

INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS Y PRECLINICAS "VICTORIA DE GIRÓN"
INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MEDICAS DE LA HABANA

Pesquisaje de hemoglobinas anormales en el recién nacido por la técnica de enfoque isoeléctrico

Por:

Lic. HILDA GRANDA IBARRA* y Dr. ROLANDO HERNANDEZ FERNANDEZ**

Granda Ibarra, H.; R. Hernández Fernández. *Pesquisaje de hemoglobinas anormales en el recién nacido por la técnica de enfoque isoeléctrico*. Rev Cub Ped 57: 1, 1985.

Se analizaron 4 246 muestras de sangre de recién nacidos de Ciudad de La Habana, en un período de ocho meses (enero-agosto de 1983) por la técnica de enfoque isoeléctrico de cadenas de hemoglobina. En el estudio se detectaron 128 FAS, 8 FAC, 1 FSB^{ut+1}, 1 FSC y 2 FAG Philadelphia. Se analiza las ventajas de esta técnica en el estudio de la HbS al nacimiento, así como la importancia de la realización conjunta de un programa de prevención de la AHF y la fenilcetonuria al nacimiento.

INTRODUCCION

Según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año nacen en el mundo aproximadamente 100 000 niños con anemia a hematies falciformes (AHF),¹ lo que constituye en realidad un serio problema de salud actual, sobre todo en aquellos países como los de Africa, que como consecuencia de una mayor frecuencia de este gen, el número de enfermos que nacen anualmente difiere poco de la cifra mundial.

En nuestro país donde las condiciones de salud han llevado a la casi erradicación de las enfermedades infectocontagiosas, aquéllas de origen genético han venido a ser uno de los problemas de salud que se deben resolver en estos próximos años; entre ellas, por supuesto, la AHF ocupa un primerísimo lugar, por ser la de más alta incidencia en Cuba, y se calcula que cada año deben nacer entre 56 y 156 niños con esta enfermedad.²

* Candidato a Doctor en Ciencias Médicas.

** Profesor Asistente en bioquímica. ICBP "Victoria de Girón". ISCMH.

Esta hemoglobinopatía, como todos conocemos, carece de una terapia efectiva y aunque en los últimos años nuevos medicamentos y tratamientos han venido a prolongar sensiblemente la vida a los enfermos, se plantea como solución definitiva a este problema de salud, la detección en las poblaciones con alta incidencia de portadores de las familias de "alto riesgo" y que las mismas reciban el consejo genético y el diagnóstico prenatal.¹

Teniendo en cuenta estas razones, en diversos países con esta problemática, se han realizado pesquisajes en población adulta y/o en recién nacidos, aunque en general los métodos empleados presentan desventajas en cuanto a su alto costo, aplicación masiva y confiabilidad en los resultados.³⁻¹⁰

En este trabajo valoramos la ventaja del empleo de la técnica de enfoque isoelectrico de cadenas de Hb, la cual combina la alta resolución de estas técnicas con la masividad y bajo costo que logran algunos otros métodos electroforéticos.¹¹⁻¹³

Igualmente se analiza, conjuntamente con los resultados obtenidos en nuestro estudio, la importancia que tiene la realización del pesquisaje en recién nacidos, así como la ventaja desde el punto de vista organizativo que representa la realización conjunta del programa de pesquisaje de hemoglobinopatías y el de fenilcetonuria al nacimiento.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron un total de 4 246 recién nacidos de Ciudad de La Habana durante un periodo de ocho meses (enero-agosto de 1983).

Se obtuvieron las muestras sobre papel de filtro y se dejaron secar, según el procedimiento empleado para el diagnóstico masivo de la fenilcetonuria, teniendo en cuenta que el procedimiento es igualmente útil para el diagnóstico masivo de hemoglobinopatías, aun cuando no han sido utilizadas para programas conjuntos.

