

Prevalencia de hemoglobinas S y C en población afroecuatoriana de Santo Domingo de los Colorados.

Ricardo Raúl Cevallos

*Laboratorio de Biotecnología Humana, Departamento Ciencias de la Vida,
Escuela Politécnica del Ejército; y, Unidad de Hematología, Centro de Biomedicina,
Universidad Central del Ecuador.*

Resumen

Contexto: Las hemoglobinas S y C son variantes altamente frecuentes en individuos de ascendencia africana y su presencia se ha relacionado con una presión selectiva a la que ha sido expuesta una población por efecto de la recurrente infección con Plasmodium.

Objetivo: Determinar la prevalencia de hemoglobinas S y C en la población afroecuatoriana de una de las ciudades con mayor incidencia de malaria en Ecuador.

Diseño: Transversal.

Lugar y sujetos: 205 individuos de etnia afroecuatoriana, nacidos en la ciudad de Santo Domingo de los Colorados o con más de 10 años de residencia en el lugar.

Métodos y mediciones principales: Para el rastreo de las variantes de hemoglobina se utilizó una muestra sanguínea obtenida de cada sujeto. Cada muestra fue analizada mediante electroforesis alcalina horizontal en agarosa. Paralelamente se aplicaron controles de Hb-AA y Hb-AS. Las muestras que revelaron un patrón de hemoglobina diferente al control Hb-AA fueron sometidas a electroforesis ácida en agar citrato. Para cada muestra analizada se determinó la variante de hemoglobina detectada, así como su carácter heterocigoto u homocigoto.

Resultados: De las 205 muestras analizadas se encontró una prevalencia del 8.3% (IC95%=4.7%-12.2%) de hemoglobina C y del 0.5% (IC95%=0.0%-1.3%) de hemoglobina S. Estas variantes fueron de carácter heterocigoto (AC y AS respectivamente). Solamente se identificaron antecedentes de malaria en 43 de los 187 individuos que tenían la variante normal Hb-AA. No se detectaron otras variantes de hemoglobina.

Conclusiones: La mayor prevalencia de hemoglobina C frente a la hemoglobina S podría estar relacionada con la frecuencia de infecciones por Plasmodium en la zona. Los hallazgos también sugieren la presencia de un linaje ancestral distinto entre estos individuos y los de otras poblaciones afroecuatorianas.

Rev Fac Cien Med (Quito) 2007; 32: 81-85.

Palabras clave

Hemoglobinopatías, Hemoglobinas anormales, Hemoglobina C, Hemoglobina S, Drepanocitosis, Malaria.

Recibido: 09 - Julio - 2007

Aceptado: 07 - Agosto - 2007

Dirección para correspondencia: Ricardo Cevallos. Laboratorio de Biotecnología Humana, Departamento Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí-Ecuador.

E-mail: ricardocevallosg@hotmail.com

Introducción

La hemoglobina normal del adulto (HbA) está compuesta por dos cadenas de α -globina y dos de β -globina. Actualmente se conocen más de 500 variantes de hemoglobina originadas por mutaciones en el locus que codifica la síntesis de la β -globina^[1]. Algunas de estas mutaciones conllevan a la aparición de hemoglobinopatías estructurales debido al cambio en las propiedades de la proteína. Las variantes estructurales de hemoglobina de mayor trascendencia clínica son la hemoglobina S (HbS) y la hemoglobina C (HbC), las cuales son producto de mutaciones autosómico recesivas sobre el gen de la β -globina^[2,3].

