POLIMORFISMO DE LA HEMOGLOBINA Y DE LA G6PD ERITROCITICA EN POBLACION PRE-ESCOLAR DE SANTA CRUZ, GUANACASTE, COSTA RICA

German F. Sáenz, Mario Chávez*, Jaime Briceño***
Eugenia Quintana, Guido Arroyo*, Eliécer Valenciano**
Alberto G. Montero, Javier Jiménez**

Key Word Index: Hemoglobin variants

Resumen

En 100 niños pre-escolares del Cantón de Santa Cruz, Guanacaste, se logró demostrar una alta prevalencia de HbS (10,6 %) con detección de cuatro casos de drepanocitosis; uno AC, uno A^1_2, dos de PHHbF, cinco de A_2 ß-tal y dos de F-tal. En 523 hemicigotos fue posible detectar 3,5 por ciento de deficiencia de la G6PD por la variante africana Gd A-, dos por Gd B- y tres variantes activas (Gd B+) de tipo lento. Tanto en varones como en niñas se hizo evidente el predominio manifiesto del tipo Gd B+. En una niña se pudo demostrar su condición homocigótica por Gd A- [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1985; 6(3)126 - 130]

Introducción

Desde 1966 (19) se sabe de la presencia de la Hemoglobina S (Hbs) en Santa Cruz, Guanacaste, Costa Rica.
Un trabajo anterior (11) realizado en estudiantes de primaria y de secundaria de ese mismo Cantón, logró demostrar un 8,9 por ciento de HbS y un 0,30 por ciento de HbC, en sus formas heterocigóticas (AS y AC), con dos hallazgos Clásicos de drepanocitosis (HbSS), en un total de 1.700 muestras estudiadas. En ese mismo estudio pudo demostrarse por vez primera en nuestro país, la persistencia hereditaria de la Hb Fetal (PHHbF) de tipo negro.
Un estudio poblacional de 12.000 estudiantes escolares de todo el país (10), permitió detectar en aquella región la variante de la HbA_2, denominada genéricamente A^1_2 (B_2). Por otra parte, hemos tenido oportunidad de estudiar casos aislados en dicho cantón de hemoglobinopatías por condiciones doble heterocigotas (ej. HbSC), como también por la concurrencia de HbS y genes de ß-talasemia (S/ß°-tal; S/ß$^+$-tal y S/aß-tal). En 1979, Sáenz *et al*. (8) demuestran por segunda vez en Costa Rica la presencia de la enfermedad por HbH (*a* -tal doble heterocigota), en una niña de tres años de edad, de madre santacruceña y padre nicaraguense.
En el presente informe hacemos mención de los hallazgos de hemoglobinas anormales y de enfermedades talasémicas, así corno del genotipo de la G6PD eritrocítica, en niños pre-escolares del Cantón de Santa Cruz, con el deseo de reiterar el problema de tales caracteres hereditarios en una población mestiza de Costa Rica, en la cual ya se había demostrado alta prevalencia de algunos de esos trastornos.

Material y métodos

Se estudió en forma consecutiva a 1000 niños, 477 niñas y 523 varones, que asistieron a la clínica del Seguro Social de Santa Cruz, con edades entre 6 meses y 6 años, en un período comprendido entre enero y noviembre de 1984. Se aprovechó la toma de su sangre cuando los niños asistían a visita clínica, a fin de practicar una serie de análisis intencionadamente dirigidos a:
Fragilidad osmática (F.O.) presuntiva al 0,36 por ciento de NaCL, con el fin de detectar tentativamente hipocromía de las talasemias y Hbs insdubles (S, C, E) (4).

- Hematocrito, Hemoglobina, CHCM.
- Hemoglobinas anormales a través de la electroforesis de Hb a pH alcalino en placas de acetato de celulosa, así como en geles de agar ácido.
- Investigación de la G6PD por medio de la mancha fluorescente de Beutler (1) y por electroforesis en acetato de celulosa (20).
- Hierro sérico y transferrina por los procedimientos preconizados por el CIHATA (12).

