

Resistencia osmótica eritrocitaria en el diagnóstico de anemias hereditarias en Tucumán, Argentina*

Red cell osmotic resistance in the hereditary anemias diagnosis in Tucumán, Argentina

Resistância osmótica eritrocitária no diagnóstico de anemias hereditárias em Tucumán, Argentina

► Sandra Stella Lazarte¹, Mónica Leri de Nofal², Cecilia Jiménez³, Ana Cecilia Haro⁴, Mariana Burgos⁵, Blanca Issé⁶

¹ Doctora en Bioquímica. Bioquímica Especialista en Hematología.

² Bioquímica. Especialista en Hematología. UNT.

³ Bioquímica. Especialista en Bioquímica Clínica-Modalidad Residencia. UNT.

⁴ Doctora en Bioquímica.

⁵ Estudiante de la Carrera de Bioquímica. UNT.

⁶ Doctora en Bioquímica. Bioquímica Especialista en Hematología.

* Instituto de Bioquímica Aplicada. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Balcarce 747. San Miguel de Tucumán. CP 4000.

Resumen

Las anemias hereditarias más frecuentes en Tucumán (Argentina) son el rasgo beta talasémico (RBT), las hemoglobinopatías estructurales (HBP) y la esferocitosis hereditaria (EH). La resistencia osmótica eritrocitaria inmediata y 24 horas post-incubación constituye el método diagnóstico de la EH, y como tubo único (ROETU) es usada para cribado de RBT. El propósito del trabajo fue determinar el comportamiento de ROETU (4,0 y 5,5 g/L de NaCl) en el diagnóstico de anemias hereditarias. Se estudiaron 125 pacientes: 34 normales (GN), 59 con RBT (GRBT), 21 con HBP (GHBP) y 11 con EH (GEH), que fueron agrupados en niños (≤ 12 años), mujeres y hombres (> 12 años). Se realizaron hemograma (Coulter AcT10 y Sysmex KX-21N), índices de Mentzer y de Shine&Lal, ROETU, hierro, transferrina y saturación de transferrina (Wiener Lab), reticulocitos (azul brillante de cresilo), prueba de falciformación y electroforesis de hemoglobina a pH alcalino y ácido. GRBT presentó anemia microcítica hipocrómica, y GEH y GHBP, anemia normocítica normocrómica. El hierro fue normal. GRBT y GHBP fueron resistentes en ROETU 4,0 g/L, aunque GRBT mostró mayor resistencia ($p < 0,05$). GEH fue menos resistente que GN en ROETU 5,5 g/L ($p < 0,05$). ROETU 4,0 y 5,5 g/L serían recomendables en el diagnóstico presuntivo de RBT y EH, respectivamente.

Palabras clave: resistencia osmótica eritrocitaria * anemias hereditarias * beta talasemia * esferocitosis hereditaria * hemoglobinopatías estructurales

Summary

Beta thalassaemia trait (BTT), structural hemoglobinopathies (SHB) and hereditary spherocytosis (HS) are the most frequent hereditary anaemias in Tucumán (Argentina). Immediately and 24 hours post-incubation red cell osmotic resistance is the diagnosis method of HS, and as a single tube (RORST), it is used for

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

BTT screening. The purpose of this study was to determine the RORST (NaCl 4.0 and 5.5 g/L) behaviour in the diagnosis of hereditary anemia. The study encompassed 125 patients : 34 normal patients (NG), 59 with BTT (BTTG), 21 with SHB (SHBG) and 11 with HS (HSG), who were divided into children (≤ 12 years), women and men (> 12 years). Blood count (Coulter AcT10 and Sysmex KX-21N), Mentzer and Shine&Lal indexes, RORST, iron, transferrin and transferrin saturation (Wiener Lab), reticulocytes (brilliant cresyl blue), sickling and hemoglobin electrophoresis at alkaline and acid pH were performed. BTTG showed hypochromic microcytic anemia, and SHBG and HSG, normochromic normocytic anemia. Iron was normal. BTTG and SHBG were resistant in RORST 4.0 g/L, but BTTG showed more resistance ($p < 0.05$). SHG was less resistant than NG at RORST 5.5 g/L ($p < 0.05$). RORST at values of 4.0 and 5.5 g/L would be recommended for the presumptive diagnosis of BTT and SH, respectively.

Key words: red cell osmotic resistance * hereditary anemia * beta thalassaemia * hereditary spherocytosis * structural hemoglobinopathies

Resumo

As anemias hereditárias mais comuns em Tucumán (Argentina) são o traço beta talassemia menor (BTM), as hemoglobinopatias estruturais (HBP) e esferocitose hereditária (EH). A resistência osmótica dos eritrócitos imediata e 24 horas pós-incubação é o método de diagnóstico da EH, e como um único tubo (ROETU) é usado para a detecção de BTM. O objectivo deste estudo foi determinar o comportamento de ROETU (4,0 e 5,5 g/L de NaCl) para o diagnóstico de anemias hereditárias. Foram estudados 125 pacientes: 34 normais (GN), 59 com BTM (GBTM), 21 com HBP (GHBP) e 11 com EH (GEH), que foram reunidos em crianças (≤ 12 anos), mulheres e homens (> 12 anos). Foi realizado hemograma (Coulter AcT10 e Sysmex KX-21N), índices de Mentzer e Shine&Lal, ROETU, ferro, transferrina e saturação de transferrina (Wiener Lab), reticulócitos (azul de cresil brilhante), teste de falcização e eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e ácido. GBTM mostrou anemia microcítica hipocrômica, e GEH e GHBP, anemia normocítica normocrômica. O ferro foi normal. GRBT e GHBP foram resistentes em ROETU 4,0 g/L, mas GBTM mostrou maior resistência ($p < 0,05$). GEH foi menos resistente que GN em ROETU 5,5 g/L ($p < 0,05$). ROETU 4,0 e 5,5 g/L seria recomendado para o diagnóstico presuntivo da BTM e EH, respectivamente.

