

Comportamiento de Fracciones de Hemoglobinas en adultos sanos mediante HPLC

Behavior of Hemoglobin Fractions in healthy adults by HPLC

Ortega Valdés, Ligia Lorena; Vanegas López, Jairo; Ruiz Saldívar, Daniela Magaly

 **Ligia Lorena Ortega Valdés**
ligial132@gmail.com
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua,
Managua, Nicaragua

 **Jairo Vanegas López**
jairo.vanegas.l@usach.cl
Universidad de Santiago de Chile (USACH), Chile

 **Daniela Magaly Ruiz Saldívar**
magalyruiz_85@yahoo.com
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua,
Managua, Nicaragua

Revista Torreón Universitario
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-Managua,
Nicaragua
ISSN: 2410-5708
ISSN-e: 2313-7215
Periodicidad: Cuatrimestral
vol. 11, núm. 31, 2022
revis.torreon.faremc@unan.edu.ni

Recepción: 15 Noviembre 2021
Aprobación: 25 Abril 2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/387/3873100013/>

DOI: <https://doi.org/10.5377/rtu.v11i31.14290>

El autor o los autores de los artículos, ensayos o investigaciones conceden a la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua) los derechos de edición (copyright) del trabajo enviado, por consiguiente la Universidad cuenta con el derecho exclusivo para publicar el artículo durante el periodo completo de los derechos de autor.



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Resumen: La sangre está compuesta de hemoglobina que funcionalmente permite la respiración celular a su vez la estructura de la hemoglobina es altamente especializada y su medición es determinante para conocer el estado de salud del individuo mas allá de los análisis rutinarios. Normalmente se emplea Electroforesis de hemoglobina a pH alcalino para determinar las fracciones, sin embargo el HPLC es mundialmente aceptado como el método confirmativo (Ondei, Zamaro, Mangonaro, Valéncio, & Bonini-Domingos, 2007). En esta investigación se cuantificó las fracciones de hemoglobina por HPLC utilizando el equipo D-10 de BioRad a 158 sujetos aparentemente sanos, empleando criterio de exclusión y quedando 72 sobre los cuales se analizó los porcentajes de hemoglobinas, los resultados fueron 96.03% para la Hb A₁, 2.92% para la Fracción A₂, 0.73% de Hb Fetal y 5.32% para la Hb A1c. Dichos resultados son similares a los realizados en otros países. Respecto a la hemoglobina A₂ hubo un descenso conforme la edad y en la mujer entre 30 a 40 años mostró los promedios más altos 1.4% en cambio el varón de 41-51 años reportó valores más bajos que las mujeres 0.76%. El método HPLC resultó ser un procedimiento muy estable de rápida realización y permite la clasificación en fracciones de Hb obteniendo subfracciones y variantes de hemoglobina normal y anormal. Esta investigación permite hacer un alto en cuanto a las pruebas de tamizaje neonatal que se realizan en Nicaragua y es la base para la continuación de investigaciones sobre hemoglobinas.

Palabras clave: Fracciones de hemoglobinas, Hemoglobina A₁, A₂, HPLC, tiempo de retención.

Abstract: The blood is composed of hemoglobin that functionally allows cellular respiration in turn the structure of hemoglobin is highly specialized and its measurement is decisive to know the state of health of the individual beyond routine analyzes. Normally hemoglobin electrophoresis at alkaline pH is used to determine fractions however HPLC is worldwide accepted as the confirmatory method (Ondei, Zamaro, Mangonaro, Valéncio, & Bonini-Domingos, 2007). In this research, the fractions of hemoglobin were quantified by HPLC using the D-10 equipment of BioRad to 158 apparently healthy subjects, using exclusion criteria and leaving 72 on which the percentages of hemoglobins were analyzed, the results were 96.03% for Hb A₁, 2.92% for Fraction A₂, 0.73% of Fetal Hb

and 5.32% for Hb A1c. These results are similar to those made in other countries. Regarding hemoglobin A₂ there was a decrease according to age and in women between 30 to 40 years showed the highest averages 1.4% while the male of 41-51 years reported lower values than women 0.76%. The HPLC method turned out to be a very stable procedure of rapid realization and allows the classification in fractions of Hb obtaining subfractions and variants of normal and abnormal hemoglobin. This research allows us to stop the neonatal screening tests carried out in Nicaragua and is the basis for the continuation of research on hemoglobins.

Keywords: Hemoglobin fractions, Hemoglobin A₁,A₂, HPLC, holding time.

