

## TÉCNICAS

Instituto Superior de Ciencias Médicas, Villa Clara

### SEPARACIÓN DE HEMOGLOBINA A<sub>2</sub> Y HEMOGLOBINA C POR CROMATOGRAFÍA EN CARBOXIMETILCELULOSA (CM-52) CON AMORTIGUADOR IMIDAZOL-HCL-KCN-NACL

*Lic. Jorge Cabrera Llano, Dra. Maricel Castellanos González y Dr. Sc. Pedro. C. Hidalgo Calcines*

#### RESUMEN

Se ensayó una nueva técnica macrocromatográfica en carboximetilcelulosa y amortiguador imidazol-HCl-KCN-NaCl a pH 6,7. La técnica es confiable y exacta para la separación y cuantificación de hemoglobina A<sub>2</sub> en individuos portadores de hemoglobina AC, C $\beta$  talasemia, hemoglobina AS y hemoglobina SC, lo cual es en muchos casos de interés clínico. También se detectó una variante de hemoglobina A<sub>2</sub> en una embarazada portadora de hemoglobina AC y un gen  $\beta$  talasémico en Cis con el gen para la hemoglobina C.

Descriptores DeCS: CROMATOGRAFIA/métodos; HEMOGLOBINA A<sub>2</sub>/análisis; HEMOGLOBINA C/análisis.

El diagnóstico de las  $\beta$  talasemias ha sido bien establecido y estudiado en individuos portadores de hemoglobina AS (HbAS) mediante la cuantificación de la hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) por macro y microcromatografía.<sup>1,2</sup> En cambio, en los portadores de la hemoglobina AC (HbAC), la cuantificación de la HbA<sub>2</sub> resulta muy difícil, porque ambas hemoglobinas coeluyen en la mayoría de los métodos cromatográficos, excepto la cromatografía de alta presión líquida<sup>3</sup> y la utilización de un gradiente de pH en carboximetilcelulosa (CM-52) con amortiguador fosfato.<sup>4</sup> También los métodos electroforéticos resultan inefectivos para separar la hemoglobina C (HbC) de la HbA<sub>2</sub>.<sup>1</sup>

Tomando en consideración nuestras condiciones técnicas en el laboratorio decidimos ensayar la cromatografía de *Abraham* y otros<sup>4</sup> a escala micro para cuantificar la HbA<sub>2</sub> en individuos que contienen HbC en sus eritrocitos, pero nuestro intento fue ineficaz porque la técnica fue muy sensible a los cambios de pH. Por esta razón ensayamos otros sistemas amortiguadores utilizando carboximetilcelulosa (CM-52) para encontrar una técnica macrocromatográfica que fuera aplicable posteriormente a escala micro. El sistema imidazol-HCl-KCN-NaCl resultó ser idóneo. Los resultados obtenidos mediante macrocromatografía a 20 muestras de sangre portadoras de HbAC son el motivo de este informe.

## MÉTODOS

Se determinó la concentración porcentual de HbA<sub>2</sub> a 20 muestras de sangre, provenientes de las embarazadas heterocigóticas con HbA y C detectadas en el pesquisaje que se realiza en nuestro laboratorio, para la prevención de la anemia por hemáties falciformes. De estas muestras, una resultó ser portadora de  $\beta$  talasemia y otra tuvo una  $\beta$  talasemia más una variante de HbA<sub>2</sub>.

Todos nuestros resultados fueron corroborados por cromatografía en CM-celulosa CM-52, con un gradiente de pH según *Abraham* y otros.<sup>4</sup>

Nuestra cromatografía se ensayó también con un hemolizado de un heterocigótico para la HbS y C y con otro que contenía HbAS.

Para la cromatografía se preparó un amortiguador inicial que consistió en imidazol-HCl 0,02 mol/L, al que se le añadió KCN al 0,01 % (p/v) y se le ajustó el pH a 6,7.

Se pesaron 80 g de carboximetilcelulosa (CM-52) (Whatman) y la resina se suspendió en el amortiguador sólo en cantidad suficiente para formar una solución semipastosa, ésta se vertió completamente en una columna cromatográfica de vidrio de 1,6 x 50 cm, se empaquetó bajo presión y se ajustó a una altura de 25 cm. Entonces se equilibró con el amortiguador inicial de pH 6,7 a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Se diluyeron 40 mg de hemolizado en 1 mL de amortiguador inicial y se colocó en una bolsa de diálisis. La diálisis se realizó a 4 °C en 250 mL de amortiguador durante toda la noche.

La solución dializada del hemolizado fue aplicada a la superficie superior de la resina equilibrada y se dejó penetrar por gravedad.

