

## Caso Clínico

Raquel Lahoz Alonso\*, Naiara Romero Sánchez, Ruth González Sánchez, Antonia Escobar Medina, Aurora M. López Martos, Marta Domínguez García, David Beneitez Pastor, Montserrat Prieto Grueso, Adoración Blanco Álvarez, Susana Urban Giralte y Patricia Esteve Alcalde

# Hallazgo incidental de una hemoglobina rara: hemoglobina Bari en el noreste de España

<https://doi.org/10.1515/almed-2023-0070>

Recibido 22-04-2023; aceptado 19-05-2023;

publicado en línea 25-07-2023

## Resumen

**Objetivos:** La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas empleadas para determinar la hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) y el método de elección para el cribado de hemoglobinopatías estructurales. El objetivo de este caso es mostrar cómo en un análisis de rutina de HbA<sub>1c</sub> es posible encontrar incidentalmente una hemoglobinopatía.

**Caso clínico:** En un análisis clínico rutinario, se observó un valor anormal de hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) en el análisis de HbA<sub>1c</sub> mediante HPLC, realizado con el analizador ADAMS™ A1c HA-8180T. Ante la sospecha de la presencia de una hemoglobinopatía, se amplió el estudio a posibles variantes

mediante electroforesis y HPLC, empleando los analizadores Hydrasys y Variant II, respectivamente. Dado que no se pudo identificar con ninguno de los métodos tradicionales, se realizó también un estudio genético mediante secuenciación Sanger. El paciente presentaba niveles bajos de HbA<sub>2</sub> (1.3%) y una variante del 24,9% con un tiempo de retención de 1.95 minutos, compatible con una variante de la cadena de alfa-globina. En el estudio genético, se detectó la variante patogénica c.138C>G en el gen *HBA2* en heterocigosis, causando la expresión de la hemoglobinopatía conocida como hemoglobina Bari.

**Conclusiones:** El cribado inicial de hemoglobinopatías estructurales permite su identificación o suscita sospecha de su presencia, especialmente cuando se realiza junto al análisis de HbA<sub>1c</sub>, requiriendo posterior confirmación y diagnóstico con otras técnicas.

**Palabras clave:** HbA<sub>1c</sub>; hemoglobina Bari; HPLC

Marta Domínguez García: Dirección actual: Centro de Salud Calatayud Sur, Paseo Cortes de Aragón 29, 50300 Calatayud (Zaragoza), España.

\***Autor para correspondencia:** Raquel Lahoz Alonso, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Ernest Lluch, Carretera de Sagunto s/n. 50300 Calatayud, Zaragoza, España, E-mail: rlahoz@salud.aragon.es. <https://orcid.org/0000-0001-8977-7307>

**Naiara Romero Sánchez, Ruth González Sánchez, Antonia Escobar Medina, Aurora M. López Martos and Patricia Esteve Alcalde,** Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Ernest Lluch, Calatayud, Zaragoza, España  
**Marta Domínguez García,** Atención Primaria, Centro de Salud Daroca, Daroca, Zaragoza, España

**David Beneitez Pastor,** Unidad de Eritropatología, Servicio de Hematología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

**Montserrat Prieto Grueso,** Técnico Superior Sanitario de Laboratorio Clínico y Biomédico, Unidad de Eritropatología, Laboratorios Clínicos Vall d'Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

**Adoración Blanco Álvarez,** Unidad de Genética Molecular Hematológica, Servicio de Hematología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

**Susana Urban Giralte,** Técnico Superior Sanitario de Laboratorio Clínico y Biomédico, Unidad de Genética Molecular Hematológica, Laboratorios Clínicos Vall d'Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

## Introducción

La determinación de hemoglobina glicada, también conocida como hemoglobina A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>), está recomendada para el diagnóstico y seguimiento de diabetes mellitus, con un umbral de  $\geq 6,5\%$  [1]. Esto se puede realizar mediante estudios enzimáticos, inmunológicos o de separación, como la cromatografía o la electroforesis.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método de elección para el cribado de hemoglobinopatías estructurales y la cuantificación de hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) y hemoglobina fetal (HbF) [2].