Palavras-chave: resistência osmótica dos eritrócitos * anemias hereditárias * beta talassemia * esferocitose hereditária * hemoglobinopatias estruturais

Introducción

La prueba de resistencia osmótica eritrocitaria (ROE) proporciona una indicación de la razón volumen/superficie de los eritrocitos y refleja su capacidad para incorporar una cierta cantidad de agua antes de lisarse. La habilidad de los glóbulos rojos normales para resistir la hipotonicidad proviene de su forma bicóncava, lo cual permite que la célula aumente su volumen hasta un 70% antes de que la membrana se estire; una vez superado este límite ocurre la lisis (1). La prueba de ROE ha sido ampliamente usada en el diagnóstico de esferocitosis hereditaria (EH) (2) y en su modalidad tubo único (ROETU) como prueba de cribado para talasemia (3).

La EH es una anemia hereditaria común en el norte de Europa, caracterizada por la presencia de eritrocitos esféricos. El defecto molecular primario reside en la membrana del glóbulo rojo, particularmente en las proteínas involucradas en las interacciones verticales entre el esqueleto de la membrana y la bicapa lipídica.

Los defectos en estas interacciones provocan la pérdida de área de superficie y la forma esférica del eritrocito, con una particular pérdida de la estabilidad mecánica y elasticidad de la membrana. La herencia de la EH es autosómica dominante en la mayoría de los casos (75%) (4). Los esferocitos presentan una relación volumen/superficie aumentada, por lo que incorporan menos agua que los glóbulos rojos normales en una solución hipotónica antes de romperse (1).

La β -talasemia constituye un grupo de desórdenes sanguíneos hereditarios, caracterizados por anomalías en la síntesis de las cadenas beta de la hemoglobina (Hb), lo que resulta en fenotipos variados que van desde una anemia severa hasta individuos clínicamente asintomáticos. Se han descrito tres formas principales: talasemia mayor, talasemia intermedia y talasemia menor o rasgo beta talasémico (RBT). La β -talasemia es causada por mutaciones puntuales o, más raramente, por deleciones en el gen de la globina beta situado en el cromosoma 11, llevando a una síntesis reducida o ausente de las cadenas beta de la Hb. La transmisión es usualmente autosómica recesiva. El RBT es clínicamen-

te asintomático, pero algunos sujetos podrían presentar una anemia moderada (5). En la talasemia los glóbulos rojos microcíticos hipocrómicos son inusualmente resistentes a la lisis osmótica, debido a que presentan una razón volumen/superficie disminuida (1). Se han propuesto varias fórmulas basadas en el recuento sanguíneo para diferenciar la β -talasemia heterocigota de la anemia ferropénica (AF) (6)(7). Dichos índices de discriminación son calculados a partir del recuento de glóbulos rojos (RGR) y de los índices hematimétricos, volumen corpuscular medio (VCM) y hemoglobina corpuscular media (HCM). Se ha demostrado que los índices de Shine&Lal y de Mentzer son los más eficientes en el diagnóstico diferencial de RBT y AF en Tucumán (8).

Las hemoglobinopatías estructurales (HBP) constituyen un grupo heterogéneo de desórdenes recesivos, caracterizados por la síntesis de una cadena de globina estructuralmente anormal. Las variantes estructurales de Hb se basan típicamente en una mutación puntual en el gen de globina, que produce la sustitución de un aminoácido en una de las cadenas de globina. Aunque la mayoría son de un significado clínico limitado, unos pocos subtipos importantes han sido identificados con cierta frecuencia. Las hemoglobinopatías S o C homocigotas producen manifestaciones clínicas significativas, mientras que la D y E homocigotas podrían ser ligeramente sintomáticas (6). La Hb S tiene poca solubilidad en su estado desoxigenado y puede polimerizar dentro del eritrocito. El glóbulo rojo muestra un cambio de forma característico debido a la formación del polímero y se vuelve rígido transformándose en drepanocito. Además se producen cambios en la membrana y generación de sustancias oxidantes. La Hb C es una molécula con una carga altamente positiva, solubilidad disminuida y tendencia a cristalizar. En un extendido de sangre periférica de hemoglobinopatía C se observan células en diana y células contraídas irregularmente (9).

En trabajos previos se ha demostrado que la β -talasemia menor, las hemoglobinopatías S y C y la EH son las anemias hereditarias más frecuentes en Tucumán (10). Aunque los estados heterocigotos de las variantes de Hb son típicamente asintomáticos, el diagnóstico es importante para el consejo genético, debido a la gravedad de los estados homocigotos. En el presente estudio se evaluó el uso de la prueba de ROE tubo único (ROETU) como método de cribado para la detección de dichas anemias hereditarias.