La presencia homocigótica de las variantes S y C (Hb-SS, Hb-CC) así como de la heterocigocia SC (Hb-SC), se ha relacionado con la cristalización de la hemoglobina dentro del eritrocito durante su desoxigenación en los capilares sanguíneos, modificando la forma y viscosidad de esta célula^[4]. A pesar de esto, únicamente las variantes Hb-SS y Hb-SC son capaces de provocar manifestaciones clínicas severas, que en ocasiones llegan a ser fatales^[5]. La sintomatología que presentan los individuos con estos dos tipos (SS y SC) está asociada principalmente a la obstrucción capilar provocada por los eritrocitos deformados y a la intensa hemólisis mecánico-circulatoria y esplénica. Por sus particularidades, la patología es denominada drepanocitosis o anemia de células falciformes. Por el contrario, la homocigocia de HbC es considerada como una condición hematológica de gravedad leve y que no conlleva mayores complicaciones, debido a que el aumento en la viscosidad celular es compensado por una disminución en el diámetro del eritrocito^[6].

La prevalencia de las hemoglobinas S y C en el continente africano (20-40%) se ha relacionado con el efecto protector que estas variantes confieren a la infección por *Plasmodium falciparum*^[7,8]. Sin embargo, también son causantes del 10 al 20% de mortalidad neonatal anual por anemia drepanocítica en África occidental, algo considerado un problema importante de salud pública en muchos países desarrollados y subdesarrollados^[9].

Las publicaciones realizadas sobre hemoglobinopatías estructurales en el Ecuador se han enfocado principalmente en la drepanocitosis por HbS, por ser la variante predominante en las poblaciones afroamericanas^[10,11]. No se han reportado datos de la prevalencia de HbC ni de otras hemoglobinopatías en la población. Tampoco se han realizado estudios que relacionen la incidencia de malaria con la presencia de hemoglobinopatías en la población afroecuatoriana ni en la población mestiza.

Debido a fenómenos de migración interprovincial, en la ciudad de Santo Domingo de los Colorados se encuentran los asentamientos afroecuatorianos de mayor densidad en la provincia de Pichincha^[12]. Esta ciudad se encuentra además dentro de las zonas de mayor incidencia de malaria en el Ecuador^[13]. Determinar la prevalencia de las hemoglobinopatías estructurales más frecuentes en individuos de etnia negra que habitan esta ciudad, es impor-

tante como una primera etapa para estudiar la relación que poseen con la situación de la malaria en nuestro medio.

Sujetos y métodos

El estudio fue realizado en el período de agosto a diciembre del 2006 y contó con la colaboración de la Confederación Nacional Afroecuatoriana y la Federación de Organizaciones y Grupos Negros de Pichincha (FOGNEP). Se utilizó un diseño transversal y descriptivo. La población fuente correspondió a individuos de etnia negra, nacidos en la ciudad de Santo Domingo de los Colorados o que hayan tenido residencia permanente por más de diez años en la misma. No se discriminó sexo, ni edad de los individuos, para su inclusión en el estudio. Mediante procedimientos habituales se tomaron muestras de sangre periférica de un total de 205 individuos que otorgaron su consentimiento para participar en el estudio. Los sujetos fueron seleccionados en cuatro sectores residenciales de la ciudad que tienen asentamientos afroecuatorianos: Plan de Vivienda 12 de Octubre, El Paraíso, Juan Eulogio y Jehová es mi pastor. Todas las muestras de sangre periférica fueron codificadas en anónimo respecto al individuo y mantenidas a 4°C hasta su utilización y procesamiento. Complementariamente, se recabó información respecto a antecedentes de malaria y sintomatología presentada en cada uno de los sujetos, en un formulario con igual número de codificación para su posterior emparejamiento con la muestra sanguínea.

Preparación de la muestra

En la Unidad de Hematología del Centro de Biomedicina, las muestras fueron sometidas a un proceso de extracción de hemoglobina mediante un protocolo estandarizado por el autor y basado en el método de Blackwell y Huang^[14]. En este proceso se aislaron los eritrocitos mediante tres lavados con solución salina (NaCl 0.9%) en proporción 1:5 por medio de agitación suave y centrifugación a 2000 rpm. Para el rompimiento eritrocitario se adicionaron 2 mL de agua destilada estéril y 0.2 mL de tolueno por cada mL de eritrocitos lavados. Para efectuar la lisis se mantuvo en agitación suave durante toda una noche. Luego se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos para separar el estroma de la hemoglobina y se tomaron aproximadamente dos tercios del hemolisado ubicado bajo el tapón de estroma sobrenadante. Los hemolisados fueron distribuidos en tubos Eppendorf estériles, los cuales fueron mantenidos a 4°C hasta su empleo.

