítica hipocrómica y una elevación de la HbA₂. En la β talasemia, el VCM generalmente es menor que en la anemia microcítica hipocrómica. Algunos autores consideran que con un VCM < 75fL y un HCM < 25 pg se tendría la posibilidad de investigar síndromes talasémicos.¹³

Si en la cuantificación de HbA₂ los valores superan un 3,5 % son confirmatorios para β -talasemia; normalmente están entre el 4 % y el 6 %.¹⁴ Las diferencias encontradas en los niveles de HbA₂ para anemia microcítica hipocrómica y β talasemia resultaron mayormente significativas (p<0,001), observándose un aumento en individuos diagnosticados con β -talasemia.

El diagnóstico diferencial es vital debido a que el aporte de hierro en los síndromes talasémicos es iatrogénico, y en algún momento de su curso requerirá terapia de quelación para remover el hierro del organismo.¹⁵ En la diferenciación de estas patologías se observó la persistencia de anemia microcítica

hipocrómica sin respuesta al tratamiento con hierro, además VCM y HCM disminuidos no atribuibles a la ferropenia.

Este estudio sobre las anemias microcíticas hipocrómicas refractarias al hierro constituye el primer reporte de casos en Nicaragua para el diagnóstico clínico de β -talasemia y anemias microcíticas hipocrómicas refractarias al tratamiento con hierro, mediante la implementación de la técnica de cuantificación de hemoglobina A₂ por el método microcromatográfico, en el Instituto Politécnico de la Salud en la UNAN-Managua.

En conclusión, la implementación de la técnica de cuantificación de HbA₂ es crucial para incrementar el diagnóstico de las diferentes patologías que cursan con microcitosis e hipocromía.

Agradecimientos: expresamos nuestra gratitud a la MSc. Xiomara Guerrero Delgado, del Instituto Politécnico de la Salud UNAN, Managua, por su apoyo a esta investigación.

Referencias

1. Aixala M. Anemia microcítica-hipocrómica: anemia ferropénica versus β talasemia menor. Acta Bioquím Clín Latinoam.2017; 51:291-305
2. González S, González B, Núñez J. Protocolo diagnóstico de las anemias microcíticas. Medicine. 2012;20: 1242-1245
3. Tari K, Ardalan P, Abbaszadehdibavar M, Atashi A, Jalili A, Gheidishahran M. Thalassemia an update: molecular basis, clinical features and treatment. Int J BioMed Public Health. 2018; 1:48-58
4. Vargas C. β - Talasemia. Rev Méd Costa Rica Centroamérica.2011; 598:355-357
5. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia, Orphanet J Rare Dis.2010; 5:11
6. Muñoz Rojas I, Bastos Orebro, López de la Guía MA, Fernández Navarro F. Protocolo diagnóstico de las anemias microcíticas. Medicine 2008;10:1363-5
7. Goñi M, Galindo C, Goñi A. Actualización en medicina de familia. Talasemias. Semergen. 2008;34: 138-142
8. Chiappe G. Talasemia: Aspectos Clínicos. Acta Bioquim Clin Latinoam.2017;51:281-289
9. Garrote H, Morales M, Agramonte O, Chávez M, Simón A, Castro D. Comportamiento de la hemoglobina A2 en mujeres deportistas de alto rendimiento. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2013; 29: 203-206.

Cuadro 1. Perfil hematimétrico de los pacientes con β talasemia y anemia microcítica hipocrómica			
Parámetros hematológicos	β-talasemia \bar{x}	Anemia microcítica hipocrómica \bar{x}	p
Glóbulos rojos (x10 ¹² /L)	5,4	4,6	0,029
Hemoglobina (g/L)	10,7	11,0	0,754
Hematocrito (%)	36,6	24,3	0,761
VCM (fL)	64,8	77,6	0,001
HCM (pg)	21,8	24,9	0,045
CHCM (g/L)	31	31,7	0,675
HbA ₂ (%)	4,6 %	2,8 %	<0,001

10. Lolascon A, De Falco L, Beaumont C. Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. *Haematol* 2009; 94: 395-408
11. González J, Garrido S, Ceballos G, García G. Prevalencia de anemias en mujeres embarazadas del Hospital General Yanga, Córdoba, Veracruz, México. *Rev Biomed* 2012;23:1-6
12. Lazarte S, De Leri de Nofal M, Agüero MA, Isse B. Perfil hematológico de la β talasemia menor en Tucumán. *Acta Bioquím clín latinoam.* 2007; 41:219-23
13. Nillakupt K, Nathalang O, Arnutti P, Jindadamrongwech S, Boonsiri T, Panichkul S et al. Prevalence and Hematological Parameters of Thalassemia in Tha Kradarn Subdistrict Chachoengsao Province, Thailand. *J Med Assoc Thai* 2012; 95:124-132
14. Comité Nacional de Hematología, Oncología y Medicina Transfusional. Anemias microcíticas hipocrómicas: guía de diagnóstico diferencial. *Arch Argent Pediatr* 2017; 115:83-90.
15. Castellano R, López N, Piedras J. Sobrecarga de hierro en pacientes pediátricos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2009; 66: 481-491