Las muestras se procesaron según describió *Atland* en 1979, con algunas modificaciones introducidas por nosotros.¹⁴

Se cortaron piezas de papel de filtro de 6 mm de diámetro embebidas en sangre, se colocaron en placas estándares de tipo Microtiter para 96 muestras y se les realizó elución mediante la adición a cada una de 50 μ l de una solución de urea 8 M con 2 mercaptoetanol al 5% y tritón X-100 al 2%.

Después de incubadas durante un periodo de una a tres horas a 37°C, las muestras se diluyeron añadiendo otros 100 μ l de 2 mercaptoetanol al 5%, y se mantuvieron en incubación por un periodo no mayor de 30 minutos antes de transponerlas al gel.

El gel para el enfoque se preparó utilizando dos placas de vidrio de 265 x 160 x 1 mm, lavadas consecutivamente con agua desionizada, acetona y éter etílico, se colocaron una sobre otra separadas por una banda de goma en forma de U de 0.24 mm de espesor, se pusieron entre dos placas de vidrio de 265 x 160 x 4 mm y se mantuvieron unidas por presillas metálicas.

Se prepararon 10 ml de solución gelificante (T = 5%, C = 3%) con 4,8 g de urea sólida, 2,95 ml de agua desionizada, 2,5 ml de una solución que contenía 19,4 g% (p/v) de Acrilamida (SERVA) y 0,6 g% (p/v) de N,N' — Metilénbisacrilamida (SERVA), 500 µl de anfolitos pH 7-8 (Servalyte SERVA), 10 µl TEMED y 100 µl de persulfato de amonio al 1,2 g% (p/v).

La solución se introdujo entre las placas de vidrio de 1 mm usando una jeringuilla, se eliminó el aire y se sellaron con agua.

El tiempo de polimerización se ajustó a 10 minutos aproximadamente a temperatura ambiente. Después de polimerizado se mantuvo en refrigeración por otros 15 minutos.

Las placas se separaron con un bisturí y el gel adherido a una de ellas se colocó en una placa de enfriamiento de la cámara de separación (Mephophor Desaga Heidelberg) a una temperatura de 12°C.

El puente anódico de 255 x 6 mm de papel whatmann No. 17 se humedeció en una disolución 0,5 M de ácido ortofosfórico y se colocó en el centro del gel. Dos puentes catódicos humedecidos en una disolución 0,75 M de hidróxido de sodio se colocaron en ambos extremos del gel.

Bandas de goma con 48 perforaciones de 2,5 mm de diámetro se situaron a lo largo del gel, aproximadamente a 1 cm a cada lado del puente anódico central.

Un electrodo positivo simple y un sistema de doble electrodo negativo se pusieron sobre sus puentes respectivos y se sujetaron con las dos placas de vidrio de 4 mm para producir un contacto adecuado.

Se realizó una precorrida con una corriente constante de 12 mA durante 15 minutos para eliminar el persulfato de amonio residual.

Se colocaron individualmente 5 µl de cada muestra mediante pipeta automática, en cada uno de los orificios de la banda de goma y se continuó la corrida con 12 mA, corriente constante hasta alcanzar un voltaje límite de 1 000 volts durante 30-45 minutos aproximadamente.

Una vez terminada la corrida el gel se fijó y se coloreó, pasándolo sucesivamente por un tiempo máximo de 15 minutos por las siguientes soluciones: solución fijadora ácido tricloroacético al 20%, agua destilada, solución colorante 9 volúmenes de Coomassie Blue R-250 al 0,3% (p/v) filtrado, 9 volúmenes de etanol y 2 volúmenes de ácido acético y 6 volúmenes de agua desionizada y solución preservativa glicerol al 2% y ácido acético al 10%.

La identificación de las muestras se realizó a las 12 horas de terminado el proceso, cuando la hidratación del gel permitía una mejor visualización de las mismas (figura).