Electroforesis alcalina

Para el rastreo de variantes de hemoglobina en las muestras, se realizó una electroforesis alcalina horizontal en agarosa (Analytical Grade, Promega) al 1%, utilizando como soporte láminas plásticas de acetato. Se utilizó buffer Tris-Barbital a pH 8.6 como fuente de electrolitos. La solución buffer fue aplicada directamente para la prepara-

ción del gel de agarosa y para llenar las cubetas de la cámara de electroforesis. Se aplicaron 2 μ L de hemolisado por cada muestra utilizando un dispositivo aplicador especial y se esperó dos minutos hasta completar la difusión de la muestra en el gel. Paralelamente fue aplicado un control Hb-AA y un control Hb-AS por cada placa. Las placas fueron colocadas en la cámara de electroforesis tomando en cuenta que la migración de la hemoglobina a pH alcalino se dirige hacia el polo positivo. La electroforesis fue efectuada a 120 V durante 30 minutos.

Electroforesis ácida

Las muestras que revelaron un patrón de hemoglobina diferente al control Hb-AA durante la electroforesis alcalina, fueron sometidas a electroforesis ácida en Bacto-Agar (Difco) al 1%. Para este proceso se siguió el protocolo descrito por LeCrone et al.^[15], utilizando buffer citrato/ácido cítrico 0.3 M a pH 6.2 como fuente de electrolitos. Para la preparación del gel de soporte se utilizó la solución buffer diluida al 8% v/v. Para llenar las cubetas de la cámara de electroforesis se utilizó la solución buffer diluida al 25% v/v. La aplicación de las muestras fue realizada de la misma manera que en el ensayo anterior. El aplicador de muestras fue ubicado en la parte media del gel debido al sentido de migración de las variantes de hemoglobina a pH ácido. La electroforesis fue efectuada a 70 V durante 60 minutos.

Tratamiento y tinción de las placas

Las placas de ambos ensayos electroforéticos fueron sometidas al mismo procedimiento para su tratamiento y tinción. Finalizada la electroforesis, las placas fueron sumergidas en una solución desnaturalizante compuesta de ácido acético al 10% y etanol al 70%, con el fin de fijar las muestras al gel. Posteriormente fueron sumergidas en solución salina por 5 minutos. Se realizó un proceso de prensado durante 10 minutos utilizando dos capas de papel filtro absorbente grueso sobre el gel. Cada muestra fue secada a 40°C durante 30 minutos o más hasta observar la deshidratación total del gel. Una vez secas, las placas fueron sometidas a tinción con Amido Black

10B (Bio-Rad) durante 1 minuto. Finalmente, las placas fueron sumergidas en una solución decolorante (ácido acético 5%) hasta que las bandas de hemoglobina fueran claramente distinguibles.

Para cada muestra analizada se determinó la variante de hemoglobina detectada, así como su carácter heterocigoto u homocigoto para un total de seis posibilidades: AA, AS, SS, AC, CC y SC. La presencia de otras variantes estructurales de hemoglobina también fue revisada. La prevalencia de HbS y HbC se calculó sobre el total de muestras estudiadas. Los resultados se han expresado mediante estadística descriptiva e inferencial.

Resultados

De las 205 muestras analizadas por medio de electroforesis alcalina, 18 (8.7%) mostraron un patrón de migración distinto al control HbA. En estas últimas, en la electroforesis alcalina también se reveló la presencia de HbA por su banda correspondiente, por lo tanto todas tuvieron un carácter heterocigoto. De estas 18 muestras, solo una reveló un patrón de migración igual al control Hb-AS durante la electroforesis alcalina. Las 17 muestras restantes revelaron un retraso electroforético mayor, ubicándose a la altura de la hemoglobina HbA2.