Se aplicó un gradiente lineal de NaCl formado al mezclarse 700 mL de amortiguador inicial y 700 mL de amortiguador limitante (imidazol-HCl 0,02 mol/L KCN 0,01 % (p/v) -NaCl 0,08 mol/L pH 6,7), con una velocidad de flujo de 0,5 mL/min durante 36 h.

Se colectaron fracciones de 5 mL y la densidad óptica se determinó a 415 nm. Las fracciones correspondientes a cada pico fueron reunidas y conservadas a -20 °C en frascos plásticos para comprobar su identidad fenotípica mediante otras técnicas.<sup>5,6</sup>

La obtención del hemolizado y la centrifugación se realizó según el método descrito por *Schroeder* y otros.<sup>7</sup>

## RESULTADOS

La tabla muestra los resultados al aplicar la prueba t de Student para muestras apareadas. Al parecer, dado el pequeño número de muestras, no hay diferencia significativa entre las 2 técnicas cromatográficas.

TABLA. Resultados de la cromatografía con amortiguador imidazol HCl-KCN-NaCl y con amortiguador fosfato<sup>4</sup>

Sistema	n	Media %	$\Sigma^2$	$t_c$	$t_{0,05}^{18}$
Gradiente salino	20	3,40	240,32	0,98	2,10
Gradiente pH	20	3,48	242,82		

En la figura 1 se presenta el cromatograma de una muestra de sangre de una embarazada heterocigótica para el gen  $\beta^c$  y un gen  $\beta$  talasémico, con un valor porcentual de HbA<sub>2</sub> de 5,04 %; esto se corroboró mediante la técnica de *Abraham*. Las concentraciones de HbC y HbA fueron 50(C<sub>1</sub> + C<sub>0</sub>) y 43 % respectivamente.

Las fracciones obtenidas en ésta y las siguientes cromatografías fueron concentradas y comprobadas por electroforesis en gel de almidón<sup>5</sup> y por electroenfoque.<sup>6</sup>

El cromatograma que aparece en la figura 2 mostró que además de la HbA, HbC<sub>1</sub>, HbC<sub>0</sub> y la HbA<sub>2</sub> (2,1 %) hay una variante de HbA<sub>2</sub> (3,3 %) que eluyó a una concentración salina más alta, lo que indica que tiene un punto isoelectrico mayor

que el de la HbA<sub>2</sub> normal. La concentración de Hb(C<sub>1</sub> + C<sub>0</sub>) fue 26,7 %.

La cromatografía del hemolizado de una embarazada con fenotipo SC dio una buena separación para las HbA<sub>2</sub>, HbS, HbC<sub>1</sub> y HbC<sub>0</sub> (fig. 3).

La separación óptima de la HbA<sub>2</sub> en un hemolizado con fenotipo AS requirió un amortiguador limitante con una concentración salina menor, la cual fue 0,065 mol/L de NaCl (fig. 4).

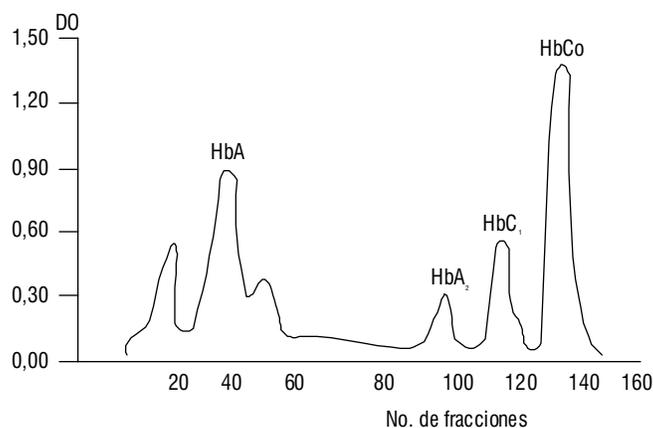


Fig. 1. Cromatograma de una muestra de sangre hemolizada heterocigótica para el gen  $\beta$  talasémico. Amortiguador inicial: imidazol-HCl 0,02 mol/L-KCN 0,01 % (p/v) pH 6,7 amortiguador limitante: imidazol-HCl 0,02, mol/L-KCN 0,01 % (p/v)-NaCl 0,08 mol/L pH 6,7.