Los casos patológicos detectados FSB¹²⁻¹³ y FSC, así como las dos variantes detectadas se analizaron nuevamente por el método de enfoque isoeléctrico desarrollado por Altland (1977) o por el desarrollado por Basset (1978).¹²⁻¹³

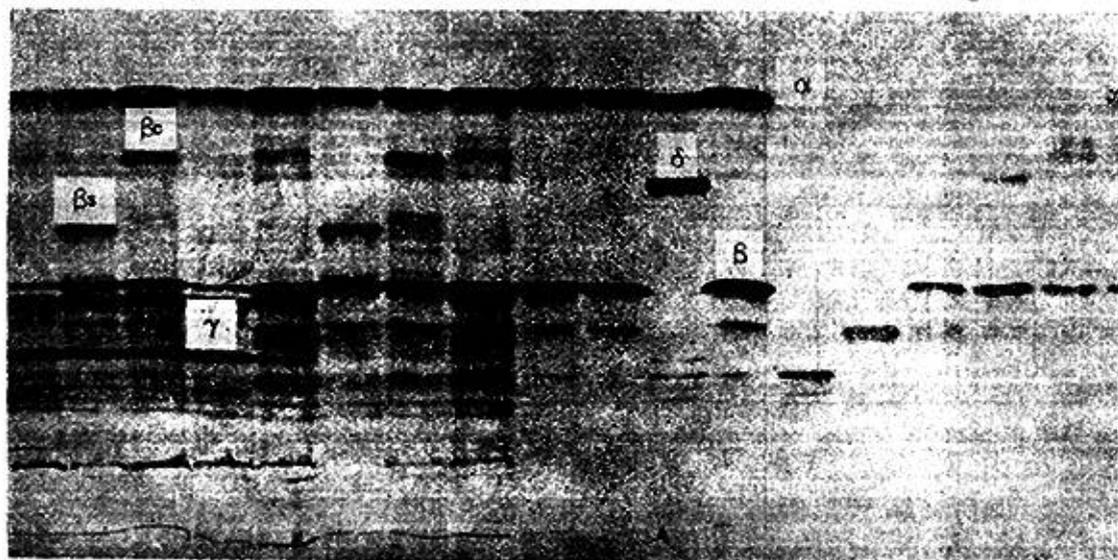
Los padres de estos casos se analizaron también, y se utilizó para ello una de las dos técnicas antes mencionadas, así como la electroforesis vertical en gel de poli(acrilamida) y la prueba de solubilidad en ampulas (Heredero y otros, 1974 y 1976).^{11,15}

RESULTADOS

En el cuadro I se observan los resultados obtenidos en este estudio, así como las frecuencias fenotípicas halladas.

Los valores encontrados no se diferenciaron significativamente de los esperados para un nivel de significación de $p < 0.05$.

En el cuadro II se observan los resultados obtenidos con los distintos métodos por familias.



Figura

De izquierda a derecha FA, FAS, FAC, AA, AS, AC, representan la posición de las distintas cadenas de la Hb en el enfoque isoelectrico.

CUADRO I

HEMOGLOBINOPATIAS DETECTADAS POR ENFOQUE ISOELECTRICO DE CADENAS DE HEMOGLOBINA EN 4 245 RECIEN NACIDOS

| Patrón electroforético | No. de casos | Por ciento |
|------------------------|--------------|------------|
| FA | 4 105 | 96,7 |
| FAS | 128 | 3,02 |
| FAC | 8 | 0,19 |
| FSB ^{total} | 1 | 0,02 |
| FSC | 1 | 0,02 |
| FAG Philadelphia | 2 | 0,05 |
| Total | 4 245 | 100,00 |

CUADRO II

RESULTADOS DEL ESTUDIO FAMILIAR A LOS NIÑOS CON HEMOGLOBINOPATIAS
Y CON VARIANTES DE HEMOGLOBINA DETECTADAS DURANTE EL PESQUISAJE