INTRODUCCIÓN

A través de un hemograma es posible determinar las cifras de hemoglobina presente en sangre, sin precisar el desglose en fracciones. El reporte que ofrece un hemograma indica la concentración de hemoglobina en gramos por decilitro y ayuda a comprender la proporción de hemoglobina de acuerdo a la relación eritrocitos - plasma, valoración indispensable para la interpretación de anemia o policitemia. Por otro lado las fracciones que componen la hemoglobina se consideran una prueba especial y se puede analizar mediante el método HPLC (Zamaro et al, 2001). Este método es considerado de referencia para la investigación de proporciones específicas de las fracciones hemoglobínicas siendo comprobada su sensibilidad y especificidad, en Nicaragua no se realiza como tamizaje ni como método de investigación por carecer de los equipos en los laboratorios públicos y privados. Todo individuo posee 3 fracciones de hemoglobina normales denominadas Hemoglobina A₁(HbA₁), Hemoglobina A₂(Hb A₂) y Hb Fetal (Hb F) ,dichas fracciones son de gran importancia al momento de evaluar alteraciones hematológicas en hemoglobinopatías y talasemias (Nogueira dos Santos, 2011) .

En Nicaragua no se ha estudiado el comportamiento de las fracciones de hemoglobinas normales en población adulta ni se ha analizado desde ese ámbito las cantidades porcentuales de sus valores de referencia. Esta investigación plantea como primer hallazgo el análisis de las fracciones de hemoglobina en adultos normales de 19 a 81 años de la ciudad de Managua. Esta evaluación tiene sentido desde el punto de vista genético y hematológico, ya que al juzgar el comportamiento de las fracciones en un grupo aleatorio se puede encontrar hallazgos anormales que indiquen cierta distribución anómala o que genere una sospecha clínica en la población; Marc Soler Pont, Mercè Timon (2014), sin embargo, el fin de descubrir un comportamiento inicial conduce a realizar una comparación con otros estudios efectuados en países vecinos.

Dicha evaluación facilitará la comprensión e interpretación posterior de resultados anormales en la misma población nacional que correspondan a esos grupos etarios. Si bien es cierto la muestra es pequeña N:158 individuos, la sensibilidad del método utilizado HPLC potencia la importancia del estudio. El Programa Dual de Bio-Rad D-10TM es un sistema de pruebas que utiliza cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio iónico (HPLC) para la separación cromatográfica de las hemoglobinas A₁, A_{1c}, A₂, F y demás variantes de hemoglobina que pueden estar presentes en la sangre humana.

Al evaluar un adulto normal debería encontrarse fracciones específicas Hb A: 95-98%. Hb A₂:2-3%, Hb F: 0.8 -2% Hb S, E y C ausentes. Hamid G (2013) En infantes y niños la F, en recién nacido 50-80%, Hb F de 6 a 8 meses :8%, fetal después de 6 meses de 1-2%.

El Programa Dual de Bio-Rad D-10TM es un sistema de pruebas que utiliza cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio iónico (HPLC) para la separación cromatográfica de las hemoglobinas A_{1c}, A₂,

F y demás variantes de hemoglobina que pueden estar presente en la sangre humana. (Manual BIORAD-D10).

Es un procedimiento totalmente automatizado, que, utilizando una pequeña cantidad de muestra, obtiene la separación y cuantificación de las variantes de hemoglobina F, A_{1c}, A, A₂/E, D y C, en solo 6 minutos. La determinación del porcentaje de hemoglobina A_{1c}, A₂ y F, en sangre humana usando HPLC puede emplearse para distintos fines de diagnóstico o control de enfermedades. La medición del porcentaje de hemoglobina A_{1c} es efectiva para el control a largo plazo de la glucosa en individuos con diabetes mellitus, así como la medición del porcentaje de la HbA₂ y la HbF son eficaces para la vigilancia a largo plazo de pacientes con anemia hemolítica por β -talasemia.

También es capaz de detectar hemoglobinas anormales e incluso dar una presunta identificación de estas variantes (S, C, D y E). Su uso es exclusivamente profesional para el diagnóstico in vitro (FDA, 2012). Este sistema utiliza un juego de calibradores tanto para hemoglobinas normales como variantes que garantizo el éxito de las mediciones de este trabajo. Los resultados en rango de referencia no son afectados por Hb variantes heterocigotas (HbS, Hb C, Hb Lepore, Hb J) ni por HbF 10%, M. Vergara, A. Saez-Benito compararon entre métodos de HPLC modernos, encontraron que la presencia de HbF ente 3 y 8% no afecta a la correlación ni a la diferencia de los valores de HbA_{1c}. El significado de niveles anormales de dichas fracciones , puede indicar enfermedades por hemoglobinas variantes, o talasemias.(Revista de medicina, 2020) se sabe que las variantes de la hemoglobina pueden cambiar la posición de la curva hacia la izquierda o a la derecha de la asociada con la hemoglobina normal A, en solución diluida la hemoglobina falciforme por ejemplo no da dificultad funcional, pero en condiciones desoxigenadas esta hemoglobina forma polímeros que tienen una baja afinidad por el oxígeno. Wagner.M (2017)

MÉTODO

Esta investigación es de tipo descriptiva, analítica y prospectiva donde se examinaron 158 personas de ambos sexos, adultos que habitan en la ciudad de Managua, son individuos ambulatorios que declararon sentirse bien el día de la toma de muestra sanguínea, en ayunas (Ver figura 1).