La hemoglobina A (HbA) está compuesta por cuatro subunidades, dos cadenas alfa codificadas por los genes del cromosoma 16 (Hemoglobina Alfa 1 (*HBA1*) y Hemoglobina Alfa 2 (*HBA2*)) y dos cadenas beta codificadas por un gen del cromosoma 11 (Hemoglobina Subunidad Beta (*HBB*)). Cada uno de estos genes puede presentar variantes genéticas. Se estima que el 7% de la población presenta una variante de HbA. Las manifestaciones clínicas de estas variantes son



(Zaragoza), sin ningún antecedente médico de interés, a quien se le realizó un análisis de sangre de control en atención primaria, como medida preventiva. Se obtuvieron muestras de sangre total en tubos con anticoagulante EDTA K2 (Vacutainer™ Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA).

El ensayo HbA<sub>1c</sub> se realizó en el analizador ADAMS™ A1c HA-8180T (ARKRAY, Inc., Kyoto, Japón), un sistema de cromatografía líquida de alta resolución diseñado para separar y cuantificar la HbA<sub>1c</sub>, así como para detectar las variantes HbA<sub>2</sub> y HbF de la hemoglobina. Previamente al análisis, se analizaron varios controles internos, con el fin de determinar los diferentes niveles de HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>2</sub> y HbF y verificar su correcto funcionamiento.

Mientras que el nivel de HbA<sub>1c</sub> del paciente era normal (4,5 %), no se pudo determinar el nivel de HbA<sub>2</sub> (Figura 1). Los resultados del hemograma fueron normales.

A continuación, se realizó la electroforesis de hemoglobina con el analizador Hydrasys (Sebia Hispania®), para determinar la presencia de variantes de la hemoglobina. Cuando se sometieron las muestras a electroforesis a pH alcalino, estas mostraron un patrón de migración de hemoglobina normal. Un análisis adicional a pH ácido reveló una banda anormal que no se separaba de la HbA<sub>1</sub> (Figura 2).

Tras este análisis preliminar, la muestra se envió para su análisis mediante HPLC en el analizador Variant II (Bio-Rad®). El cromatograma mostró un pico con una fracción del 24,9 %, y un tiempo de retención de 1,95 minutos, compatible con una variante de la cadena alfa de globina (Figura 3).

Dada la presencia de un pico anómalo, se realizó el estudio genético. Se llevó a cabo la secuenciación Sanger de los genes *HBA1* y *HBA2*, estudiando las regiones exónicas y

flanqueantes de los dos genes. Se identificó una variante patogénica en el exón 2 de *HBA2*, el gen que codifica la hemoglobina alfa 2, en heterocigosis. La variante de un solo nucleótido c.138C>G (citosina a guanina) en la posición de codificación 46 causa una sustitución de un solo aminoácido de histidina a glutamina. La variante estructural ha sido anteriormente identificada como hemoglobina Bari.

En la Figura 4 se muestra la mutación en la secuencia del gen *HBA2*.

## Discusión

Ante la sospecha de la presencia de una hemoglobinopatía suscitada por el análisis de HbA<sub>1c</sub>, identificamos una variante estructural de las cadenas alfa de globina, conocida como hemoglobina Bari. Hasta donde nosotros sabemos, este es el segundo caso informado de esta variante. El gen implicado en este caso fue el gen *HBA2*. La hemoglobina Bari se descubrió y describió por primera vez en un hombre de 21 años procedente del sur de Italia (Calabria) [5]. Ambos pacientes presentaron niveles similares de la variante, del 20 % en el primer caso, y del 24,9 % en el caso aquí descrito.

Aunque la sustitución del aminoácido que se produce en esta variante implica un contacto distal con el grupo hemo, la molécula de la hemoglobina parecía estar completamente estable y con una funcionalidad normal, lo que explicaría el comportamiento similar al de la HbA en el análisis HPLC con el analizador Variant II, dado que esta eluye unos segundos antes. Además, los parámetros funcionales analizados en la muestra (P<sub>50</sub> O<sub>2</sub>, cooperatividad y efecto Bohr) fueron similares a los de las muestras de control normales [5]. Estos

