

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua**

**Instituto Politécnico de la Salud**

**Luis Felipe Moncada**

**POLISAL UNAN- Managua**



**TRABAJO MONOGRAFICO PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN  
BIOANALISIS CLINICO.**

**TEMA:**

**Estandarización de la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, para el diagnóstico de Hemoglobinopatías en el Politécnico de la salud, Agosto-Noviembre 2015**

**Autores:**

Br. Barillas Solis Carlos Eduardo

Br. Gutiérrez Sánchez Alan Rafael

Br. Villalobos Calero Yuri Vladimir

**Tutor:**

**Dr. Allan Pernudi Ubau Msc. PhD.**

**Asesora Metodológica:**

**Lic. María Soledad Mendoza Salty**

**Managua, Abril 2016**

## Índice

Contenido	Página
Dedicatoria.....	i
Agradecimiento.....	ii
Resumen.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
III. JUSTIFICACION.....	3
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
V. OBJETIVOS.....	5
VI. MARCO TEÓRICO.....	6
6.1. Historia.....	6
6.2. Enfermedad de Células Falciformes.....	7
6.3. Etiología y Patogénesis.....	8
6.3.1. Factores que afectan la Gravedad de la enfermedad...	11
6.4. Herencia.....	15
6.5. Aspectos Clínicos.....	15
6.5.1 Crisis.....	16
6.5.2 Otras Manifestaciones Clínicas.....	17
6.6. Tratamiento, Curso y Pronóstico.....	18
6.7. Rasgo de Células Falciformes.....	19
6.8. Enfermedad por Hemoglobina C.....	20
6.9. La Afrodescendencia de Nicaragua.....	21
6.10. Diagnostico.....	22
6.10.1 Electroforesis de Hemoglobina en Acetato de Celulosa...	23

6.11 Estandarización del Método.....	24
6.11.1 Especificidad.....	26
6.11.2 Sensibilidad.....	26
6.11.3 Reproducibilidad.....	27
VII. DISEÑO METODOLÓGICO.....	28
VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	32
IX. RESULTADOS.....	33
9.1 Estandarización de la técnica.....	34
9.2 Evaluación del método.....	37
9.3 Ensayo de Reproducibilidad de la técnica de electroforesis en acetato de celulosa.....	38
9.4 Clasificación fenotípicas de las muestras en estudio....	39
X. ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	40
10.3 Estandarización de la técnica.....	41
10.2 Evaluación del método.....	42
10.3 Ensayo de Reproducibilidad de la técnica de electroforesis en acetato de celulosa.....	44
10.4 Clasificación fenotípica de las muestras en estudio...	45
XI. CONCLUSIONES.....	47
XII. RECOMENDACIONES.....	48
XIII. BIBLIOGRAFIA.....	49
XIV. ANEXOS.....	52

## **Dedicatoria**

Dedicamos este trabajo al grandísimo creador por darnos vida, sabiduría, protección y perseverancia para concluir esta investigación.

A nuestros padres por toda la paciencia y apoyo incondicional que nos han brindado.

## **Agradecimientos**

Le agradecemos a Nuestro tutor Dr. Allan Pernudi Ubau Msc. PhD., por brindarnos su confianza involucrándonos en su proyecto y compartir sus conocimientos para la elaboración de este trabajo.

A las autoridades del IPS (Instituto Politécnico de la Salud), por Apoyarnos con la Compra de los equipos y remodelación de las instalaciones.

A los docentes, que día a día participaron en nuestra formación como Bioanalista, tanto del Instituto Politécnico de la Salud como de las instituciones receptoras de salud del país.

Y a todas las personas que de una u otra manera nos brindaron su ayuda.

A todos ellos: ¡GRACIAS!

## Resumen

El estudio se basó en la estandarización de la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa para el diagnóstico de hemoglobinopatías, en el que se utilizó como protocolo de referencia el descrito por los investigadores German Sáenz Renaud y Walter Rodríguez Romero "Libro de Hematología Analítica", 4ta edición, 2003. El universo del estudio lo conformaron 44 muestras de sangre total con EDTA K3, sospechosos de anemia de células falciformes atendidos en el Hospital la Mascota.

Se logró la estandarización a partir del ensayo número 3, en el cual se demostró una adecuada migración de las hemoglobinas sin presentar arrastre y con buena definición de las bandas. La evaluación de la técnica demostró ser 100% sensible y específica, además de ser reproducible.

Se caracterizó fenotípicamente los pacientes con Drepanocitosis (HbSS y HbSC) en un 64% y se demostró que el 36% eran pacientes clínicamente sanos (HbAA y HbAS). Algunos pacientes presentaban aumento de la hemoglobina fetal y otros tenían un patrón electroforético con una débil banda.

Entre las principales recomendaciones tenemos Al Hospital Manuel de Jesús Rivera "La Mascota" empezar a utilizar la Técnica de Electroforesis en Acetato de Celulosa, como método diagnóstico para la anemia drepanocítica y otras hemoglobinopatías, generando proyectos de servicio entre las instituciones de apoyo económico para el hospital la Mascota.

## I. INTRODUCCIÓN

La hemoglobinopatía es un grupo de trastornos que se transmiten de padres a hijos (hereditarios), en los cuales hay una estructura y producción anormal de la molécula de la hemoglobina. Se conocen varios cientos de hemoglobinopatías diferentes; sin embargo, generalmente se hace referencia sólo a las más prevalentes.

La enfermedad de células falciformes es un trastorno autosómico recesivo y la enfermedad genética más común que afecta a los afroamericanos. Aproximadamente, el 0,15% de los afroamericanos son homocigotos para la enfermedad de células falciformes, y el 8% tiene el rasgo de células falciformes (Svarch, 2009). El único cambio de aminoácido en la subunidad beta causa la hemoglobina falciforme para polimerizar, especialmente en baja tensión de oxígeno. Los pacientes con enfermedad de células falciformes sufren de oclusión vascular aguda y crónica debido a la polimerización de la hemoglobina falciforme en las células rojas, la inducción de la rigidez de glóbulos rojos que se acompaña a menudo por un cambio en la morfología en forma de media luna. Por otra parte, la polimerización de la hemoglobina S puede llevar a la hemólisis, la inflamación, la adhesión celular y de órganos diana lesión por isquemia-reperfusión y el infarto.

Los pacientes con enfermedad de células falciformes tienen a menudo las crisis vaso-oclusiva característicos, que son episodios dolorosos intermitentes debido a la obstrucción vascular aguda. Estudios recientes indican que hasta un 50% de los pacientes con enfermedad de células falciformes tienen disfunción endotelial debido a la alteración de la biodisponibilidad del óxido nítrico endógeno (NO), debido en gran parte a la compactación de NO por la hemoglobina plasmática libre de células (Kyle Mack & Kato, 2006).

El diagnóstico de enfermedad de células falciformes se establece con base en la identificación de la hemoglobina S. En el enfermo y en el portador la presencia de hemoglobina S se determina por electroforesis de hemoglobina, que es la confirma su presencia (Ferguson, Sánchez, & Rojo, 2003).

## II. ANTECEDENTES

La primera hemoglobina anormal descubierta se llamó HbS (S del inglés Sickle) en 1910 en un estudiante con una enfermedad dental, Herrick acuñó el término de “enfermedad falciforme” debido a la forma de media luna de los eritrocitos (Frenette & Atweh, 2007).

Aproximadamente un 5% de la población mundial es portadora sana de un gen de la drepanocitosis o de la talasemia. El porcentaje de portadores puede alcanzar el 25% en algunas regiones. Cada año nacen más de 300 000 niños con hemoglobinopatías graves (OMS, 2011).

La asociación de pediatra de Sao Paulo realizó un programa de cribado neonatal de hemoglobinopatías en Sao Carlos, Brasil, a 119 madres participantes, entre ellas 69 (58%) tenían niños con rasgo falciforme, 22 (18,5%) con rasgo de hemoglobina C, 18 (15,1%) con el rasgo de talasemia alfa y, en 10 casos (8,4%), el resultado fue concluyentes (Silva Cde, Baldim, Nhoncanse, Estevão Ida, & Melo, 2015).

En Nicaragua, en agosto del 2007 se efectuó un estudio por el Msc. Allan Pernudi en el que se analizaron 460 muestras de sangre total en escolares con edades entre los 4 y 15 años de edad, los resultados reflejaron que 10 individuos fueron portadores asintomáticos de hemoglobina HbAS de estos 9 pertenecían al grupo étnico mestizo y 1 a la etnia negra. Con estos datos se calcula que la frecuencia de esta mutación en una población sana en Nicaragua es del 2.17%.

Para el año 2010, en un estudio a cargo de la Msc. Martha Xiomara Guerrero, se realizó una estandarización de electroforesis en gel de agarosa al 0.5% para el diagnóstico de hemoglobinopatías. En el 2012, este trabajo fue retomado por estudiantes a cargo de la misma tutora, se estudiaron 30 pacientes del hospital La Mascota con diagnóstico clínico y los resultados obtenidos fueron los siguientes: 57% HbSS y 43% HbAS.



### III. JUSTIFICACIÓN

Las hemoglobinopatías en Nicaragua son patologías de poca investigación, debido a que aún no se cuenta con un examen de confirmación y algunas muestras son enviadas al país vecino Costa Rica.

La necesidad del sistema de salud de contar con métodos diagnósticos más eficaces y sensibles en la detección de hemoglobinopatías es la principal motivación para llevar a cabo la presente investigación. Actualmente en el país el diagnóstico de la drepanocitosis se realiza con la ayuda de datos clínicos no se cuenta con el apoyo de una técnica capaz de brindar un diagnóstico concluyente al paciente sospechoso de padecer esta enfermedad.

Mediante la técnica de electroforesis se podrían clasificar los tipos de hemoglobinopatías que existen en nuestro país. El empleo de este método contribuiría al mejoramiento de la calidad diagnóstica de los centros hospitalarios, siendo el diagnóstico confirmatorio recomendable para los casos de drepanocitosis u otra hemoglobinopatía.

El efecto indeseable de no poder diagnosticar con exactitud dichas enfermedades trae como consecuencia una medicación no adecuada y un progreso peligroso de la enfermedad, por eso este trabajo es de gran contribución a los pacientes que requieren este análisis.