Por medio de electroforesis ácida se verificó que la muestra con el patrón de hemoglobina S correspondía acertadamente al fenotipo heterocigoto Hb-AS. Igualmente se comprobó que las 17 muestras restantes contenían hemoglobina C en su carácter heterocigoto (Hb-AC).

Conforme los hallazgos, se obtuvo una prevalencia de HbC del 8.3% (IC95%=4.7%-12.2%) y de HbS del 0.5% (IC95%=0.0%-1.3%) en la población analizada. De los individuos portadores tanto de HbS como de HbC, ninguno tuvo antecedentes de malaria. Por otro lado, en los individuos con el tipo normal Hb-AA (n=187) se encontraron antecedentes de malaria en 43 (22.9%); (**tabla 1**).

En los ensayos electroforéticos realizados no se encontraron otras variantes estructurales de hemoglobina, ni tampoco hubo indicios de síndrome talasémico en nin-

Tabla 1.- Variantes de hemoglobina identificadas por medio de ensayo electroforético y antecedentes de malaria en los sujetos estudiados. Santo Domingo de los Colorados (Ecuador).

Variante de Hb	Total sujetos	Con antecedentes de malaria	Sin antecedentes de malaria
Homocigocia AA	187 (91.2)	43 (100.0)	144 (88.9)
Heterocigocia AS	1 (0.5)	---	1 (0.6)
Homocigocia SS	---	---	---
Heterocigocia AC	17 (8.3)	---	17 (10.5)
Homocigocia CC	---	---	---
Heterocigocia SC	---	---	---
Total de muestras	205	43	162

Los datos se presentan como número (porcentaje).

guno de los individuos con el tipo normal Hb-AA. La sintomatología presentada por los individuos analizados no se relacionó con cuadros de anemia drepanocítica en ninguno de los casos.

Discusión

La hemoglobina C ha sido catalogada como una de las hemoglobinopatías más frecuentes entre individuos de etnia afroamericana y siempre se ha estimado que su prevalencia es mucho menor que la de hemoglobina S. De todas maneras, en una población específica existe la tendencia a elevarse la prevalencia de una u otra hemoglobinopatía debido a la presión selectiva que ejerce la incidencia de malaria en dicha población.

Para realizar un estudio epidemiológico de hemoglobinopatías, es necesario analizar las propiedades moleculares de la hemoglobina de cada muestra sanguínea. Las hemoglobinas S y C, al ser variantes estructurales, son fácilmente identificables mediante un perfil electroforético. Los cambios en la carga neta de la hemoglobina debido a la variación en su secuencia hacen que su patrón de migración durante la electroforesis (bajo una condición determinada de pH) sea diferente al patrón de migración revelado por la hemoglobina normal HbA^{16,17}. Este tipo de ensayos permiten determinar la prevalencia de hemoglobinas S y C en una población y demostrar la posible presión selectiva a la que ha sido expuesta por efecto de la recurrente infección con *Plasmodium*.

En el presente trabajo se realizó un rastreo general de hemoglobinopatías por medio de electroforesis alcalina, para posteriormente analizar mediante electroforesis ácida de mayor sensibilidad aquellas muestras que revelaron un patrón de migración diferente al control de HbA. Los resultados han permitido identificar una mayor prevalencia de HbC frente a la HbS dentro de la población afroecuatoriana investigada (8.3% vs. 0.5% respectivamente) y a partir de los mismos se puede estimar que, en la ciudad de Santo Domingo de los Colorados, entre 4 y 12 de cada cien individuos de etnia negra son portadores de HbC.