Las muestras de sangre se colectaron con EDTA.2Na y se colocaron en la refrigeradora a 4°C mientras se mantuvieran en Santa Cruz. En todos los casos los análisis practicados se llevaron a cabo a lo sumo cinco días luego de obtenidos los especímenes. A las muestras se les practicó un hemolizado rápido con el uso de unas dos gotas de sangre parcialmente empacada y 6 a 8 gotas de una Solución hipotónica de EDTA al 0,025 por ciento más 2 ml de KCN al 5 por ciento. En las situaciones en que se observó la presencia de una Hb anormal, o aumento de las fracciones pequeñas (A_2 y F), se

* Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA), Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.
** Laboratorio Clínico Dispensario C.C.S.S., San Cruz. Guanacaste, Costa Rica.

realizó hemolizado total de Singer *et al*. (18), añadiéndose también KCN (0,05 ml por cada ml de hemolizado al 3-5 por ciento), con el fin de evitar la formación de meta Hb o de convertir la presente en cianometa Hb. La electroforesis se llevó a cabo en placas de acetato de celulosa (TITAN III, Helena) y tampón de Tris-EDTA-borato de pH 8,6 (16), con tinción primaria a base de Ponceau y posterior sobretinción con bencidina; y en gel de agar con amortiguador de citrato de pH 6,1 (5). La cuantificación de la HbF se hizo por la técnica de la desnaturalización alcalina (18), y la de las HbA_2 y HbS por microcromatografía con DE-52 (3, 7) o por electroforesis-elución (7). Los estudios hematológicos de rutina se efectuaron con los métodos convencionales (2).

Resultados

En el Cuadro I se indican los resultados obtenidos en el estudio de hemoglobinopatías.
Se destaca la alta frecuencia del gene "S" (10,6 por ciento), así como de la significativa tasa del rasgo de ß-tal (0,7 por ciento). El hallazgo de cuatro casos de drepanocitosis permite señalar que de cada 1000 niños hubo cuatro con anemia falciforme, y de que la relación entre los heterocigotos por HbS (AS) (10 por ciento) y los homocigotos (SS) (0,4 por ciento) es de 250:1, aproximadamente. En los cuatro casos homocigóticos por HbS (anemia drepanocítica) los valores de la HbF fueron de 6,3; 7,2; 7,5 y 21 por ciento, en tanto que la HbA_2 se encontró en un rango entre 2,8 y 3,2 por ciento. Queda claro, asimismo, la baja frecuencia del gene de HbC (0,1 por ciento). De acuerdo con los niveles relativos de la HbS en los heterocigotos (AS) se encontró los siguientes valores (todos con sideremia normal):

71 casos con HbS mayor de 35 por ciento; posible genotipo: *aa*; $aa/ß^A ß^S$
20 casos con HbS entre 28 y 35 por ciento; posible genotipo: *a*-; $aa/ß^A ß^S$
2 casos con HbS menor de 28 por ciento; posible genotipo: *a*-; $a-/ß^A ß^S$

De los 106 casos con HbS (AS, SS) solo en dos hubo en forma concominante, deficiencia de la G6PD (Gd A-). En las cinco ß-tal menos clásicas, la HbA_2 osciló entre 4,5 y 5,8 por ciento, en tanto que la HbF lo fue de 0,5 a 3 por ciento. En los dos casos de *aß*-tal (F-tal) los niveles de la HbF fueron de 6 y 6,5 por ciento y los de la HbA_2 de 2,0 y 2,1 por ciento. Los dos casos de PHHbF ofrecieron un valor relativo de la HbF de 14 y 29,3 por ciento, en tanto que la HbA_2 en ellos fue de 2,1 por ciento. En todos los casos de talasemia menor la F.O. presuntiva fue positiva (o sea, disminuida), la CHCM menor de 30 por ciento y la morfología microcítica hipocrómica. Un 80 por ciento de los casos AS también ofrecieron la F.O. disminuida, al igual que los cuatro casos de drepanocitosis.