Entre los beneficios que más destacan podemos mencionar la accesibilidad para la población nicaragüense del diagnóstico de hemoglobinopatías en cuanto a tiempo y dinero.

Con el desarrollo de esta investigación, se pretende establecer la nueva herramienta diagnóstica en Nicaragua para el estudio de anemia de células falciformes y otras hemoglobinopatías en nuestro país.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La enfermedad de células falciformes, a raíz de su descubrimiento ha tenido un lugar primordial en los problemas de salud pública en el mundo y Nicaragua no es la excepción. Actualmente las investigaciones continúan en busca de un tratamiento eficaz que pueda contrarrestar la enfermedad. El diagnóstico en Nicaragua se realiza de manera clínica con algunas pruebas complementarias, de manera que para la realización del presente estudio nos hemos planteado la siguiente pregunta rectora:

¿Cuál es el protocolo a seguir para la estandarización de la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, en el diagnóstico de hemoglobinopatías?

## V. OBJETIVOS

### **Objetivo General**

Estandarizar la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, para el diagnóstico de hemoglobinopatías en el Instituto Politécnico de la Salud, durante el periodo Agosto-Noviembre 2015.

### **Objetivos Específicos**

1. Establecer el protocolo de estandarización de la técnica de electroforesis en acetato de celulosa, adecuando el tiempo y voltaje para las corridas electroforéticas.
2. Determinar la sensibilidad y especificidad del método, utilizando controles de hemolizados de hemoglobina.
3. Comprobar la reproducibilidad de la técnica de electroforesis en acetato de celulosa empleando hemolizado con diferentes patrones de herencia.
4. Clasificar fenotípicamente los tipos de hemoglobinas encontradas en las muestras en estudio.

## VI. MARCO TEÓRICO

Se llama hemoglobinopatías a las enfermedades clínicas resultantes de una anomalía genéticamente determinada de la estructura o síntesis de la molécula de hemoglobina. El grupo más grande de hemoglobinopatías resulta de cambios estructurales hereditarios en una de las cadenas de globina; sin embargo, la síntesis de la cadena anormal no suele estar perturbada. La hemoglobinopatía estructural más común, la anemia de células falciformes, la registro James Herrick en Chicago en 1910 (McKensie, 2000).

### 6.1. Historia

La enfermedad de células falciformes (ECF) fue descrito por primera vez en 1910, en un estudiante que se presentó con síntomas pulmonares. Herrick acuñó el término "en forma de hoz" para describir la peculiar apariencia de la RBC de este paciente. Sin embargo, dado los síntomas del paciente, él no estaba seguro, en el tiempo, si la condición de sangre era tras una enfermedad muy particular o una manifestación de otra enfermedad (Frenette & Atweh, 2007).

En 1923 se demostró que el fenómeno de falciformación era hereditario como rasgo autosómico dominante. Emmel demostró que los glóbulos rojos falciforman cuando la sangre de estos pacientes se tapan bajo cristal y se dejan a temperatura ambiente durante varios días, pero el hecho de que la transformación hacia células falciformes se da como resultado a una caída en la tensión de oxígeno no se reconoció hasta los estudios clásicos de Hahn y Gillespie en 1927 (Beutler, 2008).

Scriver y Waugh, en experimentos que sin duda no recibirían aprobación institucional de la junta de hoy, probó este concepto in vivo mediante la inducción de estasis venosa en un dedo utilizando una goma elástica. Ellos mostraron que hipoxia, inducida por estasis, aumentó drásticamente la proporción de las células en forma de hoz de aproximadamente 15% a más del 95%. Estos estudios fueron observados por Linus Pauling, quien fue el primero en 1945 en proponer la

hipótesis de que la enfermedad podría originar de una anomalía en la molécula de hemoglobina (Frenette & Atweh, 2007).

En 1949 Pauling y Cols, descubrieron que toda la hemoglobina de pacientes con anemia de células Falciformes mostraban una velocidad de migración anormalmente lenta en la electroforesis, mientras que los padres de estos pacientes tenían hemoglobina normal así como anormal. Poco después se descubrieron otras hemoglobinas anómalas sometidas a electroforesis (Beutler, 2008).

Esto fue seguido de los estudios que analizaron la estructura y las propiedades físicas de (Hb S), que formó polímeros intracelulares después de la desoxigenación. Estos estudios colocan SCD a la vanguardia de las investigaciones para dilucidar la base molecular de las enfermedades humanas.

La naturaleza bioquímica del defecto en la anemia de células falciformes la dilucido Ingram, que dirigió la hemoglobina con tripsina y separó los péptidos resultantes en papel mediante electroforesis en una dirección y mediante cromatografía en la otra. La determinación de la composición de aminoácidos de este péptido indicaba que la anemia de células falciformes era el resultado de un reemplazo de un residuo de ácido glutámico por valina (Conley, 1980).

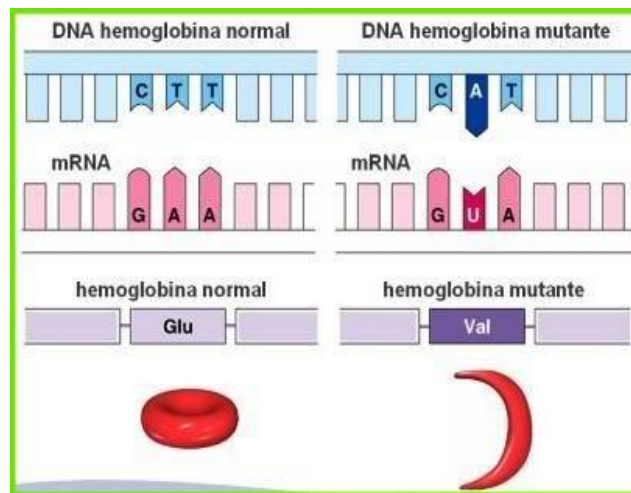
En las enfermedades de células Falciformes están incluidas las variantes falciforme-hemoglobina C (Enfermedad de la hemoglobina SC), la enfermedad de células falciformes-hemoglobina D (Hemoglobina SD), la talasemia  $\beta$  de células falciformes y la anemia de células falciformes (estado homocigoto SS).

## 6.2. Enfermedad de Células Falciformes

La Anemia de células falciformes es la hemoglobinopatía sintomática más común en todo el mundo, con una incidencia mayor en África. Es interesante señalar que las áreas geográficas con la mayor frecuencia de genes drepanocíticos también son áreas donde la infección por *Plasmodium falciparum* es común. Esta correlación sugiere fuertemente la posibilidad de que la HbS confiera una ventaja

selectiva contra infecciones palúdicas mortales. Se ha sugerido que la resistencia al paludismo se produce porque las células parasitadas adquiera la forma falciforme con más facilidad, lo que conduce al secuestro y fagocitosis de las células infectadas por el bazo (McKensie, 2000).

### 6.3. Etiología y Patogénesis



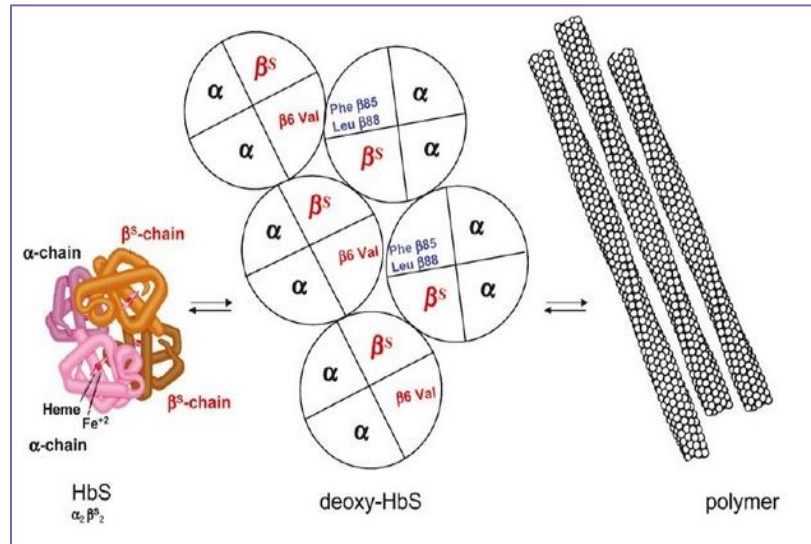
**Fig. 1. Mutación** La HbS es la hemoglobina mutante producida cuando la valina no polar se sustituye por ácido glutámico polar en la sexta posición, en la hélice A3 de la cadena ( $\beta 6(A3)$  Glu $\rightarrow$ Val) (McKensie, 2000). Esta sustitución produce cambios en la carga neta; en consecuencia cambia la movilidad electroforética. Anónimo (2013)

La localización superficial del aminoácido (residuo) mutado y su diferente carga eléctrica explica el que la hemoglobina S pueda distinguirse fácilmente de la hemoglobina A normal por su menor movilidad electroforética (Sans-Sabrafen, Besses Raebel, & Vives Corrons, 2007).

La modificación del entorno químico que existe en esta molécula, favorece la polimerización de la misma en condiciones de desoxigenación y la formación de grandes dominios intracelulares, dentro de los cuales las hemoglobinas agregadas no participan, de manera eficiente, del proceso de transporte de oxígeno. Diversos factores favorecen la polimerización, entre ellos, la temperatura, el pH, la concentración iónica, la concentración de oxígeno y de hemoglobinas S y F (Álvarez-Guerra & Fernández-García, 2007).

La interacción de la HbS con otras hemoglobinas explica que la mezcla de cantidades proporcionales de HbS y HbA reduzca la intensidad de la

polimerización al 50%, o que esta sea nula si en lugar de HbA existe HbF (Sans-Sabrafen, Besses Raebel, & Vives Corrons, 2007). Este efecto de la HbF, permite evaluar opciones terapéuticas basadas en la inducción de síntesis de HbF durante la edad adulta.