FIGURA 1.
Entrevista a voluntarios y toma de muestra

Las consideraciones éticas de obligatorio cumplimiento fueron la invitación a participar espontáneamente en el estudio, firmar consentimiento informado, entrega de resultados a los participantes y confidencialidad de los datos por anonimato y codificación. Los participantes fueron notificados que los resultados en forma anónima podían ser publicados para contribuir con el conocimiento de estas pruebas debido a su información valiosa a nivel de país, en forma adicional dieron su consentimiento para el uso de fotografías.

Se realizó la invitación a participar en una feria de convocatoria abierta para realizar evaluación de fracciones de hemoglobinas, se muestrearon 73 varones (46.2%) y 85 mujeres (53.8%). Una vez efectuada la evaluación de las fracciones se realizó una depuración de la base de datos y se excluyeron 86 personas que no presentaron resultados normales de glicohemoglobina. La base final del análisis fue efectuada sobre 72 personas únicamente. El equipo de trabajo estuvo conformado por enfermeras, Bioanalistas, Médicos y estudiantes de ambas carreras (ver figura 2)



FIGURA 2.
Equipo multidisciplinario participantes de la feria 2020

RESULTADOS

Después de procesar los datos utilizando los calibradores necesarios y la metodología apropiada se procedió a realizar análisis estadístico simple a fin de conocer el comportamiento de la frecuencia de fracciones por edad y sexo. Se efectuó exclusión de aquellos datos aberrantes que no cumplieran con criterios de normalidad, encontrándose los siguientes valores para las fracciones normales de hemoglobina en ambos sexos 96.03% para la Fracción Mayor A1, 2.92% para la Fracción A2, 0.734% para la fracción menor que corresponde a la Hb Fetal y 5.32 para la Hb glicosilada o Hb A1c. (Ver figura 3)

Distribución global de las fracciones de Hb Normales

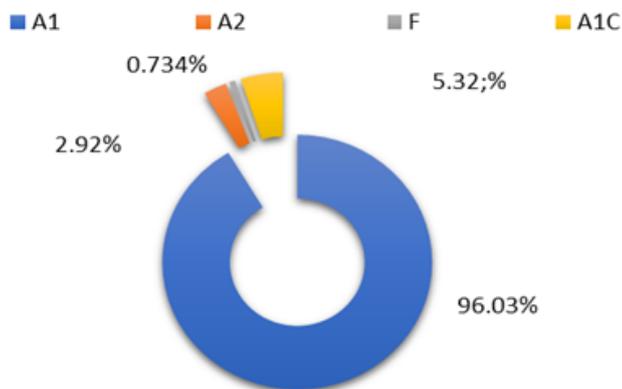


FIGURA 3.
Distribución global de las fracciones de Hb normales.
Fuente: Resultados de Cromatografía líquida de alta resolución, HPLC



FIGURA 4.
Análisis de muestras Equipo BIO-RAD D10

En la figura 4 se refleja el analista durante la realización de los montajes y la verificación. Durante el análisis de las muestras se sometió al control de calidad y a la calibración siguiendo las recomendaciones del fabricante, se utilizaron los calibradores adjuntos para hemoglobina glicosilada, normales A₁, A₂ y Fetal., para interpretar los resultados se procedió a su verificación iniciando por los resultados de los controles y a la confirmación de los picos presentados, las ventanas de resultados y los cromatogramas siguiendo las orientaciones específicas de valores de referencia y magnitudes contenidas entre los umbrales aceptados de lectura. Los tiempos de retención también fueron comparados encontrándose una homología entre los resultados de las personas

sanas, ver tabla 2. Se detecta Hb A en intervalos de tiempos de retención entre 1.66 y 1.74 , La Hb A2 en intervalos de 2.9 y 3.8 y para la Hb Fetal fue de 0.42 a 0.52 ,similares al estudio realizado por Aradhana et al , 2018.

TABLA 1
Distribución porcentual de las hemoglobinas fraccionadas Managua 2020

Grupo etario	Hb A ₁		Hb A ₂		Hb F		HbA1c	
	M	F	M	F	M	F	M	F
19-29	96.45	96.54	3.18	2.7	0.7	1.1	5.36	5.2
30-40	95.85	96.15	2.95	3.028	0.7	1.4	5.9	5.4
41-51	96.7	96.4	2.51	2.76	0.76	0.85	5.36	5.34
52-62	95.87	96.3	2.985	3.1	0.7	0.7	5.49	5.45
63-73	95.12	95.45	3.08	2.95	0.7	0.7	5.57	5.03

Resultados HPLC en sangre humana.