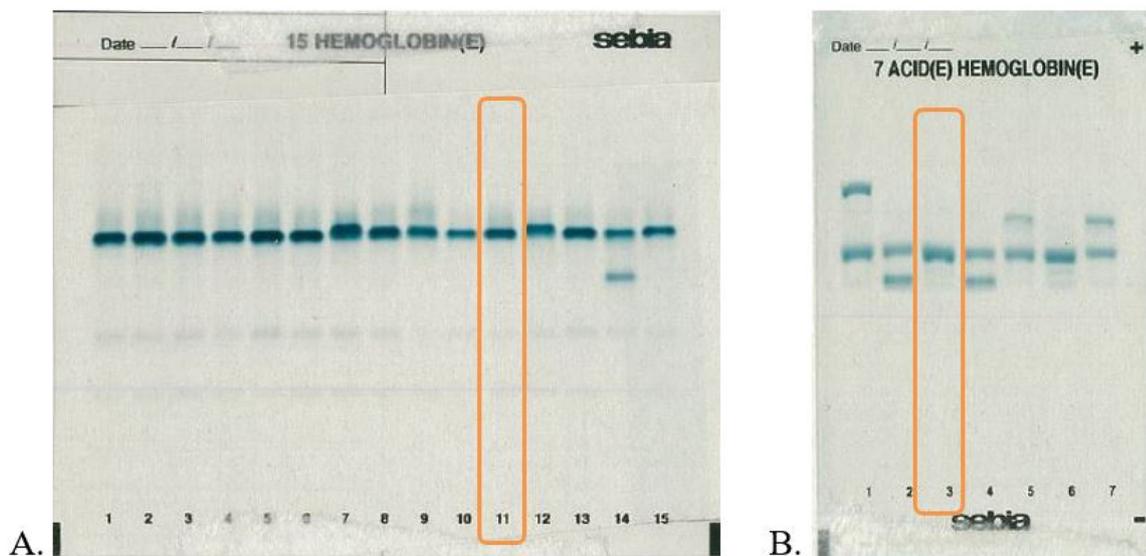


Figura 2: Estudio de electroforesis. (A) a pH alcalino (canal 11) y (B) a pH ácido (canal 3) con el analizador Hydrasys.

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
P1	---	0.1	0.77	2824
Unknown	---	0.9	0.97	22778
F	0.5	---	1.11	11839
P2	---	5.3	1.31	136696
P3	---	6.1	1.71	155553
Unknown	---	24.9	1.95	637002
Ao	---	61.0	2.38	1561820
A2	1.3*	---	3.58	30610

Total Area: 2,559,122

**F Concentration = 0.5 %**

**A2 Concentration = 1.3\* %**

\*Values outside of expected ranges

Analysis comments:

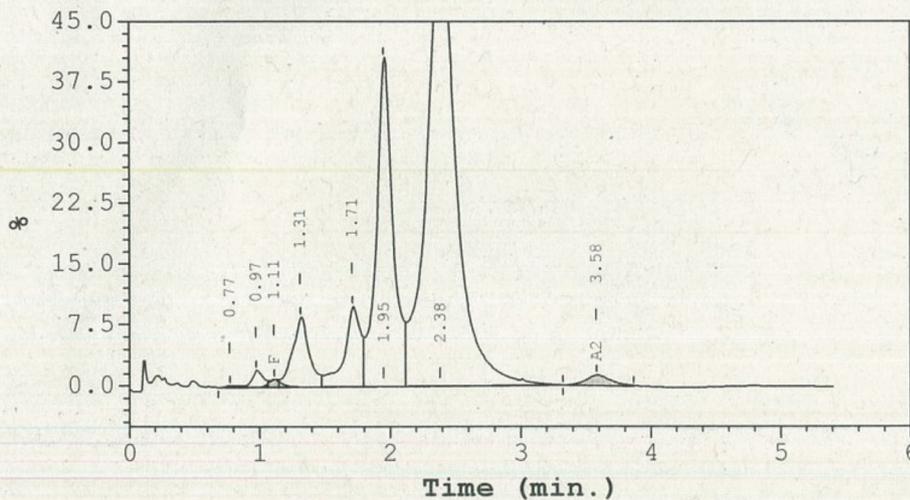


Figura 3: Resultados de HPLC obtenidos con el analizador Variant II.

hallazgos explican la ausencia de patología en ambos individuos.