Aunque las hemoglobinas S y C son muy frecuentes entre individuos de ascendencia africana, la prevalencia encontrada es menor a la existente en el continente africano (20% - 40%), lugar en donde la frecuencia podría estar relacionada con la exposición a *Plasmodium falciparum* y el apareamiento de las variantes como respuesta ante la enfermedad^{7,8}. Sin embargo, la prevalencia de HbS ha sido menor a la cifra reportada en 1998 en otra población afroecuatoriana, donde se encontró un 17% de portadores de esta variante¹¹. La incidencia de infecciones por *Plasmodium* en la zona investigada estaría implicada en la elevación de la frecuencia de la hemoglobina C dada su capacidad protectora y los leves efectos adversos que ejerce aún en su carácter homocigoto⁶. Sin embargo, para obtener resultados concluyentes al respecto sería necesario realizar, durante un período de tiempo prolongado, un estudio exhaustivo sobre la incidencia de malaria entre los individuos de etnia negra de esta zona.

La mayor prevalencia de hemoglobina C también es un indicio del origen ancestral de la población afroecuatoriana analizada. Dado que la hemoglobina C es exclusiva de los pobladores del occidente africano¹⁰, al parecer este mismo linaje se habría focalizado entre los afroecuatorianos asentados en la ciudad de Santo Domingo. Este hecho podría distinguir a esta población de los afroecuatorianos asentados en las provincias de Imbabura y Esmeraldas. Sin embargo, la fuerte inmigración que ha sufrido la ciudad no permite afirmar esta hipótesis con seguridad. Por medio de métodos de genética molecular sería posible identificar el linaje exacto de estos individuos y determinar el grado mestizaje y cruce con otros linajes africanos.

Por otro lado, la ausencia de drepanocitosis en la población de estudio permite sugerir que la presencia de HbS correspondería a casos aislados. Este hecho no descarta la posibilidad de que en algún momento existan individuos con fenotipo Hb-SC debido al cruce de portadores con ambos alelos. En este caso, los fenómenos migratorios pueden ser un factor de riesgo para la aparición de casos de drepanocitosis por hemoglobina SC en la población afroecuatoriana.

Al no existir estudios exhaustivos acerca de la incidencia de otras hemoglobinopatías estructurales y no estructurales, no es posible determinar la probabilidad de otros dihibridismos de hemoglobina C. Hemoglobinopatías como la alfa y beta talasemia, así como la hemoglobina D, pueden provocar cuadros de anemia drepanocítica al hibridar con los alelos S y C en un mismo individuo. Por este motivo, la importancia del estudio realizado radica en haber identificado la presencia de hemoglobina C en una población afroecuatoriana y mestiza de nuestro país, con las posibles implicaciones que esto tendría tanto en el área médica como de genética poblacional.

Agradecimiento

A la Confederación Nacional Afroecuatoriana y a la Federación de Organizaciones y Grupos Negros de Pichincha (FOGNEP) por la cooperación e información aportada para la realización del estudio. A Edmundo Estévez, Marcia Racines Orbe, Alba Montaña, Manuel Palacios, Verónica Narváez, Ana María Vera y Elizabeth Palacios, quienes de una u otra forma colaboraron en la realización del trabajo.

Conflictos de interés

Ninguno declarado por los autores.

Referencias

1. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. [Database on Internet]. Johns Hopkins University: National Library of Medicine (US) - Natio-