DISCUSIÓN

Al analizar los rangos obtenidos en el estudio, Tabla 1, se destaca que entre los principales resultados del total de 72 personas evaluadas, el 100% presentaron porcentajes adecuados de Hb A₁ con valores desde 91.6- 98 %, de 0.9 a 3.9 para la Fracción de Hb A₂ y de 0.7 a 2% de Hb F , de acuerdo a la literatura estas cifras se encuentran normales comparando las cifras referidas por los autores Morales M. de Cuba, Han W P (2019) y Jihong Hu de China (2018), Giambona (2009) Ciesla B. (2013) Williams (2007), Hamid G (2013) y McKenzie S. (2002) .

Como se expresó anteriormente la Hb A se encontró normal, de acuerdo con el análisis sobre la Hb fetal se halló cifras mínimas indetectables tanto en varones como en mujeres y cifras máximas de 1 % para los varones (masculino de 45 años) y de 2% en una mujer de 33 años.

En otras investigaciones realizadas se cita el establecimiento de valores de referencia por Weng y Huang (2019) sus cifras oscilan de 0-0.5% para Hb Fetal masculino y de 0-1 % en la mujer, hallándose similitud entre esta investigación y la de Weng.

La Hb A1c presentó un promedio de 5.29% en las edades de 19-29 años, donde el sexo masculino reporto un promedio de 5.36, con un mínimo de 5.1 y un máximo de 5.8, en el femenino el promedio es de 5.2 y el valor mínimo fue de 4.7% con un máximo de 5.5

Para la edad de 30-40 años la A1c presentó un promedio de 5.1% en las edades de 30-40 años, donde el sexo masculino reportó un promedio de 5.9%, con un mínimo de 4.4% y un máximo de 5.4%, en el femenino el promedio es de 5.2% y el valor mínimo fue de 4.7% con un máximo de 5.5%.

Al describir la distribución por grupo etario se observó que para la Hb A₁ hay un descenso conforme la edad en ambos sexos, para la Hb A₂ aumenta en la mujer con un ligero descenso luego de los 63 años

y definitivamente disminuye en el varón con un ligero incremento hacia los 63 años sin llegar a las cifras iniciales de los 19 años.

Por grupo etario fue la mujer entre 30-40 años quien mostró valores promedios más altos de Hb Fetal, con 1.4% y en varones de 41-51 años los que reportaron valores máximos con 0.76%, su tiempo de retención fue de 0.448 ,en todo momento los tiempos de retención coincidieron con la literatura consultada y con las recomendaciones del fabricante (ver tabla 2)

La determinación de Hb A₂ juega un papel importante al momento de clasificar o detectar una hemoglobinopatía y quizás en algunos países no se le ha dado la trascendencia necesaria (Giambona 2009) con sus cifras es posible detectar alteraciones pequeñas que apuntan al diagnóstico de beta talasemia.

En todos los valores proporcionados por el equipo encontraron 2 tipos de resultados, los que estaban por encima de los esperados en la glicohemoglobina Fracción A1c y los que mostraron otras fracciones como Hb S y C, los que resultaron normales según los parámetros brindados por el equipo fueron considerados apropiados para establecer una línea de base de rangos o intervalos de referencia para las fracciones Hb A₁, A₂ y Hb F.

TABLA 2
Resultados de los cromatogramas encontrados en el equipo HPLC-BioRad D-10

Denominación de Ventanas (Picos)	Tiempo de retención (minutos)
A1a	0.20
F	0.448
A1b	0.285
Pico 3	1.515
A ₀	1.67
A ₂	3.07
A1c	0.89
S	4.1
C	4.016

Fuente: Promedios de resultados de pacientes participantes en la feria

En la tabla 2 se observa los tiempos promedios obtenidos durante el muestreo a los 72 sujetos sanos, los mismos son comparables con otros estudios realizados y con los tiempos permitidos por la casa fabricante.

En otro artículo se abordará los resultados anormales de este muestreo ya que este persigue obtener un comportamiento para las fracciones normales o valores de referencia.

Respecto a las ventajas y beneficios de esta investigación es importante señalar que el método HPLC se encuentra como uno de los más relevantes y elegidos al momento de escoger una metodología apropiada para determinar las fracciones esencialmente para la Hb A_{1c}. En esta investigación además se citan valores de

glicohemoglobina en sanos con rangos desde 5.32 como promedio en ambos sexos, de 0.8 a 5.8 en los varones y de 4-5.8 en la mujer entendiéndose que estos valores serían considerados valores de comportamiento normal en sujetos sanos nicaragüenses en las edades citadas para este grupo analizado del Distrito II. En la tabla 1 se puede profundizar sobre los comportamientos encontrados por edad.