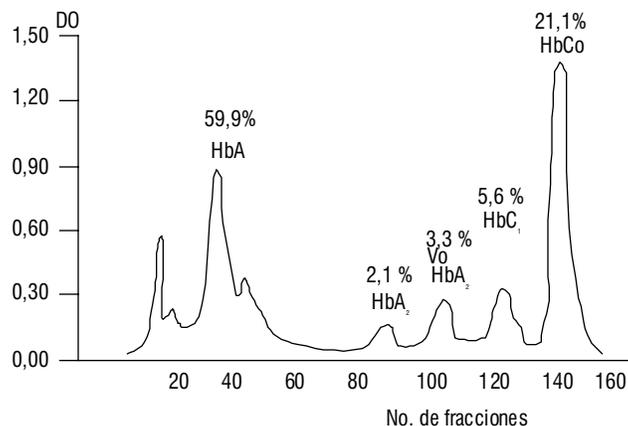


Fig. 2. Cromatograma de un hemolizado con HbAC y una variante de HbA<sub>2</sub>. Amortiguador inicial: imidazol-HCl 0,02 mol/L-KCN 0,01 % (p/v) pH 6,7. Amortiguador limitante: imidazol-HCl 0,02 mol/L-KCN 0,01 % (p/v)-NaCl 0,08 mol/L pH 6,7.

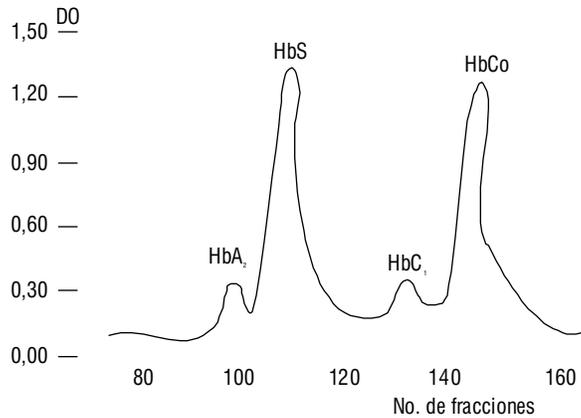


Fig. 3. Cromatograma de un hemolizado con fenotipo HbSC. Amortiguador inicial: imidazol-HCl 0,02 mol/L-KCN 0,01 % (p/v) pH 6,7. Amortiguador limitante: imidazol-HCl 0,02 mol/L-KCN 0,01 % (p/v)-NaCl 0,08 mol/L pH 6,7.

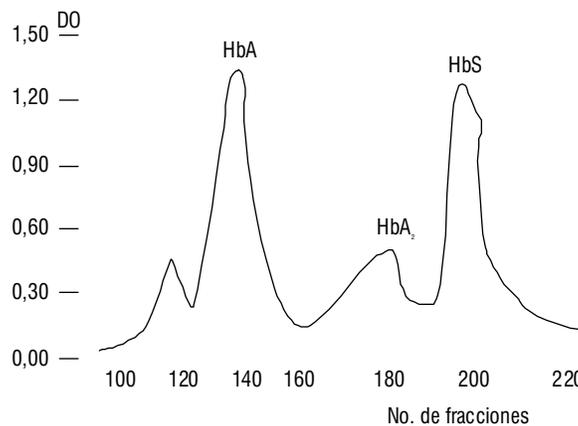


Fig. 4. Cromatograma de un hemolizado con fenotipo HbAS. Amortiguador inicial: imidazol-HCl 0,02 mol/L-KCN 0,01 % (p/v)pH 6,7. Amortiguador limitante: imidazol-HCl 0,02 mol/L-KCN 0,01 % (p/v)-NaCl 0,065 mol/L pH 6,7.

## DISCUSIÓN

El análisis estadístico realizado a nuestros resultados (tabla), indica que la macrocromatografía con amortiguador imidazol-HCl-KCN-NaCl a pH 6,7 es adecuado para la cuantificación de la HbA<sub>2</sub>. El valor porcentual medio para la HbA<sub>2</sub>

(X = 3,40 %) fue ligeramente menor que el obtenido por la cromatografía de Abraham y otros (X = 3,48 %). Ello puede deberse a que el efecto de competencia de los iones cuando se utiliza la separación por un gradiente salino es más eficiente que el que se alcanza por un cambio de pH.

El resultado mostrado en la figura 1 indica que nuestra técnica es útil para la detección de las C/ $\beta$  talasemias, pues hay buena separación entre todas las fracciones hemoglobínicas. Esta paciente tuvo valores bajos de Hb, concentración de Hb corpuscular media (CHCM) y hematócrito (Hto) que indican una ligera anemia (resultados no mostrados).

La buena resolución obtenida con el fenotipo HbAC nos hace pensar que probablemente otras variantes con sustitución de Glu—Lis y movilidad electroforética análoga a la HbC a pH alcalino, puedan ser separadas de la HbA por esta técnica.

Con nuestro sistema amortiguador pudimos detectar una variante de HbA<sub>2</sub> (fig. 2).

La fracción HbA<sub>2</sub> + variante tuvo un valor porcentual total de 5,4 %. La CHCM en este paciente fue baja, lo que indica la posible presencia de un gen  $\beta^+$ tal.

La concentración de HbC fue inferior al 30 % por lo que consideramos que el gen  $\beta^+$ tal se encuentra en Cis con el gen para la HbC. Descartamos la posible presencia de  $\alpha$  tal porque la concentración porcentual total de HbA<sub>2</sub> en nuestro paciente fue alta.