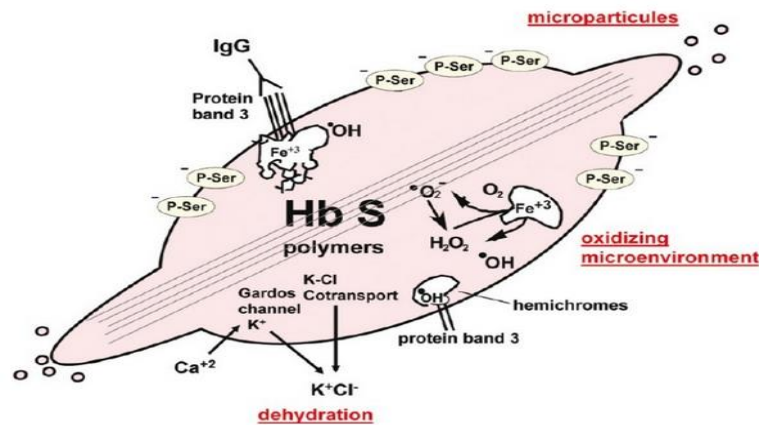


**Fig. 2. Polimerización de la hemoglobina S.** Tiene lugar en tres etapas: la nucleación, la polimerización y el alineamiento. Modificado de Odièvre et al, 2011

El proceso de polimerización de la hemoglobina S tiene lugar en tres etapas. La primera etapa, la nucleación, se inicia con la agregación de cerca de 15 moléculas de hemoglobina en grupos (Conocida también como retardo). Durante ese tiempo el hematíe se comporta de manera normal sin cambios aparentes. La segunda etapa, la polimerización, aumenta la viscosidad del contenido intracelular al polimerizarse la desoxihemoglobina S en fibras de 14 tiras con el uso de los agregados de la primera etapa. La tercera etapa, el alineamiento, las fibras se alinean para formar fascículos. En esta etapa el hematíe toma forma de Hoz (McKensie, 2000).

Aunque el fenómeno de la falciformación es reversible, entre el 5 y el 50% de eritrocitos falciformes no pueden recuperar su forma original, por lo que son inmediatamente eliminados por el sistema mononuclear fagocítico (SMF). La proporción entre drepanocitos reversibles (DR) y drepanocitos irreversibles (DI)

varía entre pacientes, aunque generalmente existe un predominio de DR que recuperan su forma normal en presencia de oxígeno (Sans-Sabrafen, Besses Raebel, & Vives Corrons, 2007).



**Fig. 3. Consecuencias de la polimerización.** Conforme los polímeros de HbS crecen, dañan y se hernian a través de la membrana eritrocítica, permitiendo el ingreso de  $Ca^{++}$ , que a su vez produce un eflujo de  $K^+$  y  $H_2O$ . Debido a esto las células cada vez más se deshidratan, se vuelven densas y rígidas hasta convertirse en lo que se denomina células falciformes irreversibles (irreversible sickle cells, ISCs), las cuales mantienen su forma aun cuando están completamente oxigenadas. Modificado de Odièvre et al, 2011

La estructura de este polímero se ha deducido a partir de los estudios realizados mediante difracción de rayos X y microscopía electrónica de transmisión. Cada polímero está formado por 14 tetrámeros de desoxi-Hb que se disponen formando haces longitudinales unidos entre sí (Sans-Sabrafen, Besses Raebel, & Vives Corrons, 2007).

El bazo, el riñón, la retina y la medula ósea proporcionan un microambiente lo suficientemente hipóxico, acidótico e hipertónico para promover la polimerización de la HbS y la adopción de la forma falciforme (McKensie, 2000).

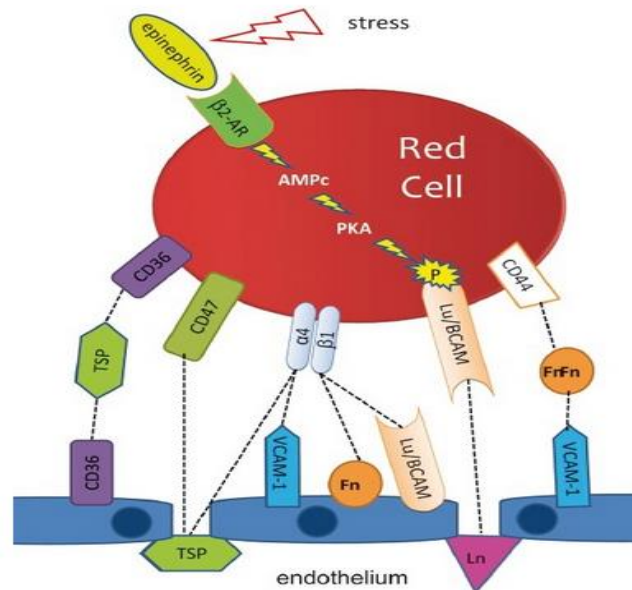
La célula roja exhibe, en estas condiciones, un acortamiento del tiempo de vida medio y los procesos de envejecimiento y destrucción en el sistema reticuloendotelial están incrementados. El resultado directo de este fenómeno es la anemia marcada que presentan los pacientes. La crisis vasooclusiva es el evento agudo de mayor impacto.



El fenómeno vasooclusivo se invoca como la causa de la mayoría de las complicaciones que afectan al enfermo y está caracterizada por la existencia de episodios dolorosos de intensidad y duración variable

### 6.3.1. Factores que afectan la Gravedad de la enfermedad

#### Reacciones de Adhesión



**Fig. 4. Reacción de adhesión.** Las primeras partículas moleculares identificadas como actores de estas interacciones anormales en los glóbulos rojos fueron la integrina  $\alpha 4 \beta 1$ , que se une directamente a la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) en la superficie endotelial, y CD36 que interactúa con otra molécula CD36 en el endotelio a través de un puente molecular formado por una molécula de trombospondina plasmática (TSP). Otro ejemplo, la molécula de adhesión celular basal (grupo sanguíneo Lutheran) antígeno Lu / BCAM en la superficie SS-RBC interactúa con laminina en la matriz subendotelial. Modificado de Odièvre et al, 2011

Los principales actores de este proceso de adherencia anormal son una población de glóbulos rojos jóvenes, conocidos como "los reticulocitos de estrés". Estos reticulocitos de estrés, que sale prematuramente de la médula ósea debido a la tensión anémica, expresan sus proteínas de adhesión de superficie que normalmente las mantienen en la médula. Por lo tanto, crisis vaso-oclusivas parece estar compuesto por dos pasos consecutivos. La primera de ellas consiste en la adhesión de los reticulocitos de estrés al endotelio de las vénulas post-capilares, lo que frena el flujo de sangre y por lo tanto, inducen y propagan la

formación de células falciformes, que se mantienen durante un tiempo más largo en un entorno hipóxico. Esta primera etapa conduce a un segundo momento, que corresponde al atrapamiento de células falciformes irreversibles y a la oclusión completa de los microvasos.

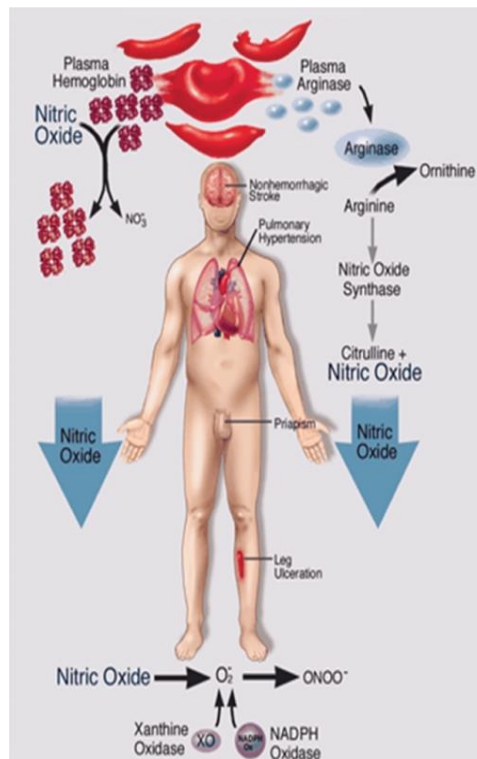
El nivel plasmático de VCAM-1 soluble (sVCAM-1), un marcador de la inflamación endotelial, es significativamente elevado en los pacientes de SCD cuando se compara con controles sanos, y el VCAM-1 aumenta los niveles aún más durante la crisis vaso oclusiva. El mismo patrón se observa para la endotelina-1, que promueve la vasoconstricción y la inflamación (Finnegan, Turhan, Golan, & Barabino, 2007).

Todas las células en el vaso sanguíneo están implicadas, se ha vuelto cada vez más claro que el SS-RBC y EC no son los únicos actores de COV. Por ejemplo, TSP plasma es secretada por las plaquetas activadas. Polimorfonucleares neutrófilos (PMN) también parecen ser actores esencial. Hiperleucocitosis es casi constante en los pacientes de SCD, y un recuento alto PMN es un elemento preocupante (Odièvre, Verger, Silva-Pinto, & Elion, 2011).

### Óxido Nítrico

El óxido nítrico es producido en las células endoteliales y de allí migra hacia las células del músculo liso vascular adyacente en donde, a través de segundos mensajeros, produce relajación de la vasculatura.

NO induce un programa coordinado de eventos celulares que promueven el flujo de sangre, principalmente mediante la supresión de la agregación plaquetaria, la expresión de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales, y la secreción de proteínas procoagulantes.



**Fig. 5. Efecto de la disminución del óxido nítrico.** Estudios recientes también han sugerido que, además de la polimerización de la hemoglobina S en el glóbulo rojo, una deficiencia del vasodilatador endógeno, el óxido nítrico, puede estar implicado en la patogénesis de la enfermedad. Hemoglobina liberada como consecuencia de la hemólisis consume rápidamente el óxido nítrico, dando lugar a todo un programa de eventos que inhiben el flujo de sangre. Modificado de Jama ,2009.

Aunque los informes han variado, algunos investigadores han encontrado niveles bajos de los niveles de NO<sub>x</sub> (nitrito y nitrato) en pacientes con enfermedad de células falciformes y estos niveles reducidos son consistentes con la generación endotelial de NO, y sus reacciones posteriores con la hemoglobina y el oxígeno. Los tres principales mecanismos de perjudicar la biodisponibilidad de NO parecen ser debidos a la disminución de plasma L-arginina y el consumo de NO por la hemoglobina de plasma libre de células y por especies reactivas del oxígeno (Kyle Mack & Kato, 2006).