Materiales y Métodos

DISEÑO

Se realizó un estudio observacional descriptivo, de corte transversal.

POBLACIÓN, MUESTRA Y CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Se estudiaron 91 pacientes que asistieron al Instituto de Bioquímica Aplicada para diagnóstico etiológico de anemia, y 34 sujetos normales, en el período comprendido entre noviembre de 2007 y junio de 2011. Se obtuvo un consentimiento informado para el uso de los resultados obtenidos, donde se garantizó el anonimato y confidencialidad. En el caso de los niños el consentimiento fue firmado por el padre o la madre.

De cada individuo se obtuvo una muestra de sangre. La muestra fue recolectada en EDTA tripotásico para la realización del hemograma, en heparina para la realización de la prueba de resistencia osmótica eritrocitaria (ROE) y otra alícuota sin anticoagulante para las determinaciones bioquímicas en suero.

La EH se diagnosticó mediante la observación de esferocitos en el frotis sanguíneo y el aumento de fragilidad de los glóbulos rojos en la prueba de resistencia osmótica eritrocitaria inmediata y post-incubación durante 24 horas a 37 °C. El diagnóstico de β -talasemia menor incluyó la presencia de microcitosis e hipocromía, y un aumento $\geq 4\%$ de la fracción de hemoglobina A_2 (HbA₂) en la corrida electroforética de hemoglobina. El diagnóstico de hemoglobinopatías se realizó a través del reconocimiento de bandas de hemoglobina con movilidad anormal en la electroforesis a pH alcalino, prueba de falciformación ante la sospecha de Hb S, y electroforesis a pH ácido para identificar las hemoglobinas anormales.

Una vez diagnosticados, los individuos se dividieron en 4 grupos: grupo con rasgo β -talasémico (GRBT), grupo con hemoglobinopatía (GHBP), grupo con esferocitosis hereditaria (GEH) y grupo normal (GN), los que a su vez fueron clasificados según la edad en mujeres y hombres (> 12 años) y niños (≤ 12 años).

ESTUDIOS HEMATOLÓGICOS

Hemograma e índices hematimétricos: Se realizó en contador hematológico marca Coulter AcT10 (Miami, Estados Unidos) en el período 2007-2008 y en Sysmex KX-21N (Kobe, Japón) durante el período 2009-2011. Para determinar la presencia de anemia se recurrió a los niveles de Hb. Se consideró anemia en mujeres cuando la Hb fue menor de 120 g/L; en hombres si la Hb era menor de 130 g/L; y en niños niveles inferiores a 110 g/L. Los índices hematimétricos volumen corpuscular medio (VCM) y hemoglobina corpuscular media (HCM) se utilizaron en la tipificación morfológica de la anemia. Con ellos la anemia se clasificó en microcítica (VCM<80 fL), normocítica (VCM 80-95 fL) o macrocítica (VCM>95 fL), de acuerdo al volumen; y en normocrómica (HCM=27-32 pg) o hipocrómica (HCM<27 pg), de acuerdo al contenido de Hb.

Índices eritrocitarios de discriminación: Con los resultados de VCM, HCM y recuento de glóbulos rojos (RGR)

se calcularon los índices de Mentzer ($IM=VCM/RGR$) y de Shine&Lal ($S\&L=VCM^2 \times HCM \times 0,01$) (6). El valor discriminante fue un resultado igual o menor de 13 para el IM, y menor o igual a 1530 para el de S&L (8).

Recuento de reticulocitos e índice de producción reticulocitaria (IPR): Se efectuó mediante método manual con azul brillante de cresilo. El resultado se corrigió de acuerdo al hematocrito del paciente, y el IPR se calculó como: reticulocitos corregidos/2. Un $IPR > 2$ indicó anemia regenerativa, mientras que un $IPR \leq 2$, anemia arregenerativa.

Ferremia (Fe) y Capacidad Total de Unión de Hierro a Transferrina (CTUT): Se usó un equipo de Wiener Lab. Los valores de referencia (VR) de Fe son de 50-170 $\mu\text{g/dL}$ en la mujer, y de 65-175 $\mu\text{g/dL}$ en el hombre. El VR de CTUT es de 250-400 $\mu\text{g/dL}$.

Saturación de transferrina: Es el resultado del cociente entre ferremia y CTUT, multiplicado por 100. El VR es de 20-50%.

Electroforesis de Hemoglobina: La corrida se realizó en tiras de acetato de celulosa, en una cuba de electroforesis con fuente de poder (CHEMAR, Buenos Aires, Argentina). Se usó el *buffer* tris-EDTA-bórico pH 8,5.

ROE tubo único inmediato (ROETUi): Se realizó con una solución salina hipotónica de 4,0 g/L de NaCl en *buffer* fosfato. A 5 mL de esta solución se agregaron 50 μL de sangre heparinizada del paciente. Además, se agregaron 50 μL de dicha sangre a 2 tubos más: uno con 5 mL de solución salina de 9,0 g/L de NaCl en *buffer* fosfato (0% hemólisis), y otro con 5 mL de agua destilada (100% de hemólisis). Luego de mezclar, los tubos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron, y los sobrenadantes se leyeron a 540 nm en espectrofotómetro (Metrolab 1600 plus, Buenos Aires, Argentina), usando como blanco el tubo 0% de hemólisis (9,0 g/L de NaCl). El porcentaje de hemólisis se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis tubo } 4\text{g/L de NaCl} = \frac{\text{DO tubo } 4\text{g/L} \times 100}{\text{DO tubo } 100\% \text{ hemólisis}}$$

ROE tubo único post incubación a 37 °C durante 24 h (ROETU24): La muestra de sangre heparinizada se incubó a 37 °C durante 24 h. Luego se empleó la misma técnica de ROETUi. Las pruebas de ROETUi y ROETU24 (4,0 g/L de NaCl) se consideraron normales con porcentajes de hemólisis superiores al 50 y 85%, respectivamente (1).