Marinucci M. et al. observaron que la variante mostraba un comportamiento electroforético igual al de la HbA, aunque las cadenas de alfa globina anormales se movían más anódicamente que las normales a un pH de 6 [5]. En nuestro caso, ocurrió lo mismo, ya que la electroforesis a un pH ácido mostró una banda anormal que no se separaba de la hemoglobina A<sub>1</sub>, que migra de forma más anódica, tal como muestra la Figura 2.

El empleo de dos analizadores HPLC diferentes nos permitió identificar el valor pico anormal de hemoglobina,

así como cuantificar la HbA<sub>2</sub>. La principal diferencia entre ambos es el tiempo de elución, siendo este de 3,5 minutos en el sistema ADAMS™ A1c HA-8180T y de 6,5 minutos en el Variant II. De este modo, el analizador Variant II, al procesar la muestra durante más tiempo, permitió separar correctamente de la HbA el pico anómalo de la variante hemoglobina Bari, y cuantificar el bajo valor de HbA<sub>2</sub>. En los heterocigotos para variantes estructurales de cadena alfa, los tres tipos de hemoglobinas del adulto se verán afectadas [2], por lo que el valor anormal de HbA<sub>2</sub> podría no ser identificado y cuantificado correctamente, presentando un nivel más bajo de HbA<sub>2</sub>.

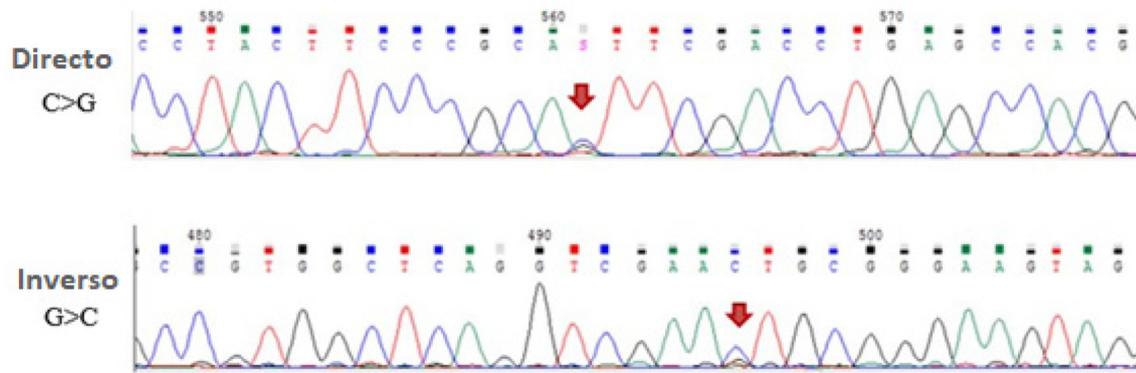


Figura 4: Mutación detectada en la secuenciación del gen *HBA2*.

La prevalencia de cada hemoglobinopatía varía en las diferentes regiones del mundo, aunque estas son más comunes en las regiones mediterráneas y tropicales de África y Asia [6]. En nuestro caso, al igual que en el caso anterior [5], los dos individuos procedían de países mediterráneos. El hecho de que únicamente se haya informado de dos casos podría deberse a la ausencia de síntomas, por lo que su prevalencia podría estar subestimada. A pesar del carácter asintomático de esta patología, el asesoramiento genético es importante en pacientes en edad fértil [2]. Por ello, sería interesante ampliar el estudio a los familiares del paciente, aunque no disponemos de más datos por el momento, ya que el paciente ha rehusado realizarle el estudio a sus descendientes.

Las variantes de la hemoglobina pueden interferir en la cuantificación de la  $HbA_{1c}$ , aunque la mayoría de los ensayos que se utilizan actualmente no se ven afectados por las variantes más comunes (S, C, D, E). Sin embargo, algunos analizadores ofrecen resultados discordantes [7]. En la práctica clínica, la presencia de una variante de la hemoglobina con valores extremos de  $HbA_{1c}$  (<4 % o >16 %) no concordantes con los niveles de glucosa debería suscitar sospechas [8]. Además de la presencia de variantes menos comunes que pueden interferir en la cuantificación de  $HbA_{1c}$  [8, 9], existen variantes dependientes de la raza o etnia o de otras patologías. Los resultados pueden estar alterados en casos asociados a un recambio elevado de glóbulos rojos (anemia de células falciformes, embarazo (segundo y tercer trimestre), deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, hemodiálisis, pérdida de sangre reciente, transfusión o terapia con eritropoyetina), posparto, VIH tratado con ciertos inhibidores de la proteasa e inhibidores de la transcriptasa inversa y anemia por deficiencia de hierro [10]. Aun cuando nuestro paciente mostró niveles normales de glucosa y  $HbA_{1c}$ , creemos que se podría haber subestimado la  $HbA_{1c}$  debido a la presencia de la variante de