L-Arginina es un aminoácido importante en la producción endógena de NO. La arginina es absorbido en las células a través de un transportador de aminoácidos catiónicos y se convierte en NO mediante la enzima NO sintasa. Liberación patológica de la arginasa en el plasma sanguíneo parece contribuir a la disminución de la biodisponibilidad de NO. Los pacientes con enfermedad de

células falciformes tienen hemólisis en curso y liberación de la arginasa, que agota continuamente la síntesis de NO y se asocia con el riesgo de mortalidad por hipertensión pulmonar (Kyle Mack & Kato, 2006).

La hemoglobina de plasma libre de células resultante de la hemólisis intravascular consume NO 1.000 veces más rápidamente, lo que limita drásticamente la biodisponibilidad de NO en los pacientes con enfermedad de células falciformes. Por lo tanto, la hemólisis intravascular produce un estado de resistencia a la vasodilatación dependiente de NO (Kyle Mack & Kato, 2006).

Terapias dirigidas a la disminución de la destrucción de óxido nítrico, aumento de la producción de óxido nítrico, o amplificar la respuesta de óxido nítrico puede resultar beneficioso.

### Leucocitos

La presencia de leucocitos adherentes en pequeñas vénulas postcapilares se está convirtiendo en un factor clave que contribuye a Vasooclusión durante la SCD (Sickle Cell Disease) (Frenette & Atweh, 2007).

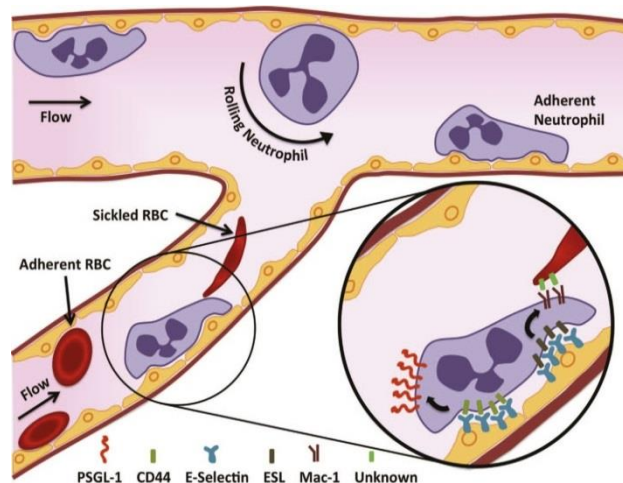


Fig. 6. Leucocitos adherentes. Los leucocitos son células grandes que son rígidas y no se deforma con facilidad como resultado de un alto coeficiente viscoelástico. Modificado de Frenette and Manwani, 2013

Los recuentos de leucocitos elevados se asocian con la progresión de la gravedad de la enfermedad, el riesgo de accidente cerebrovascular, y el riesgo de muerte temprana. Además, la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos se incrementa en pacientes con SCD en estado estacionario en comparación con los controles sanos. En particular, la expresión de leucocitos de  $\alpha_M\beta_2$  (CD11b / CD18, Mac-1) y L-selectina (CD62L) está fuertemente asociada con la crisis vaso-oclusiva, accidente cerebrovascular y nefropatía en la SCD. Además, la reducción en la gravedad de los síntomas SCD siguiente de la terapia con hidroxiurea (HU) se produce en paralelo con disminuciones en los recuentos de leucocitos y la expresión de moléculas adhesión de leucocitos (Finnegan, Turhan, Golan, & Barabino, 2007).

#### **6.4. Herencia**

Se transmite y padece por ambos sexos con los caracteres de la herencia mendeliana dominante. Sólo padecen la enfermedad los homocigóticos. Los heterocigóticos puros, es decir, los que heredan el gen patológico solamente de uno de los padres y tienen el alelomorfo normal, son simplemente portadores del estigma drepanocítico, lo que se reconoce por la presencia de la hemoglobina S en los eritrocitos. Los heterocigóticos mixtos, es decir, los que heredan de uno de los padres el gen para la hemoglobina S y del otro uno para otra de las variantes patológicas de hemoglobina, padecen una forma atípica de Anemia Drepanocítica.

#### **6.5. Aspectos Clínicos**

El niño recién nacido está protegido por el alto nivel de hemoglobina fetal en los glóbulos rojos durante las primeras 8-10 semanas de vida. Conforme el nivel baja, las manifestaciones clínicas de la enfermedad aparecen, las manifestaciones hematológicas son aparentes hacia la décima o duodécima semana de vida (Beutler, 2008).

Las manifestaciones clínicas son resultado de la vaso-oclusión y la hemólisis que conducen a isquemia e infartos tisulares con manifestaciones agudas y crónicas; es una enfermedad de presentación variable de un individuo a otro, con afectación

de múltiples órganos (hueso, pulmones, cerebro, riñón, bazo) y se caracteriza por periodos de crisis repetidas o ausencia de síntomas por tiempo prolongado.

### **6.5.1. Crisis**

Se dan varios tipos de crisis, estas pueden clasificarse como sigue: crisis vaso-oclusivas (dolorosas), crisis aplásica, crisis de secuestro y crisis hemolíticas.

Crisis Dolorosas: El dolor puede presentarse en cualquier zona del cuerpo, pero lo más frecuente es que se sienta en el tórax o las extremidades. En los bebés y niños menores de 3 años se puede presentar inflamación dolorosa de los dedos de las manos y de los pies (dactilitis). El priapismo es un bloqueo doloroso que se presenta en el pene. Cualquier interrupción en el flujo sanguíneo al cuerpo puede provocar dolor, inflamación y posible muerte del tejido adyacente que no recibe la suficiente cantidad de sangre ni de oxígeno.

El priapismo se produce en al menos un tercio de los hombres con anemia de células falciformes y es un ejemplo prominente de la vasculopatía hoz relacionadas con el NO (Kato, Hebbe, Steinberg, & Gladwin, 2009).

Crisis aplásica: Son de tipo parecido a las de los pacientes con otros trastornos hemolíticos, en los que el recuento de reticulocitos cae a niveles bajo, indicando que la producción de glóbulos rojos ha disminuido drásticamente. La depresión de la eritropoyesis se asocia generalmente con infecciones (Beutler, 2008).

Secuestro esplénico (acumulación): crisis resultado de la acumulación de células falciformes en el bazo. Esto puede producir una disminución repentina de hemoglobina y poner en peligro la vida si no se trata rápidamente. Después de episodios repetidos de secuestro esplénico, se forman cicatrices en el bazo, el cual queda permanentemente dañado.

Con el tiempo, la estasis crónica conlleva a infarto esplénico, fibrosis y encogimiento progresivo que alcanza su grado mayor en la adolescencia (autoesplenectomía) (Medstater, 2011). El riesgo de infección es una

preocupación de importancia en los niños con deficiencia esplénica. La infección es la principal causa de muerte en los niños menores de 5 años en esta población.

Crisis Hemolíticas: La duración de la vida del glóbulo rojo esta acortada en todas las variedades de enfermedad de células falciformes. Puede súbitamente estar aún más reducida, probablemente por una serie de razones. Estas crisis son muy raras; en la mayoría de los casos los cambios considerados como debidos a hemolisis aumentada representan alguna otra complicación de la enfermedad (Beutler, 2008).

Ictericia señal y síntoma comunes de la anemia drepanocítica. Las células falciformes no viven tanto tiempo como los glóbulos rojos normales y, por lo tanto, mueren a una velocidad más rápida que la capacidad de filtración del hígado.

### **6.5.2. Otras Manifestaciones Clínicas**

Todos y cada uno de los órganos principales se ven afectados por la anemia drepanocítica. El hígado, el corazón, los riñones, la vesícula biliar, los ojos, los huesos y las articulaciones pueden sufrir daño como consecuencia de la función anormal de las células falciformes y su incapacidad de fluir correctamente a través de los pequeños vasos sanguíneos. Los problemas pueden incluir:

Aumento de las infecciones: Son la principal causa de morbilidad y mortalidad especialmente en los paciente menores de 5 años; el bazo juega un papel importante en el incremento de la susceptibilidad a ciertas infecciones en este tipo de pacientes, el exceso de eritrocitos dañados sobrepasa su capacidad de filtro impidiendo su función inmunológica (asplenia funcional) además se produce fibrosis progresiva lo que aumenta la susceptibilidad a infecciones. Por todas estas razones los individuos con anemia de células falciformes tienen mayor susceptibilidad a presentar infecciones por gérmenes encapsulados como *Streptococo pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella spp* (Quintero & Jimenez Hernandez, 2012).

Úlceras en las piernas: son complicaciones frecuentes y debilitantes en pacientes con anemia de células falciformes. Una inadecuada suplencia de sangre ha sido postulada como un factor importante en la ocurrencia de la tardanza en la curación (Beutler, 2008).

Daño óseo: puede ir seguida por la aparición de reacciones perióstica; y pueden observarse áreas irregulares de osteosclerosis, representando áreas de infarto oseo (Beutler, 2008).

Daño ocular: Dentro de la extensa patología que se produce en la drepanocitosis, existen los cambios patológicos a nivel ocular, con trastornos circulatorios en la conjuntiva y cambios retinianos consistentes en el emblanquecimiento y condensación de vítreo basal, con cambios en los vasos periféricos, lesiones coriorretinales pigmentadas en la periferia de la retina, depósitos brillantes, retinitis proliferativa, hemorragias retinianas y desprendimiento de retina. Estas complicaciones obedecen a oclusiones de los pequeños vasos de la retina que ocasionan sufusiones hemorrágicas y signos proliferativos característicos de neoformaciones vascular compensadora (Sans-Sabrafen, Besses Raebel, & Vives Corrons, 2007).

## **6.6. Tratamiento, Curso y Pronóstico**

Como todavía no hay disponible ningún tratamiento específico, plenamente satisfactorio, para los trastornos de células falciformes, los médicos deben concentrar sus esfuerzos terapéuticos en la dirección del cuidado médico general continuo y efectivo y en el apropiado tratamiento de las complicaciones conforme surjan (Beutler, 2008).