En los pacientes con sospecha de EH se efectuó la prueba de ROE completa inmediata (ROEi) y ROE post-incubación a 37 °C durante 24 h (ROE24) mediante la técnica descrita por Roper y Layton (1). Los resultados se graficaron con Microsoft Excell. Por extrapolación de la curva se obtuvo la concentración de NaCl correspondiente al 50% de hemólisis. El VR para ROEi es de 4,0-4,5 g/L, y para ROE24 es de 4,6-5,9 g/L.

Se realizó la curva en forma paralela con un control normal.

También se realizó la ROE tubo único inmediata y post incubación a 37 °C durante 24 h usando una concentración de NaCl de 5,5 g/L en *buffer* fosfato (ROETUi-5,5 y ROETU24-5,5) de manera similar al anterior. En las pruebas de ROETUi y ROETU24 con 5,5 g/L de NaCl se usó como valor de corte un porcentaje de hemólisis menor al 5 y 50%, respectivamente.

En los pacientes en los que se demostró la presencia de una hemoglobina con movilidad anormal en la electroforesis a pH alcalino se realizó electroforesis a pH ácido con un equipo comercial (SEBIA). Se siguieron las instrucciones del fabricante para su uso. Se corrieron en forma paralela un control normal, un control con HbS y un control con hemoglobina C (HbC).

Para la prueba de falciformación, la sangre recién extraída con anticoagulante EDTA, se mezcló en partes iguales con una solución de reciente preparación de metabisulfito de sodio al 2% en H₂O destilada. Se agregó un aceite mineral para evitar el contacto de la sangre con el aire, y se tapó el tubo. Se incubó a 37 °C durante 1 hora, y luego se realizó la observación en fresco de la sangre tratada, en búsqueda de drepanocitos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico de los datos se usó el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 9.0. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar, luego de ser sometidos a la prueba de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Para las comparaciones se usó el *t-Test* de Student. El nivel de significación fue de 0,05.

Resultados

El grupo GN estuvo integrado por 11 niños, con un rango de edad de 1 a 12 años, y 23 adultos con edades comprendidas entre 14 y 64 años. En las tablas I, II, y III se pueden observar los resultados de los parámetros hematológicos estudiados en los distintos grupos de pacientes.

El grupo GEH comprendió 8 niños de 1 a 11 años y 3 pacientes de 13, 15 y 31 años. Dicho grupo presentó anemia normocítica normocrómica, tanto en niños como en adultos, y aumento del IPR ($p < 0,05$) con respecto al GN, reafirmando la característica regenerativa de la misma. La ROETUi 4,0 g/L mostró glóbulos rojos más frágiles que los normales, aunque sólo se pudo comparar el grupo infantil con el normal, encontrándose diferencia significativa entre ambos ($p < 0,05$). La ROETU24 4,0 g/L no mostró diferencias con el grupo GN. El examen de la hemólisis 50% inmediata y pos-incubación

Tabla I. Parámetros hematológicos evaluados en los grupos de mujeres mayores de 12 años

PARÁMETROS / GRUPO	GRBT (n=30)	GHPB (n=8)	GEH‡ (n=1)	GN (n=18)
EDAD [años]	40±20	34±20	15	34±11
RGR [x10 ¹² /L]	5,35±0,56*	4,41±1,33	3,70	4,41±0,30
RGB [x10 ⁹ /L]	8,2±2,7	8,7±2,7	18,7	7,2±1,4
HEMOGLOBINA [g/L]	106±11*	116±25*	107	130±8
HEMATOCRITO [L/L]	0,35±0,04*	0,36±0,08	0,31	0,40±0,02
VCM [fL]	64,7±3,3*	83,5±7,8*	84,5	90,3±5,0
HCM [pg]	19,8±1,3*	27,0±3,6	28,9	29,6±1,8
CHCM [g/L]	307±13*	323±20	342	328±11
ÍNDICE DE MENTZER	12,3±1,7*	21,3±9,6	22,8	20,6±2,4
ÍNDICE DE SHINE & LAL	837±128*	1931±528*	2064	2438±382
RP [x10 ⁹ /L]	283±62	232±42	338	258±46
HIERRO [µg/dL]	86±28	91±55	62	94±22
TRANSFERRINA [µg/dL]	283±51	300±55	252	311±47
SATURACIÓN [%]	30±8	31±20	25	31±8
IPR	0,8±0,5	0,7±0,4	3,4	0,6±0,4
ROETUI [%]	26,3±15,8*	47,9±24,9*†	100	74,9±11,5
ROETU24 [%]	48,0±24,0*	66,4±26,2*†	100	93,5±5,6

RGR: Recuento de glóbulos rojos; RGB: Recuento de glóbulos blancos; VCM: Volumen corpuscular medio; HCM: Hemoglobina corpuscular media; CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RP: Recuento de plaquetas; IPR: Índice de producción reticulocitaria.