| | Enfoque isoeléctrico de cadenas | Enfoque isoeléctrico | Electroforesis de Poliacrilamida | Prueba de solubilidad |
|----------|------------------------------------|-------------------------|--|--------------------------|
| J.L.A. | FSB ^{tal} | FSB ^{tal} | no | no |
| Padre | AS | AS | AS | positiva |
| Madre | AB ^{tal} | AB ^{tal} | AA | negativa |
| N.P.S. | FSC | FSC | no | no |
| Padre | AA | AA | AA | negativa |
| Madre | AS | AS | AS | positiva |
| J.S.M.C. | FA var. lenta cad. alfa | FAG Philadelphia | no | no |
| Padre | AA | AA | AA | negativa |
| Madre | A var. lenta cad. alfa | AG Philadelphia | como AS | negativa |
| L.G.A. | FA var. lenta cad. alfa | FAG Philadelphia | no | no |
| Padre | AA | AA | AA | negativa |
| Madre | A var. lenta cad. alfa | AG Philadelphia | como AS | negativa |

Caso de ilegitimidad

Las familias de alto riesgo detectadas a través de su descendencia, recibieron en todos los casos consejo genético y los niños se remitieron al Instituto de Hematología para su posterior tratamiento.

DISCUSION

En aquellos países donde la incidencia del gen de la HbS representa un serio problema de salud, resulta imprescindible elaborar programas con vista a la prevención de esta enfermedad.

Muchos programas se han llevado a cabo en diversos países, los cuales incluyen pesquisajes a la población adulta y/o los recién nacidos.

El estudio al nacimiento de esta hemoglobinopatía sin duda resulta ventajoso no sólo por la detección precoz del enfermo, sino también por la caracterización de la futura población.

Tales tipos de programas son imprescindibles aun cuando el desarrollo técnico alcanzado permita la realización del diagnóstico prenatal de la enfermedad, por lo necesario que resulta evaluar la acción del mismo.

Hay que tener en cuenta que paralelo al desarrollo de un programa de esta envergadura, está la educación a la población acerca de las características de la enfermedad a través de los medios masivos de difusión y/o de la enseñanza media, lo que nos permitirá en un futuro que el portador detectado al nacimiento y que conoce su estado valore este aspecto al momento de formar su pareja y en caso de constituirse en familia de "alto riesgo" concurren a la consulta de consejo genético a fin de que pueda realizarse el diagnóstico prenatal a la futura descendencia.

Por otra parte, la técnica propuesta para este estudio de hemoglobinopatías al nacimiento ofrece amplias ventajas por su confiabilidad, bajo costo y seguridad en el análisis.

Las modificaciones realizadas por nosotros a la técnica original, reducen el costo de análisis por muestra a sólo cuatro centavos y la corrida se realiza en un tiempo menor, por lo que ahora pueden analizarse el triple de muestras en igual tiempo.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo no difieren de los encontrados por otros autores y nosotros mismos en otros pesquisajes realizados tanto en población adulta como en recién nacidos.^{2,8}

Los dos casos detectados de variantes lentas de cadena alfa presentaron igual migración que la variante G Philadelphia por la técnica de enfoque isoeléctrico desarrollada por *Basset* (1978),¹² por lo que se determinó que se trataba de esa variante, que por otra parte se ha encontrado en otros estudios en nuestra población.

Por último queremos discutir la importancia que reviste la realización de programas de prevención en los que conjuntamente se analizan varias enfermedades como, por ejemplo, en nuestro caso la AHF y la fenilcetonuria.

La posibilidad de realizar tales tipos de pesquisajes al unísono, utilizando la misma organización y población, obviamente representa un nivel superior en lo que se refiere a programas masivos, por el ahorro de recursos materiales y humanos que se logra en ellos.

CONCLUSIONES

El método de enfoque isoelectrico de cadenas de Hb resulta adecuado para la detección de hemoglobinopatías en el recién nacido, ya que presenta ventajas en cuanto a: confiabilidad en el análisis, masividad y bajo costo.

Además se propone la realización de este programa al nivel nacional conjuntamente con la detección al nacimiento de la fenilcetonuria.

SUMMARY

Granda Ibarra, H.; R. Hernández Fernández. *Screening for abnormal hemoglobins in the newborn using isoelectric focusing technique.* Rev Cub Ped 57: 1, 1985.