El desarrollo clínico de la hidroxiurea como una agente que induce la producción de Hb F en SCD ofrece una vívida ilustración de cómo los descubrimientos científicos puede traducirse en terapias que mejoran el pronóstico para los pacientes que sufren de una debilitante enfermedad (Frenette & Atweh, 2007). La hidroxiurea (HU), es un medicamento citotóxico usado anteriormente para tratar la leucemia mieloide crónica y la policitemia vera, causa inhibición de la síntesis de



ADN y aumenta la producción de Hb F que a su vez disminuye la polimerización de la HbS. La HU induce supresión medular que resulta en eritropoyesis inefectiva y de esta manera favorece a la producción de precursores que contienen Hb F. La HU mejora también el estado de deshidratación del GR falciforme y disminuye su adhesión a las células endoteliales (Quintero & Jimenez Hernandez, 2012).

El trasplante alogénico es una modalidad que tiene el potencial para curar estos pacientes. Hasta la fecha, trasplante de donante hermano es ampliamente aceptado como un estándar de atención para los pacientes pediátricos. La utilización de donantes alternativos para el trasplante todavía está bajo investigación, como es el trasplante en pacientes adultos con enfermedad de células falciformes. Esta revisión se centra en los datos más recientes para el trasplante de células hematopoyéticas para los pacientes con enfermedad de células falciformes (Oshrine & Talano , 2015).

Alloinmunización contra antígenos de glóbulos rojos (RBC) es una causa de morbilidad y mortalidad en pacientes transfundidos con enfermedad de células falciformes (ECF).

Las manifestaciones de la enfermedad de células falciformes varían con la edad. Las manifestaciones agudas se asocian con frecuencia con infecciones graves en la infancia, mientras que en el adulto, los síntomas son característicamente crónicos y relacionados con los órganos, aunque todavía potencialmente comprometedores de la vida. Hasta que se disponga de más datos de la enfermedad en la infancia, no es posible predecir si el síndrome de muerte súbita en bebés con anemia de células falciformes es frecuente o raro (Beutler, 2008).

### **6.7. Rasgo de Células Falciformes**

El rasgo de células falciformes es un estado heterocigoto para las enfermedades de células falciformes, y es la forma más benigna de los trastornos falciformes. En este rasgo menos de la mitad de la hemoglobina de cada glóbulo rojo es HbS. (Beutler, 2008)

El rasgo falciforme no es trastorno tan grave como la drepanocitemia, ya que la presencia de la HbA u otra variante estructural de la cadena  $\beta$  de la hemoglobina interfiere con el proceso de polimerización. Aunque hemoglobinas distintas de la HbS se pueden ensamblar en el polímero de la desoxihemoglobina S, la presencia de estas cadenas  $\beta$  alternas con las cadenas  $\beta$  de la HbS crea una estructura debilitada y disminuye el grado de polimerización (McKensie, 2000).

Este Rasgo carece de signos clínicos, por lo cual solo puede ponerse en manifiesto mediante electroforesis de hemoglobinas. Por ello, cuando en un individuo portador de rasgo falciforme se aprecian signos clínicos de hemolisis, es prudente revisar de nuevo el diagnóstico, por si dicha manifestación pudiera corresponder a otra causa. Excepcionalmente la enfermedad puede ponerse en manifiesto en situaciones de estrés, tales como disminuciones importantes de la presión parcial de oxígeno atmosférico (Altitud, submarinismo o anestesia) o tras la realización de un ejercicio físico intenso. En cualquier caso, las manifestaciones clínicas del rasgo heterocigoto, cuando existen, se refieren más a alteraciones vasooclusivas que a la anemia hemolítica (Sans-Sabrafen, Besses Raebel, & Vives Corrons, 2007).

### **6.8. Enfermedad por Hemoglobina C**

La HbC es en frecuencia la segunda hemoglobinopatía después de la HbS. obedece a una mutación ( $G \rightarrow A$ ) en el codón 6 del gen  $\beta$  globina que causa la sustitución del ácido glutámico por Lisina ( $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$ ). Se trata de una hemoglobinopatía prácticamente exclusiva de la raza negra, que se localiza preferiblemente en la región centrooccidental del continente africano con alta frecuencia, en el sur de Ghana y en la región más occidental de Nigeria (Sans-Sabrafen, Besses Raebel, & Vives Corrons, 2007).

Su presencia en individuos de raza blanca es infrecuente, y debido a su falta de expresividad clínica suele pasar desapercibida.

Al igual que la HbS, va acompañada de una alteración de la carga eléctrica superficial del eritrocito y de una disminución de la solubilidad, por lo que la hemoglobina tiende a cristalizarse.

### **6.9. La Afrodescendencia de Nicaragua**

En la gran mayoría de los países latinoamericanos hay dos etnias que predominan, la española y la Indígena, añadiéndose en muchos de ellos, una tercera etnia, la africana. Nicaragua por su privilegiada posición en el istmo centroamericano, fue un lugar de encuentros de diferentes grupos raciales (Romero, 1993).

El derrumbe de los aborígenes y la introducción de negros africanos, provocaron la mezcla de la población y aunque, la etnia "negra pura" no era numéricamente importante en las ciudades civiles, sí lo era la población por cuyas venas corría sangre africana. Así la población India se sustituyó por una población mezclada, donde uno de sus componentes era de origen africano. Es así como el mestizaje nicaragüense es un fenómeno social que inicia en el país en el siglo XVI (Romero, 1993).

En una muestra de la población de ascendencia mixta africana que vive en Bluefields, Nicaragua, el patrón de la migración y la distribución de los marcadores genéticos de glóbulos rojos y suero han sido estudiados. Se concluyó que, a pesar de un considerable nivel de migración interna y externa, una estructura genética distintiva es mantenida por la población. Por otra parte, un emparejamiento selectivo fuertemente negativo se observa entre las personas que habitan en las zonas occidental y oriental de Nicaragua (Biondi, Battistuzzi, Santolamazza, & et. al., 1988).

En el mismo mestizaje señalan algunos especialistas que el 90% de la población nicaragüense tiene sangre indígena aun cuando pesen en mayor o menor grado otros ingredientes étnicos incluido el pringue africano y la proporción Europea.

En el estudio familiar, la clasificación de patrón electroforético de hemoglobina ayuda a planificar la descendencia. Todos tenemos dos genes para la hemoglobina. El bebé recibe un gen de cada progenitor. Así podremos conocer las posibilidades teóricas de tener un hijo con la enfermedad.

### **6.10. Diagnóstico**

El diagnóstico de enfermedad de células Falciformes se establece con base en la identificación de la hemoglobina S. En el enfermo, homocigoto, el cuadro clínico está dado por los fenómenos de vasooclusión y/o hemolisis del drepanocito. El portador (AS), generalmente es asintomático. En ambos caso se requieren estudios de laboratorio para confirmar el diagnóstico (Ferguson, Sánchez, & Rojo, 2003).

En el enfermo y en el portador la presencia de hemoglobina S se determina por las pruebas de inducción de drepanocitos y de solubilidad de la hemoglobina, pero la electroforesis de hemoglobina es la que confirma su presencia (Ferguson, Sánchez, & Rojo, 2003).

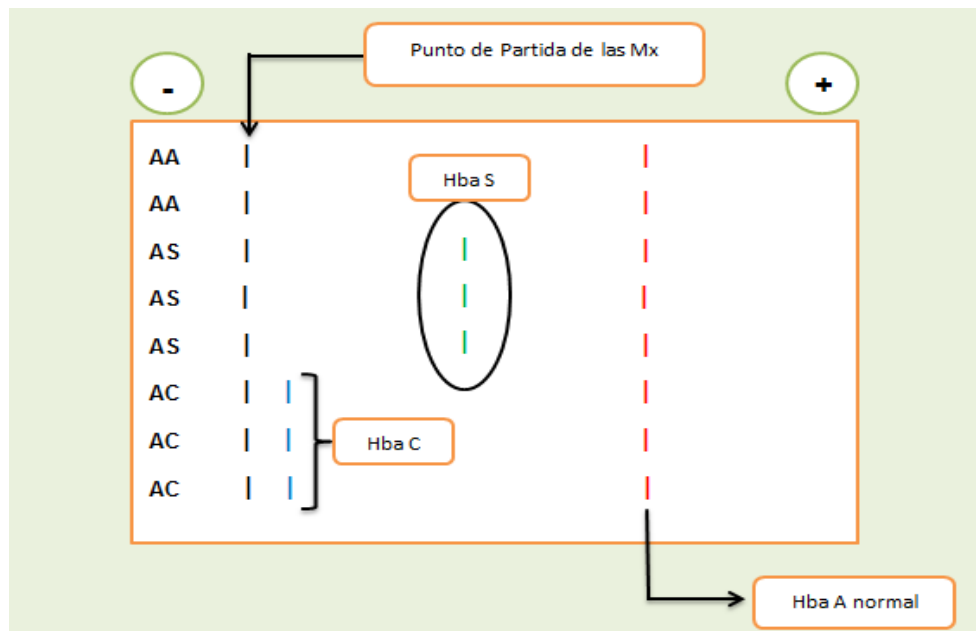
Test de falciformación: En un medio carente de oxígeno (O<sub>2</sub>) la hemoglobina S se hace menos soluble y forma agregados cristalinos con la consiguiente formación de drepanocitos. Se coloca una gota de sangre en un portaobjetos, se le agrega metabisulfito de sodio 2%, que es un reactivo consumidor de O<sub>2</sub>, se tapa con un cubreobjetos y se sellan los bordes con petrolato; en pocos minutos se puede observar el fenómeno. Si no se agrega el metabisulfito habría que esperar entre seis y 24 horas para que ocurriera (Ferguson, Sánchez, & Rojo, 2003). Los pacientes considerados portadores sanos (Heterocigoto Hb AS) por lo general dan positivos en esta prueba, por lo tanto resulta inútil en la clasificación fenotípica.