* $p < 0,05$ con respecto al grupo GN

‡ No se efectuaron comparaciones por escaso número de pacientes

† $p < 0,05$ con respecto al grupo GRBT

Tabla II. Parámetros hematológicos evaluados en los grupos de hombres mayores de 12 años

PARÁMETROS / GRUPO†	GRBT (n=15)	GHPB (n=5)	GEH‡ (n=2)	GN (n=5)
EDAD [años]	33±12	34±14	22±13	45±19
RGR [x10 ¹² /L]	6,36±0,42*	5,23±0,18	3,81±0,26	5,13±0,10
RGB [x10 ⁹ /L]	8,5±2,5	9,0±2,2	9,6±5,8	6,8±1,4
HEMOGLOBINA [g/L]	125±10*	143±5*	118±23	155±7
HEMATOCRITO [L/L]	0,41±0,02*	0,44±0,01*	0,32±0,05	0,46±0,02
VCM [fL]	64,1±4,6*	84,4±3,5*	84,2±6,3	90,0±2,9
HCM [pg]	19,8±2,0*	27,4±0,9*	30,7±4,0	30,2±1,3
CHCM [g/L]	308±15*	325±7*	364±21	336±6
ÍNDICE DE MENTZER	10,1±1,3*	16,1±1,2	22,1±0,1	17,6±0,7
ÍNDICE DE SHINE & LAL	826±224*	1953±223*	2206±607	2454±253
RP [x10 ⁹ /L]	279±91	248±33	241±24	189±46
HIERRO [µg/dL]	100±50	91±31	137±91	108±22
TRANSFERRINA [µg/dL]	276±44	314±114	254±81	308±60
SATURACIÓN [%]	35±14	33±7	51±19	36±9
IPR	0,7±0,4	0,7±0,2	8,0±6,4	0,7±0,4
ROETUI [%]	35,7±24,6*	44,6±34,5	97,0±2,8	68,0±21,7
ROETU24 [%]	49,5±26,5*	82,0±15,6	97,0±4,2	95,2±3,2

* $p < 0,05$ con respecto al grupo GN

† Referirse a la Tabla I para explicación de las abreviaturas

‡ No se efectuaron comparaciones por escaso número de pacientes

Tabla III. *Parámetros hematológicos evaluados en los grupos infantiles*

PARÁMETROS GRUPO†	GRBT (n=14)	GHPB (n=8)	GEH (n=8)	GN (n=11)
EDAD [años]	7±4	5±3	6±3	5±3
RGR [x10 ¹² /L]	5,63±0,50*	4,42±1,00	3,46±0,42*	4,59±0,13
RGB [x10 ⁹ /L]	10,0±3,8	11,2±3,5	11,2±4,6	9,6±2,6
HEMOGLOBINA [g/L]	107±10*	110±19	93±12*	120±6
HEMATOCRITO [L/L]	0,35±0,02	0,35±0,07	0,27±0,03*	0,36±0,02
VCM [fL]	61,8±6,3*	79,9±7,3	78,9±5,7	79,3±2,1
HCM [pg]	19,1±2,5*	25,2±3,5	27,0±2,2	26,2±1,2
CHCM [g/L]	308±14*	315±18*	343±13	331±13
ÍNDICE DE MENTZER	11,1±2,1*	19,4±6,7	23,2±4,1*	17,3±0,4
ÍNDICE DE SHINE & LAL	757±293*	1670±566	1705±362	1651±145
RP [x10 ⁹ /L]	358±75	330±88	343±97	343±117
HIERRO [µg/dL]	77±42	73±19	77±19	78±9
TRANSFERRINA [µg/dL]	279±55	277±62	239±42	276±33
SATURACIÓN [%]	27±13	28±10	33±9	28±3
IPR	0,8±0,6	2,9±3,8	5,2±1,6*	0,5±0,2
ROETUI [%]	18,8±17,2*	34,2±24,5*	90,2±4,7*	62,3±22,1
ROETU24 [%]	43,1±26,2*	75,4±16,2	85,6±5,7	88,8±10,7

**p*<0,05 con respecto al grupo GN

† Referirse a la Tabla I para explicación de las abreviaturas

demostró que el grupo GEH presentaba una resistencia disminuida con respecto al GN (Fig. 1) (Tabla IV). La prueba ROETU-5,5 inmediata y pos-incubación indicó un porcentaje de hemólisis mayor que el GN (*p*<0,05). De acuerdo a los valores de corte propuestos, esta última prueba permitió detectar la presencia de EH en el 82% (8 individuos) y 100% de los pacientes en su modalidad inmediata y post-incubación, respectivamente. El análisis morfológico de los eritrocitos en extendidos sanguíneos reveló la presencia de esferocitos en el 100% del GEH.

En el grupo GRBT se observó anemia microcítica hipocrómica en el 100% de los casos y no dependió de la edad ni del sexo. Dicho grupo estuvo integrado por 14 individuos de 1 a 12 años y 42 con edades comprendidas entre 17 y 82 años. Tanto la ROETUi y la ROETU24 4,0 g/L demostraron que los glóbulos rojos talasémicos fueron resistentes a concentraciones bajas de NaCl. El 90 y 91% de los individuos con RBT presentaron un porcentaje de hemólisis menor al 50 y 85% en la ROETUi y ROETU24 4,0 g/L de NaCl, respectivamente. Asimismo, los índices IM y S&L presentaron diferencias significati-

vas con respecto a GN, y permitieron diagnosticar el 80 y el 98% de los casos de RBT, respectivamente.