hemoglobina Bari, ya que obtuvimos un valor muy próximo al 4 %. No identificamos ninguna otra patología que pudiera haber ejercido como factor de confusión en la asociación entre los niveles de  $HbA_{1c}$  y de glucemia. Sería necesario realizar más estudios para confirmar este fenómeno.

En conclusión, cuando se realiza un análisis de  $HbA_{1c}$  mediante HPLC, es recomendable incluir el cribado de hemoglobinopatías estructurales, ya que esto permite su detección, especialmente en pacientes asintomáticos sin antecedentes de interés. En estos casos, sería necesario ampliar el estudio, con el fin de confirmar los resultados y establecer un diagnóstico definitivo. También hay que tener en cuenta que su presencia podría interferir en la determinación de  $HbA_{1c}$ , por lo que es necesario analizar posibles discrepancias entre los valores de  $HbA_{1c}$  y de glucemia.

## Lecciones aprendidas

- (1) El cribado de hemoglobinopatías estructurales al realizar un estudio de  $HbA_{1c}$  mediante HPLC permite su detección.
- (2) La presencia de variantes de hemoglobina podría interferir en la determinación de  $HbA_{1c}$  mediante HPLC. En caso de discrepancia entre los niveles de  $HbA_{1c}$  y de glucemia es necesario realizar más estudios.
- (3) La hemoglobina Bari es una hemoglobinopatía estructural rara causada por una mutación en el gen *HBA2*, siendo esta asintomática en los portadores heterocigóticos de la variante.

**Agradecimientos:** Agradecemos a Alberto Diego su disponibilidad e interés en ayudarnos a resolver y diagnosticar este caso.

**Financiación de la investigación:** Ninguno declarado.

**Contribución de los autores:** Todos los autores han aceptado la responsabilidad de todo el contenido de este manuscrito y han aprobado su presentación.

**Conflicto de interés:** Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

**Consentimiento informado:** No procede.

**Aprobación ética:** No procede.

## Referencias

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014;37:S81–90.
2. Andreoni LL, Muñoz R, Bautista JL, Rapún L, Banús C, Prado MC, et al. Aplicación de un algoritmo diagnóstico de laboratorio para la detección de hemoglobinopatías. *Revista Hematología* 2018;22:269–276.
3. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011858.
4. Welsh KJ, Kirkman MS, Sacks DB. Role of glycosylated proteins in the diagnosis and management of diabetes: research gaps and future directions. *Diabetes Care* 2016;39:1299–1306.
5. Marinucci M, Mavilio F, Tentori L, D'Erasmus F, Colapietro A, de Stasio G, et al. A new human hemoglobin variant: Hb Bari ( $\alpha 2$  45 (CD3) His  $\rightarrow$  Gln  $\beta$ 2). *Biochim Biophys Acta Protein Struct* 1980;622:315–319.
6. Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a011692.
7. National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP): HbA1c assay interferences. (n.d.). <http://www.ngsp.org/interf.asp> [Accessed 23 Jan 2023].
8. Badiou S, Dupuy A-M, Cunat S, Delay A, Alcaraz S, Aguilar-Martinez P, et al. A case of inter-assay HbA1c discrepancy due to Hemoglobin G-Copenhagen. *Clin Chim Acta* 2022;535:27–29.
9. Mackley MP, Morgenthau A, Elnenaï M, MacKenzie H. A rare hemoglobin variant ( $\beta$ 51Pro  $\rightarrow$  His) causing misleading measurements of hemoglobin A1c. *J Endocr Soc* 2022;6:bvab186.
10. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2022. *Diabetes Care* 2022;45:S17–38.

---

**Nota de artículo:** El artículo original puede encontrarse aquí: <https://doi.org/10.1515/almed-2023-0040>.