Prueba de Solubilidad: Aquí también ocurre una desoxigenación de la hemoglobina S, pero utilizando sustancias como el ditionato, la hemoglobina S se hace insoluble y se precipita, observándose turbia la solución. Esta prueba es más fácil y rápida de realizar, pero puede dar falsos negativos en los pacientes con anemia severa a menos que se realice en el hematocrito y en casos de

hemoglobina F aumentada, y los falsos positivos pueden estar dados por otras causas de turbidez como en las disglobulinemias (Ferguson, Sánchez, & Rojo, 2003).

### 6.10.1. Electroforesis de Hemoglobina en Acetato de Celulosa

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. A pH 8.4-8.6 la hemoglobina es una proteína cargada negativamente, y por lo tanto migrara hacia el ánodo. En estas condiciones de pH, varias hemoglobinas pueden separarse con facilidad debido a sus diferencias de carga eléctrica neta causadas por las variantes estructurales (Ejemplo: A, S, C, etc) (Saenz Renauld & Rodriguez Romero, 2003).



Todo escrutinio electroforético debe iniciarse a pH alcalino, pues es el sistema que mejor permite la identificación preliminar de hemoglobinas rápidas y lentas (Saenz Renauld & Rodriguez Romero, 2003). Según Schneider datos combinados permiten la diferenciación, con un alto grado de especificidad, de unas hemoglobinas cargadas de modo similar (Schneider, 1974). Este es el caso de la HbS que migra en la misma posición que la HbD, la diferenciación puede hacerse por varios métodos, entre ellos, la electroforesis en gel de agar a pH 6.1. En estas

condiciones la HbD migra igual que la HbA, no así la HbS (Saenz Renauld & Rodriguez Romero, 2003).

Otro dato que puede ser utilizado es el llamado punto isoeléctrico, que se refiere a una carga cero de la proteína, influenciada por el pH. Por ejemplo el Punto Isoeléctrico de la HbA es pH 6.8 (Saenz Renauld & Rodriguez Romero, 2003). Conocer el porcentaje normal de las hemoglobinas también es un referente importante, por ejemplo, a pH alcalino la hemoglobina A2 y C, migran en la misma posición, su diferencia radica en que en estado heterocigoto la HbC constituye del 25-40% del total de la hemoglobina, mientras que la HbA2 se encuentra en un porcentaje inferior al 10% aun en los casos de talasemia A2, en los cuales esta fracción esta aumentada al doble.

Los estudios de hemoglobinas anormales mediante la técnica de electroforesis en acetato de celulosa se llevan a cabo con rapidez y sensibilidad. Tiene sus limitaciones, la más importante es la incapacidad para detectar mutaciones entre aminoácidos neutros (Saenz Renauld & Rodriguez Romero, 2003). Pero de las más de 700 variantes de hemoglobinas conocidas, solo tres representan el 90 % de las hemoglobinopatías que son detectadas por medio de esta técnica. Estas son HbSS, C, y E.

A pesar de los avances tecnológicos, Bárbara Bain detalla que esta técnica sigue siendo la técnica más común para la detección y caracterización de una variante de hemoglobina inicial, aunque la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) está tomando cada vez más su lugar (Bain, 2001).

### **6.11. Estandarización del Método**

Los nuevos métodos empleados en un laboratorio deben ensayarse con el fin de determinar su capacidad para determinar las enfermedades en forma correcta. En este proceso de evaluación se igualan los resultados de una prueba con la presencia o ausencia de enfermedad en el paciente y se imite un juicio con respecto a la capacidad de la prueba para reflejar el verdadero estado del paciente.

La estandarización del método, hace referencia al ajuste de la variabilidad esperada a un procedimiento de referencia o una normativa para aumentar la eficiencia del método o ajustarlo a las condiciones del medio.

El proceso de estandarización de un método permite estudiar las condiciones de temperatura, pH, iluminación, humedad y otros requisitos prácticos que influyen en el resultado final. Este conjunto de estudios constituye la antesala de la validación que como proceso más complejo, establece que las características determinadas previamente, reúnen los requisitos para la aplicación de la técnica analítica. Este proceso requiere un entorno que garantice la seguridad de los resultados obtenidos en cuanto al entrenamiento y calificación del personal y las instalaciones, verificación de los instrumentos de medición, control de equipamiento y de la documentación, por último, la evaluación de los parámetros de validación del método. (Martínez, y otros, 2003)

Voltaje: Es la fuerza que determina movimiento o migración de la proteína a través del campo eléctrico. A mayor voltaje las proteínas se mueven más rápidamente, pero aumenta el calor. (Angulo & Gaitan, 2010)

Temperatura: Las proteínas son fácilmente desnaturalizadas por el calor, el cual no debe exceder de 50° C altas temperaturas también conducen a la evaporización y a un incremento en la fuerza iónica del tampón. Depende básicamente del voltaje de la electroforesis, la concentración de sales (poder de conductancia) del buffer y del pH. (Angulo & Gaitan, 2010)

Agua destila: En biología molecular la calidad del agua (grado de pureza) es imprescindible para obtener óptimos resultados en cada experimento. Si el investigador cuenta con un equipo de destilación asegúrese que el agua presente una resistividad eléctrica lo cual indica un alto grado de pureza. (Angulo & Gaitan, 2010)

Al igual que los métodos de medida cuantitativos, los métodos cualitativos también deben validarse. La validación de un método no depende de que éste sea cuantitativo o cualitativo, ya que validar consiste en verificar y documentar su

validez, su adecuación a unos requisitos previamente establecidos. Esta es la idea que queda recogida en la definición proporcionada por la norma ISO 8402 y que implica el concepto de adecuación a la finalidad o propósito perseguido, ‘*fitfor-purpose*’. (Ruisánchez, Trullols, & Rius)

Un ensayo estandarizado es un método que produce constantemente el mismo resultado para una muestra dada cuando se repite varias veces y cuando se lleva a cabo por diferentes analistas en diferentes laboratorios. (Martínez, y otros, 2003)

*“Validación es la confirmación mediante la examen y la provisión de una evidencia objetiva de que se han satisfecho unos requisitos particulares para un uso pretendido y específico”*

#### Definición de validación según la norma ISO 8402

Algunos de los parámetros de tipo cualitativo más relevantes son la especificidad, sensibilidad y reproducibilidad.

##### **6.11.1. Especificidad**

También denominada “fracción de verdaderos negativos (FVN)”, es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos (Pita Fernández, 2003).

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

##### **6.11.2. Sensibilidad**

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad. Compara el número de negativos verdaderos con todas las muestras de pacientes cuyos resultados debieron de ser negativos (Pita Fernández, 2003).



$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

### 6.11.3. Reproducibilidad

De acuerdo con el VIM (Vocabulario Internacional de Metrología) la reproducibilidad de resultados de mediciones es: La proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo condiciones de medición que cambian. Dónde: (1) Una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifique la condición que cambia. (2) Las condiciones que cambian pueden incluir: principio de medición, método de medición, observador, instrumento de medición, patrón de referencia, lugar, condiciones de uso, tiempo.

Las evidencias preliminares de reproducibilidad (concordancia entre los duplicados dentro de un mismo ensayo y entre distintas realizaciones de la prueba) resultan necesarias para garantizar el posterior desarrollo del ensayo a validar. (Niang, 2004) Para obtener estimaciones de reproducibilidad en métodos cualitativos suele ser suficiente realizar dos o tres réplicas de cada muestra y llevar a cabo el ensayo en al menos cinco ocasiones diferentes.

## VII. DISEÑO METODOLÓGICO

**Tipo de Estudio:** Descriptivo de corte transversal, con el objetivo de estandarizar la técnica de electroforesis de hemoglobina en el estudio de las hemoglobinopatías, para ser utilizada en el laboratorio del POLISAL UNAN-Managua.

**Área de Estudio:** Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Politécnico de la Salud (IPS).

**Universo y Muestra:** se utilizó la totalidad de las muestras controles facilitadas por el CIHATA y muestras adicionales proporcionadas por el hospital Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”.

**Unidad de Análisis:** Hemolizados controles de Costa Rica y muestras sanguíneas de los pacientes atendidos en el hospital Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”, con diagnóstico presuntivo o confirmado clínicamente de drepanocitosis u otra hemoglobinopatía.

### **Criterios de Inclusión**

1. Viabilidad de los controles: verificación de la temperatura de transporte, etiqueta o código. Que estén debidamente clasificados y tengan el debido almacenamiento del laboratorio de origen.
2. Pacientes atendidos diagnosticados o sospechosos clínicamente de anemia drepanocítica en el hospital Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”.

### **Criterios de exclusión**

1. Controles no viables para su uso: mal manejo de la temperatura y/o confusión en la etiqueta de los controles.
2. Pacientes atendidos cuyos diagnósticos clínicos no sugieren ninguna hemoglobinopatía.

**Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de la información**

Las muestras controles fueron amablemente facilitados por el Dr. Walter E. Rodríguez Romero, Docente Investigador del CIHATA de la Universidad de San José, Costa Rica, guardando una estricta cadena de frío. Las muestras se rescataron, antes de su descarte, del laboratorio de Hemato-Oncología del hospital de referencia nacional Manuel de Jesús Rivera (La Mascota), encontradas en tubos de ensayo con anticoagulante EDTA-k3, se confirmó el nombre y código de trabajo, luego llevadas al laboratorio de Biología Molecular del Instituto Politécnico de la Salud donde se realizó el hemolizado, se separaron alícuotas, posteriormente procesados mediante electroforesis en acetato de celulosa, con la debida autorización de la directora del departamento de Bioanálisis Clínico y la supervisión del Dr. Allan Pernudi Ubau Msc. PhD., responsable del laboratorio de Biología Molecular del POLISAL.

**Muestras Controles:** controles hemolizados de Hb AA, Hb AS y Hb SC, facilitados por el Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA), San José, Costa Rica. También se procesaron muestras biológicas de pacientes atendidos en el Hospital la Mascota, cuya finalidad era descarte, diagnosticados o sospechosos de anemia de células falciformes

**Preparación del Hemolizado:** Se Utilizó paquete globular libre de plasma, el cual se obtiene mediante lavados en solución salina, luego se procedió de la siguiente manera:

- ✓ Hemolizar los hematíes por 3 minutos mezclando vigorosamente con EDTA-KCN, en una relación 1:1 con el paquete de células.(Utilizar Vortex)
- ✓ La misma cantidad añadida de solución hemolizante, se debe añadir de cloroformo. mezclar por 3 min Con el Vortex.
- ✓ Centrifugar la mezcla por 20 min a 2500 rpm
- ✓ Alicuotar el Hemolizado de Hemoglobina (Parte superior)

**Protocolo de Referencia de Electroforesis de Hemoglobina:** El estudio se basó en el procedimiento descrito en el Libro de Hematología Analítica, de German Sáenz Renauld y Walter Rodríguez Romero, 4<sup>ta</sup> edición, 2003.