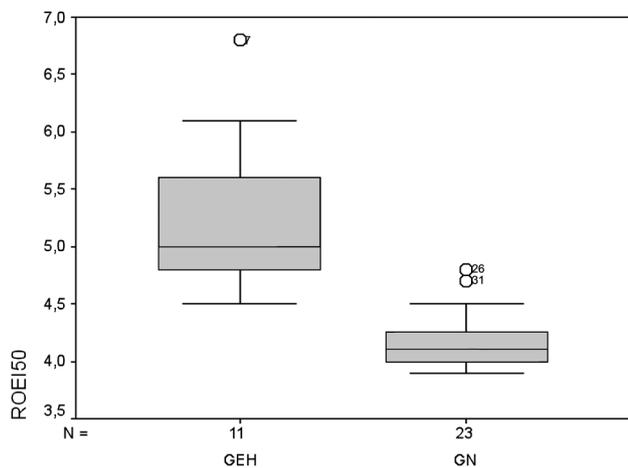
El grupo GHPB estuvo compuesto por 11 pacientes con hemoglobinopatía S heterocigota (rasgo falciforme), 2 con hemoglobinopatía S homocigota, 7 con hemoglobinopatía C heterocigota y 1 con hemoglobinopatía S-C. Dicho grupo consistió en 8 niños de 1 a 9 años y 13 mayores de 12 años, con edades entre 14 y 74 años. Al momento del diagnóstico sólo el 33% (7 casos) presentaba anemia. Ninguno de los hombres adultos tuvo niveles de Hb por debajo del valor de referencia. Con respecto a la ROETU 4,0 g/L inmediata y posincubación, se encontraron glóbulos rojos resistentes a la hemólisis (Tablas I y III), en especial en el grupo femenino mayor de 12 años.

Si bien los grupos GRBT y GHPB fueron resistentes a bajas concentraciones de NaCl, el estudio comparativo entre ambos arrojó diferencias significativas (*p*<0,05) y demostró que los pacientes con rasgo beta talasémico son más resistentes en las pruebas ROETUi y ROETU24 (Fig. 2).

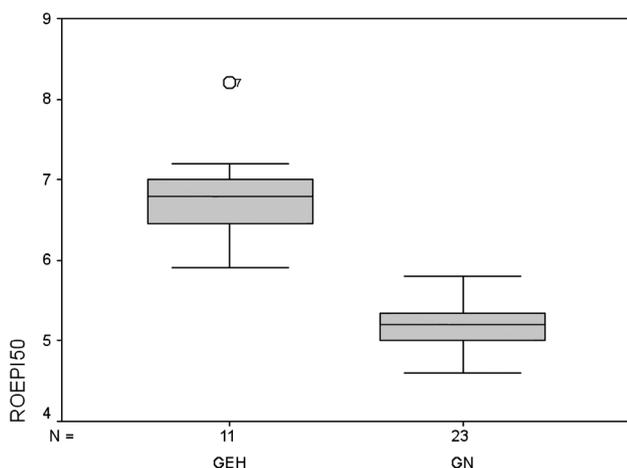
Tabla IV. *Resultados de la prueba de ROE completa y ROETU 5,5 g/L de NaCl en los grupos GEH y GN*

Prueba	GEH	GN
ROEI Hemólisis 50%	5,3±0,7 g/L*	4,2±0,2 g/L
ROEPI Hemólisis 50%	6,8±0,6 g/L*	5,2±0,3 g/L
ROETU 5,5 g/L NaCl	31,2±32,9%*	0,6±0,8%
ROETUPI 5,5 g/L NaCl	76,2±13,0%*	25,3±17,7%