Una consideración importante en este estudio es la presencia en los cromatogramas de una fracción denominada A₃ o Pico 3 que corresponde al nivel de hemoglobina degradada que idealmente debería ser inferior al 10% para informar del valor de la hemoglobina glicada. Se forma debido a la modificación post traslacional de la hemoglobina adulta y los niveles aumentan a medida que las muestras envejecen o más de la hemoglobina se degrada; el nivel de modificaciones post traslacionales aumenta aún más con el aumento de la concentración de glucosa en sangre dentro de los glóbulos rojos, Gupta M (2016). Ver figura 5.

Gupta M, estudió esa fracción en sanos en el año 2016 en investigación P₃: Efecto sobre los valores de HbA_{1c} por HPLC, este trabajo se relaciona con el presente estudio debido a que al inicio de la investigación al excluir grupos se observó el fenómeno mencionado por Gupta. En la figura 5 se aprecia entre el 0.81 y el 1.67 minutos sobre el tiempo de retención citado.

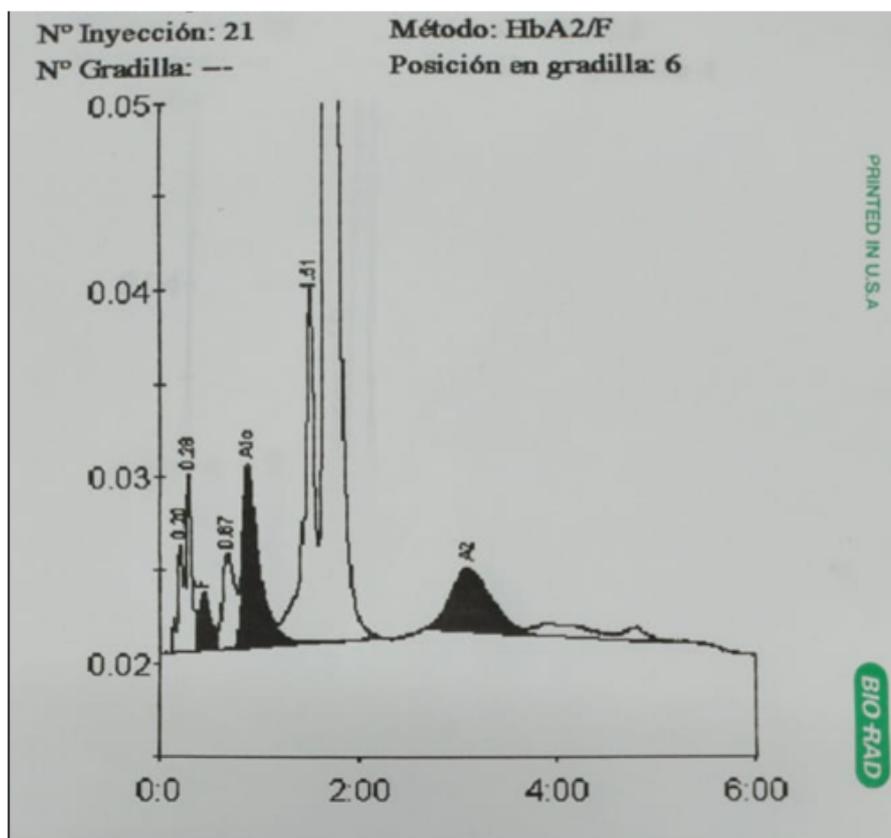


FIGURA 5
Picos del cromatograma

Fuente: Resultado HPLC de participantes en feria POLISAL. 2020

Un analista debe prestar atención a una anomalía de la forma o del tiempo de retención de los picos cromatográficos, causados por unos valores de HbA_{1c} desproporcionados. Cualquier discordancia debe hacer pensar en una anomalía cuantitativa o cualitativa de la hemoglobina, que debe llevar a su búsqueda y caracterización. En función de esto, el resultado de la HbA_{1c} podrá ser aceptado o no. (Benito-Godino, y otros, 2014).

TABLA 3
Resultados de los cromatogramas encontrados

Pico	T ⁰ Retención	Altura	Área	% Área
A1a	0.20	5762	18145	0.7
A1b	0.28	9489	38572	1.4
F	0.44	3065	23547	<0.8*
LA1c/CHb-1	0.67	5095	42819	1.5
A1c	0.88	9551	108196	5.6
P3	1.51	18827	142415	5.1
A0	1.67	436063	2314865	83.2
A2	3.10	3409	94892	3.1
Área Total	2783450			

Fuente: Resultados obtenidos de procesamiento mediante HPLC.