- nal Center for Biotechnology Information; 2007. [Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>].
2. Itano HA, Neel JV. A new inherited abnormality of human hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1950; 36: 613-17.
 3. Ingram VM. Abnormal human haemoglobin III: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. *Biochem Biophys Acta* 1959; 36: 402-11.
 4. Bellingham AJ. The sickling process in relation to clinical manifestations. *J Clin Pathol Suppl* 1974; 8: 23-25.
 5. Serjeant GR. Mortality from sickle cell disease in Africa. *BMJ* 2005; 330: 432-33.
 6. Fabry ME, Kaul DK, Raventos C, Baez S, Rieder R, Nagel RL. Some aspects of the pathophysiology of homozygous Hb CC Erythrocytes. *J Clin Invest* 1981; 67: 1284-91.
 7. Friedman MJ. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 1994-97.
 8. Rihet P, Flori L, Tall F, Traoré AS, Fumoux F. Hemoglobin C is associated with reduced Plasmodium falciparum parasitemia and low risk of mild malaria attack. *Hum Mol Gen* 2004; 13: 1-6.
 9. Weatherall D, Hofman K, Rodgers G, Ruffin J, Hrynkow S. A case for developing North-South partnerships for research in sickle cell disease. *Blood* 2005; 105: 921-23.
 10. Kan YW, Dozy AM. Evolution of the hemoglobin S and C in world populations. *Science* 1978; 208: 388-91.
 11. Rodríguez WE, Sáenz GF, Chaves VM. Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica. *Rev Panam Salud Pública* 1998; 3: 1-8.
 12. Guerrero F. Población indígena y afroecuatoriana en Ecuador: Diagnóstico sociodemográfico a partir del censo de 2001. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). Santiago de Chile: Naciones Unidas, 2005.
 13. Yépez MC, Zambrano D, Carrasco F, Yépez RF. Factores asociados con el incumplimiento del tratamiento antipalúdico en pacientes ecuatorianos. *Rev Cubana Med Trop* 2000; 52 (2): 81-89.
 14. Blackwell RQ, Huang, JT. Simplified preparation of blood hemolysates for hemoglobin electrophoresis. *Clin Chem* 1965; 11: 628-32.
 15. LeCrone CN, Broszeit HK, Jones JA, Detter JC. Adaptation of the acid citrate-agar method for hemoglobin electrophoresis. *Clin Chem* 1976; 22: 1743-44.
 16. Lepp CA, Bluestein BI. Hemoglobin Electrophoresis at Alkaline pH on Agarose Gels. *Clin Chem* 1978; 24: 936-37.
 17. Milner PF, Gooden HM. Rapid citrate-agar electrophoresis in routine screening for hemoglobinopathies using a simple hemolysate. *Am J Clin Pathol* 1975; 64: 58-64.

Summary

Hemoglobin S and C prevalence in Afro-Ecuadorian population from Santo Domingo de los Colorados.

Cevallos RR

Rev Fac Cien Med (Quito) 2007; 32: 81-85.

Context: Hemoglobin S and C are very frequent allelic variants among black population and both could be related with recurrent infection to malaria. **Aim:** To know the prevalence of hemoglobin S and C in Afro-Ecuadorian population from Santo Domingo de los Colorados - Ecuador, a high incidence city of malaria infection. **Design:** Cross-sectional study. Setting and Participants: Blood samples from 250 black people who live in Santo Domingo de los Colorados for more than 10 years. **Main Outcomes Measures:** Each blood sample was analyzed thoroughly alkaline electrophoresis. Control test of hemoglobin-AA and AS were also used. An acid electrophoresis was performed in the samples that showed a different pattern than hemoglobin-AA control test. Allelic variants were determined in each sample as well as homozygote or heterozygote status. **Results:** The prevalence found out of hemoglobin C was 8.3% (IC95%=4.7%-12.2%) vs. 0.5% (IC95%=0.0%-1.3%) of hemoglobin S. All samples showed a heterozygote pattern (AC y AS, respectively). Only 43/187 subjects with normal allelic variant AA reported a positive history of malaria infection. No other hemoglobin variants were detected. **Conclusions:** Hemoglobin C is more prevalent than hemoglobin S and this finding could be related with the frequency of Plasmodium in this region. A different inheritance pattern could exist in the study population related to other Afro-Ecuadorian populations.

Key words: Hemoglobinopathies, Abnormal hemoglobins, Hemoglobin C disease, Hemoglobin S disease, Sickle cell anemia, Malaria.