**p*<0,05 con respecto al grupo GN



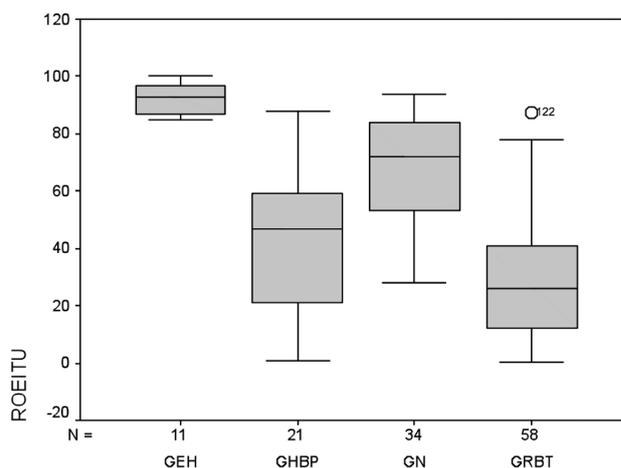
DIAGNÓSTICO



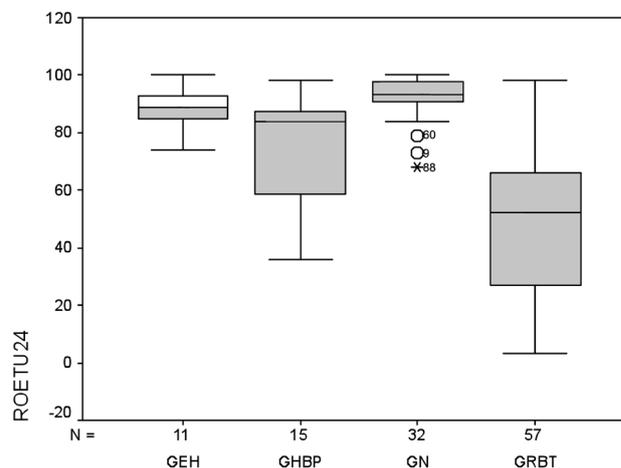
DIAGNÓSTICO

ROEI50: Hemólisis 50% inmediata; ROEPI50: Hemólisis 50% postincubación

Figura 1. Hemólisis 50% inmediata y post incubación en los grupos GEH y GN



DIAGNÓSTICO



DIAGNÓSTICO

ROETU: ROE inmediata tubo único; ROETU24: ROE tubo único 24 horas postincubación

Figura 2. Prueba de ROETU y ROETU24 en los grupos estudiados

Discusión y Conclusiones

El diagnóstico de las anemias hereditarias se basa en la combinación de la historia clínica y familiar, el examen físico y datos de laboratorio (hemograma, índices hematimétricos, morfología, recuento de reticulocitos y otros). La medición de la resistencia osmótica eritrocitaria da una información valiosa sobre la normalidad de los hematíes del paciente, ya que un resultado anormal indica invariablemente la presencia de una patología. Tradicionalmente ha sido usada en el diagnóstico de EH (2)(11). Además, una simple prueba de resis-

encia osmótica de un solo tubo sirve para la orientación diagnóstica de las β -talasemias y de algunas hemoglobinopatías en aquellos países donde hay una incidencia elevada de estas anomalías (12-14).

Con la excepción del trasplante de médula ósea, que sólo está disponible para un número limitado de pacientes con un donante familiar o voluntario compatible, no existe una cura definitiva para cualquiera de los trastornos genéticos de la hemoglobina. Mucho trabajo está dirigido a un tratamiento genético correctivo, pero pasará un tiempo considerable hasta que llegue a la práctica clínica (15). Así pues, se deberían tratar de desarrollar programas de control y un enfoque más

económico para el diagnóstico y manejo de los casos. Para la detección de la β -talasemia se puede usar un método, como la ROETU, que además de sensible, es barato (16). El presente trabajo permitió revelar alrededor del 90% de los casos de RBT. También se probó que tiene valor en la detección de hemoglobinopatías S y C, ya que se observaron glóbulos resistentes al medio hipotónico en estas patologías. Otros autores también han demostrado que la prueba de ROETU es bastante eficaz en el cribado de RBT (17). Sin embargo, la prueba es de uso limitado en poblaciones con una alta prevalencia de anemia por deficiencia de hierro (18), ya que al presentar eritrocitos microcíticos e hipocrómicos puede dar resultados falsos positivos. En estudios anteriores ROETU_i y ROETU₂₄ demostraron ser métodos altamente sensibles y poco específicos (19), pero con un valor predictivo negativo del 92 y 100%, respectivamente, para el diagnóstico diferencial entre RBT y anemia ferropénica (9). En las talasemias mayor y menor, la resistencia osmótica está frecuentemente muy aumentada tras la incubación, debido a una notable pérdida de potasio (1).

Debido a que tanto en el grupo GRBT como en el GHBP los glóbulos rojos fueron resistentes, fue indispensable contar con otros métodos de laboratorio que ayudaran a realizar un rápido diagnóstico diferencial. Así los índices hematimétricos VCM y HCM, como el cálculo de los índices de Mentzer y de Shine&Lal, fueron útiles para distinguir ambas patologías. Estos últimos se han recomendado para distinguir el RBT de la anemia ferropénica (18) (20).

El GEH fue el único frágil en la prueba de ROETU inmediata, mientras que tras la incubación no presentó diferencia significativa con el GN. En cambio, el análisis de los resultados con la ROETU-5,5 mostró que la misma es útil para sustentar un probable diagnóstico de EH, cuando no se puede realizar la prueba completa. Similarmente, en un estudio llevado a cabo por Streichtman y Gescheidt, ROETU_i-5,5 y ROETU₂₄-5,5 permitieron reconocer 16 de 24 y 17 de 22 pacientes con EH, respectivamente (21).

La presencia de una anemia microcítica hipocrómica fue un hallazgo característico del RBT, lo que es reconocido por diversos autores (5), mientras que las HBP y la EH se presentaron como anemias normocíticas normocrómicas, aunque el GHBP tuvo diferencias significativas en el VCM con respecto al grupo GN ($p < 0,05$). La EH se ha descrito como una patología donde se encuentra disminuida la Hb y el VCM, mientras que están aumentadas la concentración de Hb corpuscular media (CHCM) y la amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) (10). Otros autores consideran que el VCM y HCM pueden estar dentro del rango normal, pero con un ADE usualmente aumentado (2). Si bien se observó que la media de la CHCM en el GEH era mayor que en el GN, no hubo diferencias significativas

entre ellos. Tampoco se encontró un VCM menor en el GEH, pero la observación de esferocitos en el frotis de sangre periférica fue un hecho constante en todos los pacientes con EH. La variación del VCM en la EH depende del grado de reticulocitosis, del nivel de hierro en sangre y del compromiso megaloblástico, entre otras causas (22). En el grupo GEH todos los sujetos presentaron un IPR > 3, lo que probablemente determinó el hallazgo de un VCM normal.