En todos los casos que se encuentren pico 3 los valores permisibles de acuerdo a estudios efectuados por Gupta debe ser un valor del % de Área inferior a 10%, en esta figura se acepta adecuado el valor de la glicohemoglobina ya que sus valores son de 5.65 y el pico 3 fue de 5.1

Según Erkan Coban (2004) existen otros factores que pueden afectar las fracciones de Hemoglobina especialmente el demuestra que la medición en sujetos sanos con anemia por déficit de hierro afecta los niveles de Hb A₁C, éste evaluó el comportamiento de la fracción antes y después del tratamiento con Fe encontrándose que la cifra disminuye después del tratamiento con hierro.

Los niveles de HbA₁c se ven afectados por hemoglobinas variantes, anemia hemolítica, anemias nutricionales, uremia, embarazo y pérdida aguda de sangre.

De acuerdo a Guo W, 2019 el recambio de hematíes en médula ósea, la calidad, variación y los parámetros biológicos relacionados como edad, sexo, IMC y complicaciones e inducir la peroxidación, la deficiencia de hierro acelera la glicación

En el año 2020, Sakamoto estudió la asociación de anemia y Hemoglobina con Hb A1c entre trabajadores no diabéticos en Japón, encontraron Hb A1c elevada entre los anémicos sin embargo los sanos con niveles más bajos de hb tenían niveles más altos de Hb A1c lo que sugiere que la interpretación de los valores de Hb A1c debe ser cuidadosamente examinada y valorada entre los no anémicos.

Little (2009) expresa desde su perspectiva que hay que estudiar más profundamente la influencia de otras hemoglobinas en la Hb A1c, Mphamed R (2018) sugiere que se estudie la relación entre los valores estándar de la Hb A1C con las otras fracciones .

Por otro lado la diabetes mellitus es una patología más frecuente de lo que la población conoce, sin embargo refiriéndose a las propiedades de la hemoglobina entre ellas su grado de glicosilación (una adición no enzimática de la glucosa) que da un derivado denominado Hb A₁c se utiliza para detectar y monitorear el nivel a largo plazo del aumento de glucosa en las personas con diabetes , por ello esta investigación parte del

hecho de utilizar una metodología combinada que ofrece el sistema HPLC que permite obtener fracciones de Hb tanto glicosilada como no glicosiladas, Little J (2013). Ver cromatograma 1.

Al inicio de la investigación se decidió poner un criterio de partición, como se utilizó el equipo D10 resultado apropiado dividir el grupo de personas estudiadas en 2 subgrupos quedándose únicamente la investigadora con aquellas personas que presentaron sus niveles de hemoglobina glicosilada normal, ya que este sería una aproximación al comportamiento normal de las fracciones de hemoglobina en sujetos nicaragüenses.

Si bien la electroforesis es de gran utilidad para la separación cuantitativa de las hemoglobinas F, A₂, S y C, presenta problemas ante la presencia de otras variantes de hemoglobinas menos usuales que migran a la misma velocidad que la HbS. Este inconveniente se resuelve perfectamente mediante HPLC que además de ser un método totalmente automatizado y rápido es aceptado a nivel mundial.

Al respecto investigación efectuada por Joutovsky A. (2004) analizó los tiempos de retención, la proporción de hemoglobina total (%) y las características de los picos, encontrando una imprecisión (CV) media (DE) del tiempo de retención de 1,0 (0,7)% sin diferencia estadística en comparación con la imprecisión para los tiempos de retención normalizados, el define el tiempo de retención como el tiempo en minutos desde la inyección de la muestra hasta el punto máximo del pico de elución, de fracciones de hemoglobina normales y variantes comunes. El tiempo de retención en HPLC es confiable, reproducible y en muchos casos superior a la electroforesis de hemoglobina convencional para la detección e identificación de variantes de hemoglobina.

(Joutovsky, 2004) ha recomendado que los individuos de todos los grupos étnicos, excepto los caucásicos del norte de Europa, se examinen para detectar hemoglobinas variantes, todos los grupos étnicos para el rasgo de β -talasemia y grupos étnicos seleccionados para el rasgo de α -talasemia.

En cuanto a la Hb A₂ Vella, F. (1977). realizó un estudio que interesa citar ya que después de esta investigación se propone realizar otro estudio a fin de conocer sub fracciones de Hb A₂ dada la distribución de personas de raza negra en nuestro país sobre todo en la Costa Atlántico Norte y Sur.