En el Cuadro II se indica los tipos de G6PD eritrocítica en varones, los cuales se detectaron a través de la electroforesis en acetato de celulosa.

En todos los casos en que se demostró deficiencia de la G6PD (Gd A-, Gd B-) por electroforesis, pudo corroborarse la misma a través de la mancha fluorescente. En el cuadro III se puede apreciar los tipos de G6PD que se valoraron en las niñas. Puede destacarse que en una niña se constaté su condición homocigota (A- A-), en otra el genotipo fue A+B-, en dos A-B+ y en otra A+B+ con la fracción "B" lenta, muy semejante en su migración a los tres tipos "B" lentos que se apreciaron en varones (Cuadro II).

CUADRO I

HEMOGLOBINAS ANORMALES, BETA TALASEMIA MENOR Y PHHbF EN NIÑOS PRE-ESCOLARES DE SANTA CRUZ

	Genotipo hemoglobínico							
	AA	AS	SS	AC	A_2^1 (B_2)	ß-tal	F-tal	PHHbF
N	883	102	4	1	1	5	2	2
%	88,3	10,2	0,4	0,1	0,1	0,5	0,2	0,2

CUADRO II

TIPOS DE G6PD EN NIÑOS VARONES
PRE-ESCOLARES DE SANTA CRUZ

	A+	A-	B+	B-	B+ "lenta"	N° examinado
N	15	18	485	2	3	523
%	2,9	3,5	92,6	0,4	0,6	-

CUADRO III

TIPOS DE G6PD EN NIÑAS PRE-ESCOLARES DE SANTA CRUZ

	AA*	A-A-	AB	A-B	AB-	BB	AB "lenta"	N° examinado
N	16	1	27	2	1	429	1	477
%	3,4	0,2	5,6	0,4	0,2	90,0	0,2	-

* A+A+ y A+A- no pueden diferenciarse por electroforesis (tampoco por la mancha fluorescente)

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la importante tasa (15,5 por ciento) de hemoglobinopatías y trastornos afines clínicamente importantes en una población étnicamente heterogénea como lo es la de Santa Cruz, Guanacaste. Aunque ya se sabía de la alta frecuencia de HbS (11, 19) fue una sorpresa el hallar 10,6 por ciento de la misma en la población pre-escolar que se estudió. En todo caso, vuelve a ponerse en evidencia que la frecuencia de HbS en dicha región es de una magnitud semejante de la que se encuentra en población de raza negra (8,2%) (13, 14). Los cuatro casos de drepanocitosis ponen de manifiesto no solo la existencia de ese flagelo en Santa Cruz, sino lo necesario que es el establecimiento de una política clara sobre educación y consejo genético en esa y otras regiones del país, en donde se presenta esta patología molecular. No fue posible determinar la coexistencia de HbSS y *a*-tal, ya que no se pudo estudiar los familiares de los proposita. Este tipo de interacción hereditaria si se puso en evidencia en algunos casos de drepanocitosis estudiados en población puntarenense (15). Se puede sospechar que exista tal genotipo en la población estudiada, particularmente para el caso anémico (HbSS) que ofreció valores de HbF de 21 por ciento. También se sustenta esta presunción por el hecho de que de 93 casos heterocigotos (AS) a los que se les cuantificó la HbS, 20(21,5%) mostraron valores de dicha Hb entre 28 y 35, y 2 (2,2%) lo fueron con menos de 28 por ciento, lo cual permite catalogarlos como formas doble heterocigotas de HbS y a^+ -talasemia, y de HbS más a^o -talasemia, respectivamente, de acuerdo con la experiencia de los jamaiquinos (17).