Nuestro gradiente salino descrito en los métodos posibilitó la separación y cuantificación de la HbA<sub>2</sub> en un individuo portador de HbS y HbC, por lo que la técnica es recomendable en estos casos (fig. 3). En cambio, la cuantificación de

la HbA<sub>2</sub> en una muestra con fenotipo hemoglobínico AS requirió un gradiente salino límite de 0,065 mol/L para una buena separación entre las HbA, HbA<sub>2</sub> y HbS. Según *Perutz*,<sup>8</sup> todos los residuos de ácido glutámico en las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  están en la superficie de la molécula. Por tanto, la sustitución Glu—Lis (HbS) se adsorbe menos fuertemente a los grupos carboxilatos de la resina que la sustitución Glu—Lis (HbC), ya que la Lis facilita el acceso del grupo  $\epsilon$  amonio cuaternario a los aniones carboxilatos de la CM celulosa.

De acuerdo con lo anterior, hay mayor diferencia eléctrica entre la HbA y HbC que entre la HbA y la HbS. Como que la HbA<sub>2</sub> en nuestro sistema cromatográfico eluye entre la HbA y la HbS o entre la HbA y la HbC es preciso un gradiente salino más bajo para lograr una mayor resolución en el caso de los heterocigóticos AS. Hemos comprobado que nuestro amortiguador puede ser utilizado con éxito en la cuantificación de HbA<sub>2</sub> a individuos portadores de HbC por microcromatografía.<sup>9</sup>

En conclusión, la macrocromatografía en carboximetilcelulosa con amortiguador imidazol-HCl-KCN-NaCl a pH 6,7 permite cuantificar la HbA<sub>2</sub> a individuos portadores de HbAC y HbAS. La técnica posibilita detectar la presencia de  $\beta$  talasemia e incluso variantes de HbA<sub>2</sub> con exactitud.

## SUMMARY

A new macrochromatographic technique was assayed in carboxymethylcellulose and damperer iminazole-HCL-KCN-NaCL at 6,7 pH. This technique es reliable and exact for A<sub>2</sub> hemoglobin separation and quantization in individuals carrier of AC hemoglobin, C Beta-thalasseamia, AS hemoglobin, and SC hemoglobin, whick, in many cases es of clinical interest. Also, a variant of A<sub>2</sub> hemoglobin was detected in a pregnant woman carrier of AC hemoglobin, and a Beta-thalassemic gen in Cis with the gen for C hemoglobin.

Subject headings: CHROMATOGRAPHY/ methods; HEMOGLOBIN A<sub>2</sub>/ analysis; HEMOGLOBIN C/ analysis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Basset P. An update on electrophoretic and chromatographic methods in the diagnosis of hemoglobinopathies. *J Chromatogr* 1982;227:267-304.
2. Mora L, Ramírez ME, Jiménez R. Comparación de métodos para la cuantificación de hemoglobina A<sub>2</sub>. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1990;47(3):168-72.
3. Schroeder WA, Shelton JB, Shelton JR, Hnyh V. The estimation of HbA<sub>2</sub> in the presence of HbC or HbE by reverse phase high performance liquid chromatography. *Hemoglobin* 1986;10(3):253-7.
4. Abraham EC, Huisman THJ, Schroeder WA. Detection of some uncommon hemoglobin variants and two rapid methods for the quantitation of HbA<sub>2</sub> in the presence of HbC. *J Chromatogr* 1973;143:57-63.
5. Lehman H, Huntsman RG. *Man's haemoglobins*. Amsterdam North Holland Publishing, 1966.
6. Basset P, Bauzard Y, Gard MC, Rosa J. Isoelectric focusing of human hemoglobin: its applications to screening to the characterization of 70 variants and to the study of modified fractions of normal hemoglobin. *Blood* 1978;51(5):971-80.
7. Schroeder WA, Pace LA, Huisman THJ. Chromatography of hemoglobins on CM-cellulosa with Bis-Tris and Sodium chlorite developers. *J Chromatogr* 1976;118:295-302.
8. Perutz MF, et al. Three/dimensional Fourier Syntesis of Horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: The atomic model. *Nature* 1968;219:131-9.
9. Cabrera J, Castellanos M, Hidalgo PC. Técnica microcromatográfica en carboximetilcelulosa CM-52 para cuantificar la hemoglobina A<sub>2</sub> en individuos con hemoglobina AC. *Rev Medicentro* 1995 (en prensa).

Recibido: 10 de agosto de 1998. Aprobado: 29 de septiembre de 1998.

Lic. *Jorge Cabrera Llano*. Bonachea entre 3ra. y 5ta, Reparto Escambray, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.