- a) Se coloca el tampón en la cámara Helena: se sumergen en este los puentes de esponja o papel filtro, y se colocan en la posición respectiva.  
(X) para lograr que el tampón se mantenga frío (2-8<sup>0</sup>C), la cámara o cuba se coloca encima de un par de tarros o bolsas de hielo mágico.
- b) Se sumergen en el tampón las placas de acetato de celulosa (Titán III, 2 3/8" X 3" Helena) un mínimo de 20 minutos antes de su uso.
- c) Las cintas o placas de acetato de celulosa se secan entre dos piezas de papel absorbente, en forma rápida y uniforme para remover el exceso de tampón.
- d) Las muestras son aplicadas a una distancia aproximada de 3 mm del cátodo.
- e) Si se usan cintas Titán III, se coloca la placa inadvertida en la cámara y, con la ayuda de un portaobjetos que se coloca sobre la primera, se asegura un buen contacto.
- f) Se aplica una corriente de 450 voltios por 20 min a temperatura fría (10<sup>0</sup>c).
- g) Las cintas o placas se mueven de la cámara y se tiñen por un mínimo de 3 minutos con Ponceau-S fresco.
- h) Se remueve el exceso de colorante con ácido acético al 5%, mediante tres lavados de 2 minutos cada uno. Si se desea se puede seguirse con los puntos (i-l), con el fin de transparentizar la cinta:
- i) Se fija la placa con metanol absoluto durante 3-5 minutos
- j) Las cintas se aclaran usando una mezcla de ácido acético glacial al 20 % en metanol absoluto por 10 minutos.
- k) Se seca a 65<sup>0</sup>C durante 10 minutos
- l) La placa aclarada y debidamente identificada se pone en un sobre plástico. Este paso permite guardar por tiempo indefinido los patrones electroforéticos.

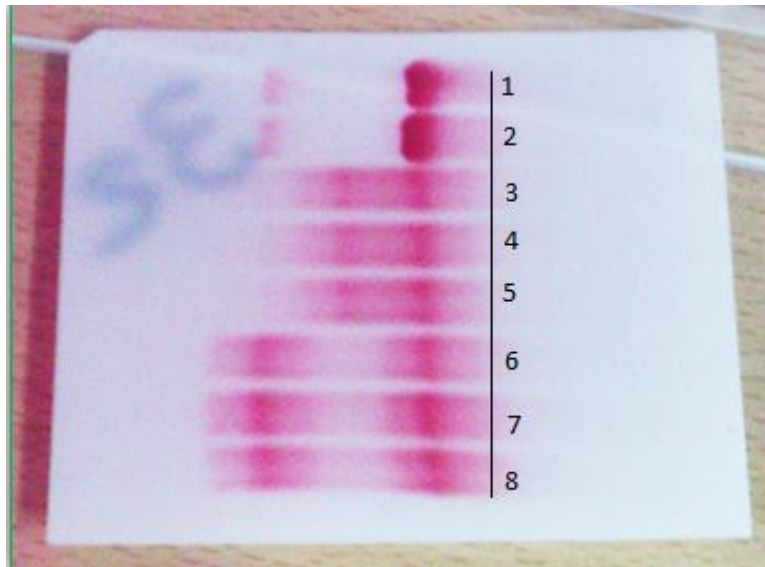
**Análisis de los resultados:** Para la elaboración del documento se utilizaron los siguientes programas: Microsoft Office Word para diseñar el documento, Excel para la elaboración de las tablas y gráficas, Microsoft Power Point para la presentación y exposición de la investigación.

## VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variables	Indicadores	Valores	Criterios
Estandarización de la técnica de electroforesis en Acetato de Celulosa	-Voltaje	0–300 V	Deficiente
	-Tiempo de Corrida	30–50 min	Bueno
	-Tiempo de Tinción	0–20 min	Muy Bueno
	-Tiempo de Coloración	0–20 min	Excelente
Evaluación del método	$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$	Controles HbAA Controles HbAS Controles HbAC	Presencia de Banda
	$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$	Reproducibilidad	Concordancia entre los duplicados Presencia de Banda
Clasificación Fenotípica	1 sola banda	Homocigoto AA Homocigoto SS	Px Sano Drepanocítico
	2 bandas	Heterocigoto AS Heterocigoto SC	Portador Drepanocítico Con HbC
		Heterocigoto SF	Drepanocítico Con HbF

## **IX. RESULTADOS**

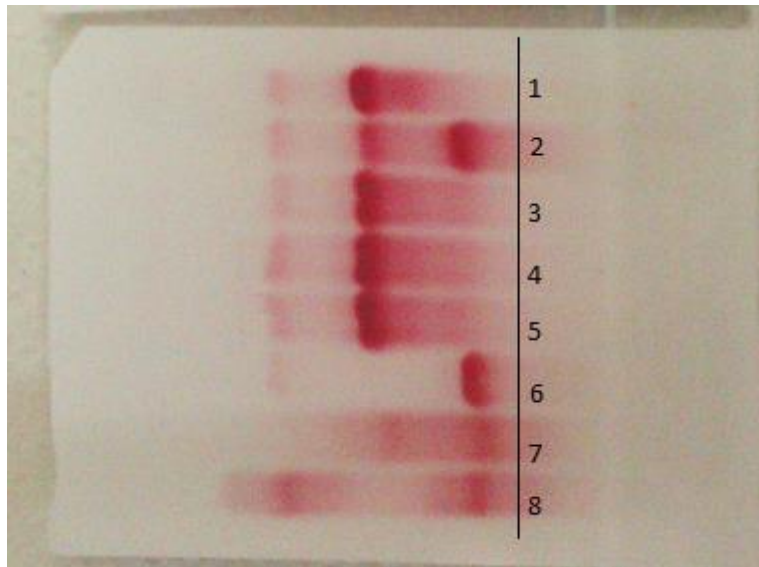
### 9.1 Estandarización de la técnica



**Figura 7: Ensayo 1 para la estandarización de la electroforesis en acetato de celulosa.** TBE 1X con pH 8.2, 10  $\mu$ l al colector de muestras del Kits. Se aplicó un potencial eléctrico de 280 V durante 30, temperatura entre 18 a 20 °C aplicando un *Ice Pack* encima de la cámara, tinción con Ponceau por 3 minutos y la decoloración en ácido acético al 5% en 3 tiempos de 3 minutos cada uno.

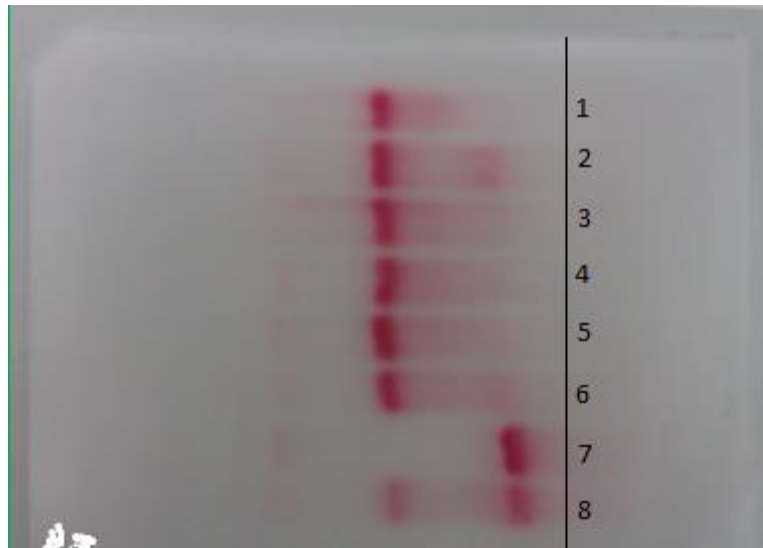
1	AA
2	AA
3	AS
4	AS
5	AS
6	AC
7	AC
8	AC





**Figura 8: Ensayo 2 para la estandarización de la electroforesis en acetato de celulosa.** TBE 1X con pH 8.2, dilución de hemolizados  $\frac{1}{2}$ , y esta vez se aplicaron 7  $\mu$ l en el contenedor de muestra. Tiempo de corrida a 35 minutos con voltaje a 250 V. El tiempo de coloración en Ponceau se adecuó a 5 minutos y la decoloración se modificó a 3 tiempos de 5 minutos cada uno.