Seis casos en total (0,7%) resultaron ser variedades de ß-tal menor, dos del tipo F-tal y cinco de la clásica variedad con HbA_2 alta. Esta es la primera comunicación sobre la existencia de ß-tal menor en Santa Cruz. Es muy posible que nuestros protocolos analíticos, intencionalmente establecidos para su detección, hallan permitido encontrar tales trastornos. En este sentido, una F.O. disminuida, una morfología microcítica hipocrómica, la existencia de células en diana y de punteado basófilo, una sideremia normal y la caracterización electroforética de un patrón AF o AA_2, logran demostrar la existencia

de tales desórdenes de la Hb (6, 21). Los estudios de la G6PD eritrocítica pusieron de manifiesto un 3,5 por ciento de deficiencia de este defecto ligado al sexo, fue de un 3,7 por ciento en hemicigotos (varones). Es interesante el hallazgo de cuatro casos con actividad Gd normal pero con la característica de variantes electroforéticamente lentas, hecho que será motivo de un estudio posterior. En el Cuadro II puede apreciarse la distribución genotípica en esos 523 varones estudiados, resaltando la prevalencia del tipo Gd B+ (92,6%) en contraposición con los valores bajos de la variante Gd A+ (2,9%). En las niñas pudo detectarse una homocigota con el genotipo Gd A-A-, predominando en todo el grupo el tipo Gd B+ hemocigota normal (BB) (Cuadro III).

Una investigación ulterior nos permitirá comparar estos hallazgos con muestras de sujetos de raza negra y de caucásica, a fin de establecer el verdadero polimorfismo de la G6PD en Costa Rica. Visto en conjunto el problema de la deficiencia de la G6PD en la muestra poblacional estudiada, resalta una diferencia significativa con respecto a una encuesta realizada en individuos de raza negra de Limón (9), aunque bastante semejante (5,4%) a la efectuada en recién nacidos de esa raza (14). En esta última investigación, así como para obtención de los presentes resultados, se aplicó una tecnología diagnóstica similar (mancha fluorescente y electroforesis-actividad).

Agradecimiento

Los autores profundamente al personal del laboratorio clínico del Dispensario de la C.C.S.S. de Santa Cruz, la colaboración que nos brindaron para la realización de este trabajo. Así mismo, dejamos constancia del apoyo financiero que otorgara el CONICIT.

Agradecemos a HELENA LABORATORIES, Beaumont, Texas la ayuda para la realización de esta investigación, por el obsequio de las placas de inmunodifusión radial para la cuantificación de hemoglobina fetal (Hb F Quiplate Kit).

ABSTRACT

We demonstrated, in 100 preschool children from Santa Cruz, Guanacaste, Costa Rica, a high prevalence of HbS, (10.6%) and four sickle cell cases, one with AC, ono $A^1{}_{2,\ \text{two PHHbF, five A2}}$ *ß-tal and two F-tal. In 523 hemizygotes it was posible to detect a 3.5 per cent deficiency of G6PD African variant GdA-, two Gd B- and three active variants (Gd B+) of the slow type. Both in boys and in girls the manifest predominance* of *Gd b+ was evident. In a girl it was possible to demonstrate her homozygous condition for Gd A-.*

Bibliografía

1. Beutler, E. *"Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods"* 2nd. edition, Griene & Stratton, New York, 1975; 139.

2. Dacie, J.V. & Lewis, S.M. *"Hematología práctica"* 2da. edición. Ediciones Toray, S.A., Barcelona, 1970; 536-560.

3. Efremov, G.D. "Starch gel electrophoresis". In: *"Standardization of laboratory reagents and method for the detection of hemoglobinopathies"* H.E.W. (CDC) Publication, Atlanta, Georgia, 1973; 37.

4. Kattanis, C., Efremor, C.D. & Pootrakul, S. Osmotic fragility screening for betha-thalassemia trait. ICSH, expert panel in abnormal hemoglobins *and* thalassemia (reprint), 1978.