A total of 4 246 blood samples from newborns in Havana City, were analyzed in an eight month period (January-August 1983) by isoelectric focusing of hemoglobin chains. At the study, 128 FAS, 8 FAC, 1 FSB^{total}, 1 FSC and 2 FAG Philadelphia were detected. Advantages of this technique for the study of HbS at birth are analyzed, as well as importance of performing, jointly, a programme for AHF and phenylketonuria prevention at birth.

RESUME

Granda Ibarra, H.; R. Hernández Fernández. *Dépistage d'hémoglobines anormales chez le nouveau-né par la technique d'approche isoélectrique.* Rev Cub Ped 57: 1, 1985.

Il est analysé 4 246 prélèvements de sang de nouveau-nés de La Havane-Ville, pendant une période de huit mois (janvier-août 1983), par la technique d'approche isoélectrique de chaînes d'hémoglobine. L'étude a révélé 128 FAS, 8 FAC, 1 FSB^{total}, 1 FSC et 2 FAG Philadelphia. On analyse les avantages de cette technique dans l'étude de la HbS à la naissance, ainsi que l'importance de la réalisation d'un programme de prévention de la AHF et de la phénylcétonurie à la naissance.

BIBLIOGRAFIA

1. Report of a WHO Working Group on the community control of hereditary anaemias. WHO Human Genetics Programme. Division of Noncommunicable Diseases. Geneva, November, 1981.
2. *Hercedero, L.; H. Granda:* La sicklemlia en Cuba y su prevención. Rev Cub Ped 46(2, 3), febrero, 1974.
3. *Giorgio, A. J.; D. R. Boogs:* Large scale screening for hemoglobinopathies utilizing electrophoresis. A J Public Health 64: 933, 1974.
4. *Schneider, R. G. y otros:* Genetic hemoglobin abnormalities in about 9 000 black and 7 000 white newborns. Hemoglobin F Dickinson (A-gamma 97 His-Arg); a new variant. Brit J Haematol 28: 515, 1974.
5. *Schmidt, R. M.:* Laboratory Diagnosis of Hemoglobinopathies. J Am Med Assoc 224: 1276, 1973.
6. *Schroeder, W. A. y otros:* Detection of hemoglobin S and C at birth. A rapid screening procedure by column chromatography. J Lab Clin Med 82: 303, 1973.
7. *Hicks, E. J. y otros:* Comparison of results for three methods of hemoglobin S identification. Clin Chem 19: 533, 1973.

8. *Martínez, G.; M. E. Ceñizares:* Genetic hemoglobin abnormalities in 2 363 Cuban newborns. *Hum Genet* 62: 250, 1982.
9. *Basset, O. y otros:* An update on electrophoretic and chromatographic methods in the diagnosis of hemoglobinopathies. *J Chromatogr* 227: 267, 1982.
10. *Dash y otros:* Utilization of dried filter paper blood spot for screening and survey for abnormal hemoglobins. *Indian J Med Res* 75: 146, 1982.
11. *Heredero, L. y otros:* An economic high speed electrophoretic screening system for hemoglobin S and other proteins. *Humangenetik* 21: 167, 1974.
12. *Basset, P. y otros:* Isoelectric focusing of human hemoglobins. Its application to screening, to characterization of 70 variants and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. *Blood* 51: 971, 1978.
13. *Altland, K.:* Screening for abnormal hemoglobins in the newborn. A highly economic procedure using isoelectric focusing. Berlin, Walter de Gruyter, 1977. P. 295.
14. *Altland, K. y otros:* Improved screening test for abnormal hemoglobins from dried blood samples. *Hum Genet* 53: 97, 1979.
15. *Heredero, L. y otros:* La prueba de solubilidad en ampulas para la detección de hemoglobina S. Demostración de su eficiencia en 3 000 muestras de sangre analizadas. *Rev Cub Ped* 48: 515, 1976.

Recibido: 18 de abril de 1984.

Aprobado: 7 de mayo de 1984.

Lic. *Hilda Granda*

Jefa del departamento de genética médica.

ICBP "Victoria de Girón"

Ave. 31 y Calle 146 No. 3102

Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.