Vella describe la estructura, propiedades y función y algunos aspectos biosintéticos y genéticos de la Hb A₂. Se revisan las variantes estructurales de Hb A₂ y se presenta su distribución geográfica. Hb A₂, Hb A₂-Flatbush (Joutovsky, 2004) y Hb A₂-Babinga son características de las poblaciones de negros y pueden haberse originado en África occidental o central. La Hb A₂-Sphakia es característica de las poblaciones amerindias canadienses y la Hb A₂-Indonesia de las poblaciones indonesias / malayas. La Hb A₂-NYU solo se ha encontrado esporádicamente y con mayor frecuencia en personas de origen europeo del este. Figuereido M (2015) considera importante medir la Hb A₂ para diagnosticar el rasgo beta-talasemia Figueiredo, María (2015).

La Hb A₂ se puede medir mediante varios métodos de laboratorio, pero estos métodos tienen diferencias de precisión. Intercambio catiónico cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en microcolumna y electroforesis en acetato de celulosa con elución se consideran métodos aceptables para diagnosticar posibles talasemias, mientras que la electroforesis en acetato de celulosa seguida de la densitometría de barrido no lo es.

La electroforesis en acetato con elución depende de la formación y experiencia del técnico de laboratorio que realiza de ahí la importancia de promover el uso de HPLC estandarizada con el empleo de calibradores normales y anormales además de una rigurosa corrida de las muestras.

Tanto la prueba por electroforesis y la cromatografía en microcolumna pueden dar problemas con coelución de algunas variantes de Hemoglobina. Estudios recientes han confirmado la mayor calidad de la HPLC automatizada en la medición de Hb A₂ en comparación con la otros métodos, por lo que este se ha convertido en el método de elección, Por otro lado, en HPLC automatizada, la medición de Hb A₂ es inexacta cuando está presente Hb S.

Como la cantidad de Hb S en porcentajes está relacionada con el grado de inexactitud, los niveles son más altos en pacientes con anemia de células falciformes (SCA) o Hb S / -talasemia (S-Thal) que en el rasgo de

células falciformes. La cantidad de Hb A₂ no indica ser portador de rasgo talasémico pero hace sospechar utilizando la clínica y los resultados relevantes del hemograma además de sintomatología imprecisa que hace sospechar al médico cuando Hb A y las variantes del gen beta se encuentran juntas.

CONFLICTO DE INTERESES Y AGRADECIMIENTOS

La presente investigación no tiene conflicto de intereses por parte de ninguno de sus autores.

Agradecimiento a Fondos FPI de la UNAN Managua por financiar este proyecto de Investigación, cuyo fruto final fue convenio con el Hospital Infantil La Mascota a quienes se les está realizando la evaluación de las muestras de pediatría en sospechosos de padecer hemoglobinopatías. Agradecimiento a la empresa DIALMED Nicaragua por la donación de parte del material utilizado en esta feria de Salud.

CONCLUSIONES

Se efectuó determinación de fracciones de Hemoglobina a sujetos sanos encontrándose 96.03% para la Fracción Mayor A₁, 5.32% para la Hb A_{1c}, 2.92% para la Fracción A₂, 0.734% para la fracción menor que corresponde a la Hb Fetal. Se encontró que el método HPLC resultó ser un procedimiento muy estable de rápida realización y permite la clasificación en fracciones de Hb obteniendo subfracciones y variantes de hemoglobina normal y anormal. Se obtuvo valores de Hb A₂ ligeramente superiores a los citados en la literatura internacional excediéndose en 0.5 % más de lo referido, lo cual requiere otra investigación a nivel departamental con mayor número de sujetos para corroborar este dato. La Hb Fetal mostró en la mujer de edad de 30 años un mayor porcentaje de 1.4 % Los porcentajes de Hemoglobinas A₁ son comparables con el resto de autores, la Hb A₂ se vio afectada con la edad, aumenta en las mujeres y disminuye cerca de los 63 años, en los varones fue inverso se encontró disminución y un ligero incremento hacia los 63 años.