5. Robinson, A.R., Robson, M., Harrison, A.P. & Zuelzer, W.W. "A new technique for differentiation of hemoglobin". *J. Lab. Clin. Med.,* 1957; 50:645-650.

6. Sáenz, G.F. Diagnóstico convencional de los síndromes talasémicos. *Sangre,* 1980; 25:63-76.

7. Sáenz, G.F. Moreira, J. *Hemoglobinopatías: Manual Latinoamericano.* Ministerio de Salud Pública de Costa Rica, Departamento de Publicaciones, 1980.

8. Sáenz, G.F., Jiménez, J. Mora, L. Enfermedad por Hemoglobina H en Costa Rica. *Sangre,* 1979; 3:333-339.

9. Sáenz, G.F., Brilla, E., Arroyo, G., Valenciano, E. Jiménez, Deficiencia de la dehidrogenasa de la glucosa-6-fosfato (G6PD) eritrocítica en Costa Rica. *Rev. Méd. Hosp. Nal. Niños.* 1971; 2:129-136.

10. Sáenz, G.F., Elizondo, J., Arroyo, G., Jiménez, J., Montero, A.G. Valenciano, E. Diagnóstico de hemoglobinopatías y de trastornos afines. Enfoque poblacional del problema. *Bol. Of. Sanit. Panam.,* 1981; 2:127.

11. Sáenz, G.F., Alvarado, M.A., Atmella, F., Arroyo, G., Jiménez, R. & Valenciano, E. Investigación de hemoglobinas anormales en población costarricense del Guanacaste *Acta Méd. Cost.,* 1973; 16:147-153.

12. Sáenz. G.F., Cháves, M., Arroyo, G., Valenciano, E. Jiménez, J., Montero, A.G. & Quintana, E. Hierro sérico y transferrina funcional. Preconización de una metodología. *Rev. Cost. Cienc. Méd.,* 1985; 6(1):

13. Sáenz, G.F., Arroyo, G. Jiménez, J., Gutiérrez. A., Barrenechea, M., Brilla, E., Valenciano, E. Investigación de hemoglobinas anormales en población de raza negra costarricense. *Rev. Biol. Trop.;* 1971; 19:251-256.

14. Sáenz, G.F., Cháves, M., Grant. S., Barrenechea, M., Arroyo, G., Valenciano, E., Jiménez, J., Montero, A.G. Hemoglobinas anormales, alfa talasemia y deficiencia de la G6PD eritrocítica en recién nacidos de raza negra. *Sangre,* 1984; 29:861-888.

15. Sáenz, G.F., Chávez, M., Castro, E., Ramón. M., Barboza, M., Jiménez, J., Montero, A.G., Arroyo. G., Valenciano, E. Síndromes drepanocíticos en población de la provincia de Puntarenas. *Acta Méd. Cost.,* 1984; (En prensa).

16. Schneider, R. Differentiation of electrophoretically similar hemoglobins-such as S, D, G and P; or A_2, C, E and O- by electrophoresis of the globin chain. *Clin. Chem.,* 1974, 20: 1111-1115

17. Sewell, A, Millard, D. Serjeant, G. The interaction of alpha-thalassaemia with SS disease. In *The Red Cell,* Allan, R. Liss, Inc. New York, 1978; 93-102.

18. Singer, K.A., Chernof, A.I., Singer, L. "Studies of abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell denaturation". *Blood,* 1951; 6:413-417.

19. Solano, L, Cabezas, M. Elizondo, L. Estudio sobre drepanocitosis y hemoglobina "S" en Santa Cruz de Guanacaste. *Acta Méd. Cost.,* 1966; 9:59-62.

20. WHO Scientific: Standardization of procedures for the study of glucose-6 phosphate dehydrogenase. WHO Tech. Rep. Ser. N°366. Geneve, 1967.

21. WHO. Hereditary anaemias. Genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. *Bull WHO,* 1982, 60:643-660.