El diagnóstico de talasemias, esferocitosis hereditaria y hemoglobinopatías no es fácil en los laboratorios de bajos recursos, los cuales son frecuentes en países con problemas socioeconómicos como la Argentina. La implementación de la prueba de ROETU sería ventajosa, ya que es sumamente económica, y suficientemente sensible y específica para ser usada en el cribado de anemias hereditarias en regiones con recursos técnicos y financieros limitados. De manera ideal, un contador hematológico cuidadosamente estandarizado, debería orientar el diagnóstico de estas patologías. Pero cuando el medio no lo permite, la ROETU podría ser útil en la evaluación de muestras sospechosas, lo que reduciría el número de pacientes que deben ser derivados a centros de mayor complejidad.

CORRESPONDENCIA

DRA. SANDRA LAZARTE.

Laprida 653, 7° D.

4000 SAN MIGUEL DE TUCUMÁN, Tucumán, Argentina

Tel.: 0381-4310994.

E-mail: slazarte@fbqf.unt.edu.ar

Referencias bibliográficas

1. Roper D, Layton M. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. En: Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Dacie and Lewis Practical Haematology. Tenth Ed, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 205-37.
2. Iolascon A, Avvisati R. Genotype/phenotype correlation in hereditary spherocytosis. *Haematologica* 2008; 93 (9): 1283-8.
3. Chow J, Phelan L, Bain B. Evaluation of single-tube osmotic fragility as a screening test for thalassaemia. *Am J Hematol* 2005; 79: 198-201.
4. Boguslawska DM, Heger E, Sikorski AF. Molecular mechanism of hereditary spherocytosis. *Pol Merkur Lekalski* 2006; 20 (115): 112-6.
5. Galanello R, Origa R. Beta-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 21: 5-11.
6. Clarke GN, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem* 2000; 46 (8 Pt 2): 1284-90.
7. Okan B, Cigiloglu A, Cifci S, Yilmaz M, Pehlivan M. Red cell indices and functions differentiating with the

- β -thalassaemia trait from those with iron deficiency anaemia. *J Int Med Res* 2009; 37: 25-30.
8. Lazarte S, Leri de Nofal M, Rossi E, Jiménez C, Ledesma Achem E, Issé B. Diagnóstico diferencial de anemia ferropénica y rasgo beta talasémico: Valor predictivo de las pruebas de cribado. *Arch Bioq, Quím y Farm-Tucumán* 2010-2011; XXI (1): 8-17.
 9. Wild B, Bain B. Investigation of abnormal haemoglobins and thalassaemia. En: Lewis SM, Bain BJ, Bates I. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Tenth Ed, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 271-310.
 10. Lazarte S, Issé B, Agüero G. Hemoglobinopathies and thalassaemia syndromes in Tucumán: preliminary study [resumen]. *Biocell* 2001; 25 (1): 90.
 11. Bolton-Maggs PHB, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, King MJ. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. *Brit J Haematol* 2004; 126: 455-74.
 12. Sanchaisuriya K, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya P, Changtrakul Y, *et al.* A reliable screening protocol for thalassaemia and hemoglobinopathies in pregnancy. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 113-8.
 13. Mamtani M, Das K, Jawahirani A, Rughwani V, Kulkarni H. Is NESTROFT sufficient for mass screening for β -thalassaemia trait? *J Med Screen* 2007; 14 (4): 169-73.
 14. Manglani M, Lokeshwar MR, Vani VG, Bathia N, Mhaskar V. "NESTROFT"-An effective screening test for beta thalassaemia trait. *Indian Pediatr* 1997; 34: 702-7.
 15. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization* 2001; 79 (8): 704-12.
 16. Yazdani MS, Ahmed S. An "on the spot" test for targeted screening in index families of thalassaemia. *J Pak Med Assoc* 2010; 60 (7): 521-3.
 17. Chow J, Phelan L, Bain B. Evaluation of single-tube osmotic fragility as a screening test for thalassaemia. *Am J Hematol* 2005; 79: 198-201.
 18. El-Beshlawy A, Kaddah N, Moustafa A, Mouldar G, Yousry I. Screening for β -thalassaemia carriers in Egypt: significance of the osmotic fragility test. *Eastern Med Health J* 2007; 13 (4): 780-6.
 19. Tongprasert F, Sirichotiyakul S, Piyamongkol W, Tongsong T. Sensitivity and specificity of simple erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassaemia-1 and beta-thalassaemia trait in pregnant women. *Gynecol Obstet Invest* 2010; 69: 217-20.
 20. Rathod DA, Kaur A, Patel V, Patel K, Kabrawala R, Patel V, *et al.* Usefulness of cell counter-based parameters and formulas in detection of β -thalassaemia trait in areas of high prevalence. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 585-9.
 21. Streichman S, Gescheidt Y. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: Correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *Am J Hematol* 1998; 58: 206-12.
 22. Aixalá M, Sarandria C. Microesferocitosis. Perfil eritroide y su relación con distintas pruebas de laboratorio. *Medicina (Buenos Aires)* 2001; 61: 417-23.

Aceptado para su publicación el 4 de septiembre de 2012