BIBLIOGRAFÍA

- Azevedo A, S. P., & V, T. (2010). Valores de referencia para hemograma en una población metropolitana de Lisboa. *Acta Medica Portuguesa*, 597-604.
- B.Amor, H, M., B, H., I, G., & R. (2012). Valores de referencia en 1000 adultos. *Pasteur Tunis*, 47-61.
- Benito-Godino, A. S., Vergara Chozas, J. M., Marquez Ronchel, A., Barrero-Alor, F., Papay Ramirez, L., Coronado Alvarez, N. M., y otros. (2014). Multicentre evaluation og glycated haemoglobin (HbA_{1c}) of Roche Diagnostics in Andalusia. *Clinical Biochemistry*, 4;4C.
- BIO_RAD. (23 de septiembre de 2010). *Manual de operaciones BIORAD D10 Quimica Clinica*. Recuperado el 23 de agosto de 2020, de <http://mdkhospital.com/documents/Hemoglobin%20A1c%20D10.pdf>
- Ciesla, B. (2007). *Hematology in practice*. Philadelphia: F.A.Davis Company /www.fadavis.com.
- Figuereido, M. S. (2015). The importance of hemoglobin A₂ determination. *Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia*, 287-9.
- Greer, J. P., Arber, D. A., & Gladel, B. (2014). *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott.
- Hamid, G. A. (2013). *Clinical hematology*. Yemen: ADEN UNIVERSITY.
- IFCC Federación Internacional de Quimica Clinica. (2016). IFCC. *SEQC*.
- J.M.Vergara, & A, S.-b. (s.f.). Comparación de los resultados de hemoglobina glicada por dos sistemas de cromatografía líquida HPLC. *Journal Congreso España*.
- Joutovsky, M. (2004). HPLC Retention Time as a Diagnostic Tool for Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies: A Study of 60000 Samples in a Clinical Diagnostic Laboratory. *AACC's Clinical Chemistry*. Vol 50 (10). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.034991>

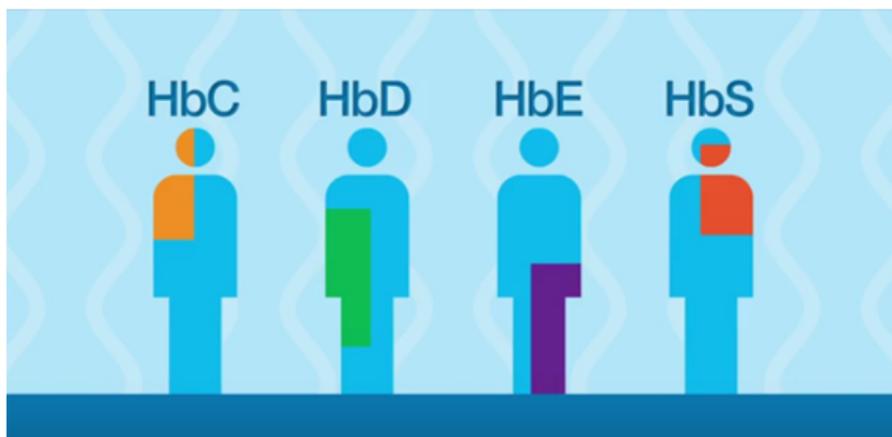


Figura 2. Fraccionamiento de las hemoglobinas utilizando Equipo D-10 para fracciones variantes.
Tomado de BIORAD

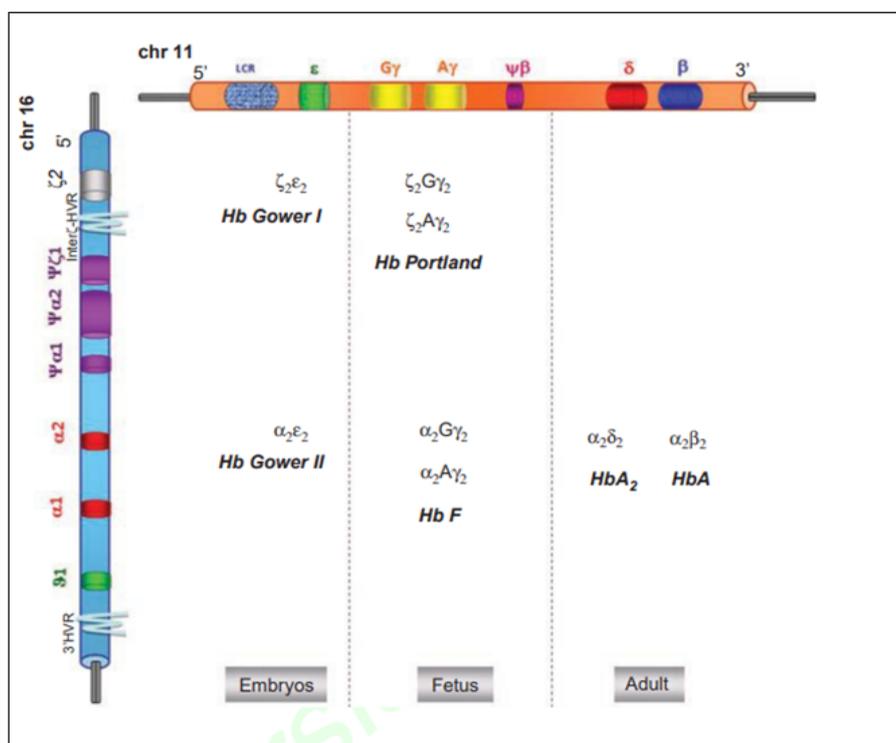


Figura 3. Genes de hemoglobina humana
Fuente: (Greer, Arber, & Gladel, 2014)