1	SS
2	AS
3	SS
4	SS
5	SS
6	AA
7	AS
8	AC



**Figura 9: Ensayo 3 para la estandarización de la electroforesis en acetato de celulosa.**

TBE 1X con pH 8.2, dilución  $\frac{1}{2.5}$  10  $\mu$ l en el contenedor de muestra. Tiempo de corrida de 45 minutos con voltaje a 250 V. El tiempo de coloración en Ponceau se adecuo a 5 min minutos y decoloración en 3 tiempos de 5 minutos cada uno

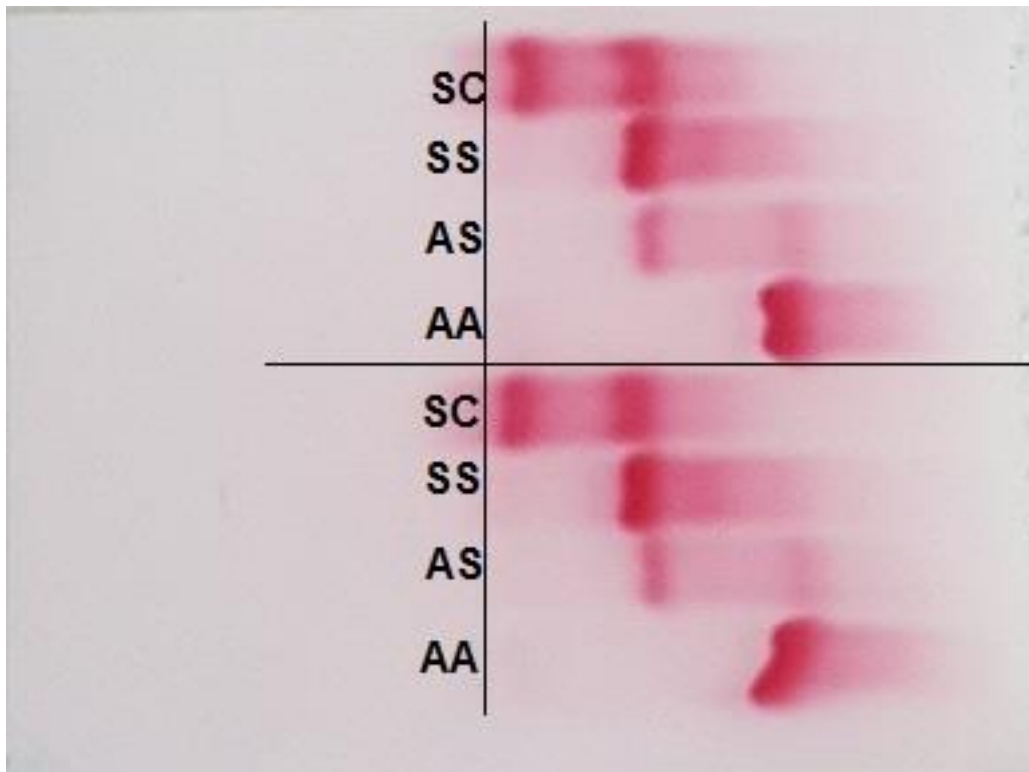
- |   |       |
|---|-------|
| 1 | SS    |
| 2 | SS/SA |
| 3 | SS    |
| 4 | SS    |
| 5 | SS    |
| 6 | AS    |
| 7 | AA    |
| 8 | AS    |

## 9.2 Evaluación del método

Patrón Electroforético		Resultado
VN	Hb AA	14
	Hb SS	2
VP	Hb AC	4
	Hb AS	14
	FP	0
	FN	0

$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$	Especificidad=(14/14+0)X100=100%
$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$	Sensibilidad=(22/22+0)X100=100%

### 9.3 Ensayo de Reproducibilidad de la tecnica de electroforesis en acetato de celulosa



Se verifico reproducibilidad, realizando una corrida electroforetica con dos muestras independientes. Se observa que los patrones electroforeticos son reproducibles para la tecnica de electroforesis de hemoglobina.

#### 9.4 Clasificación fenotípica de las muestras en estudio

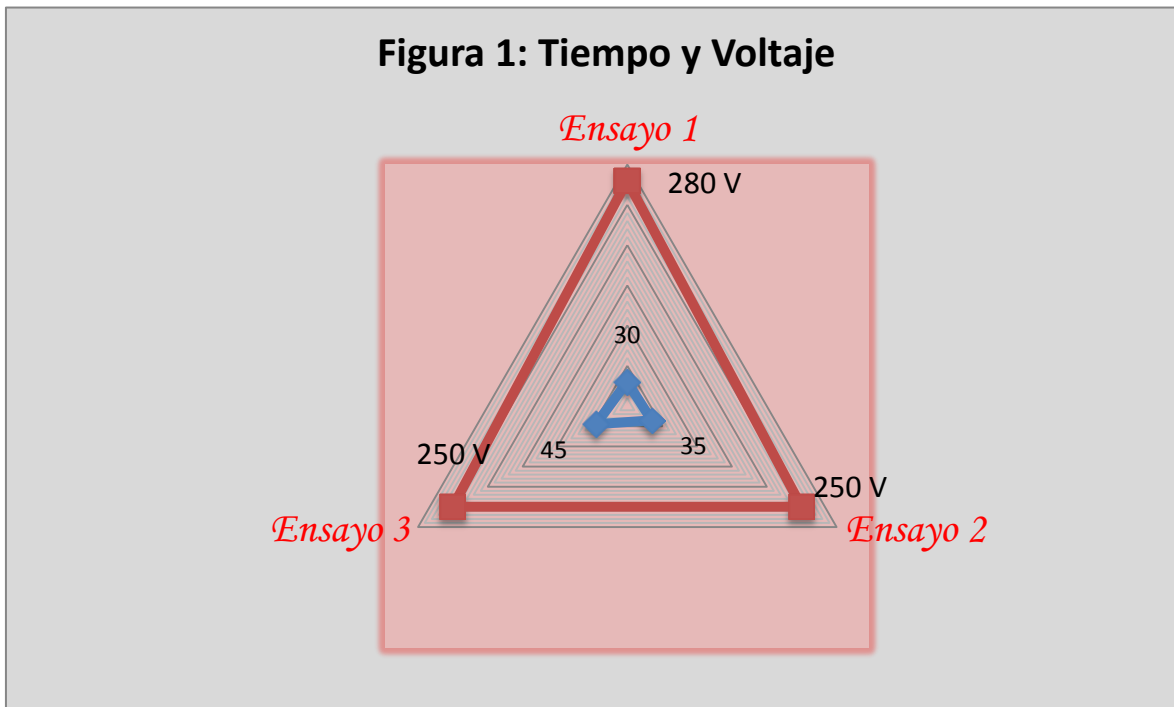
Patrón electroforético	Total
AA	4
SS	27
AS	12
SC	1

Durante la estandarización y detección de hemoglobinas anormales se analizaron 44 muestras correspondientes a pacientes donde 4 fueron AA, 27 fueron SS, 12 fueron AS y 1 SC

# **X. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## 10.1 Estandarización de la técnica

La estandarización de la técnica de electroforesis de Hemoglobina en acetato de celulosa se realizó en los laboratorios de Biología Molecular del Instituto Politécnico de la Salud en la UNAN-Managua. Los resultados obtenidos fueron de buena calidad, el número de ensayos realizados correspondieron a 12 (descritos en la Bitácora en Anexos), donde los primeros 3 ensayos tuvieron variantes en el protocolo. La preparación de los Hemolizados se realizó a como se describía en la técnica de referencia en el diseño metodológico, con la única variación en que se aumentó las r.p.m. y se disminuyó el tiempo en el último paso de la técnica.



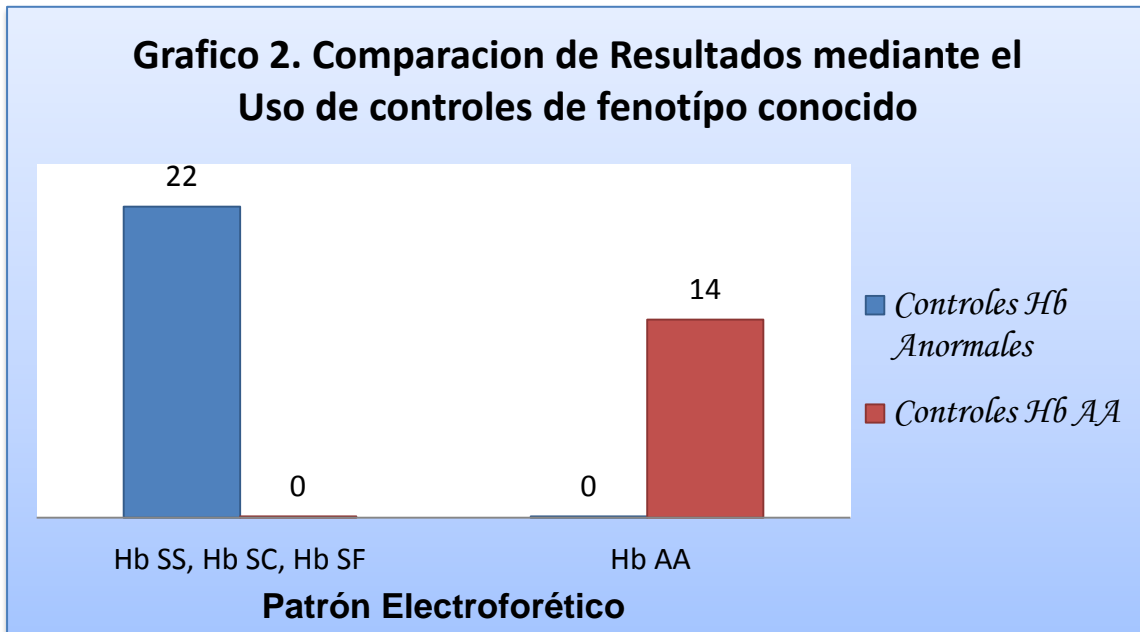
Ensayo 1: Los resultados obtenidos fueron los esperados, ya que se utilizaron controles de Hb conocida, las bandas eran bien diferenciadas, la separación de dichas bandas era bastante buena, pero la corrida mostraba tinción de arrastre y algunos controles mostraban una concentración excesiva. Debido al efecto de tinción de arrastre no se logra una verificación exacta del patrón electroforético de los controles lo que dificulta la realización de un diagnóstico preciso.

Ensayo 2: Al final de la corrida, la tinción de arrastre se mejoró y la migración de los controles se dieron en la posición correcta, en este ensayo se obtuvieron los primeros resultados de muestras problemas.

Ensayo 3: Los resultados obtenidos fueron concluyentes, y bajo las condiciones descritas en este ensayo se trabajaron el resto, con la única salvedad en que la dilución de los hemolizados podría ser variable en relación a la concentración de la muestra original, es decir que se utilizaría el parámetro de la Hemoglobina o hematocrito para proceder o no a diluirla.

La variación de este ensayo respecto al anterior, fue aumentar el tiempo de corrida esto con el objetivo de lograr una separación de las bandas a una manera ideal, las bandas se observaban uniformes y en la posición correcta en comparación a los controles, la tinción era excelente.

## 10.2 Evaluación del método



Fuente: Anexos (Tabla # 2)

Estos parámetros deben ser utilizados antes del uso de una nueva técnica en el laboratorio, ya que son marcadores intrínsecos del desempeño de las mismas. Como no se disponía de un método alternativo y completamente confiable con el

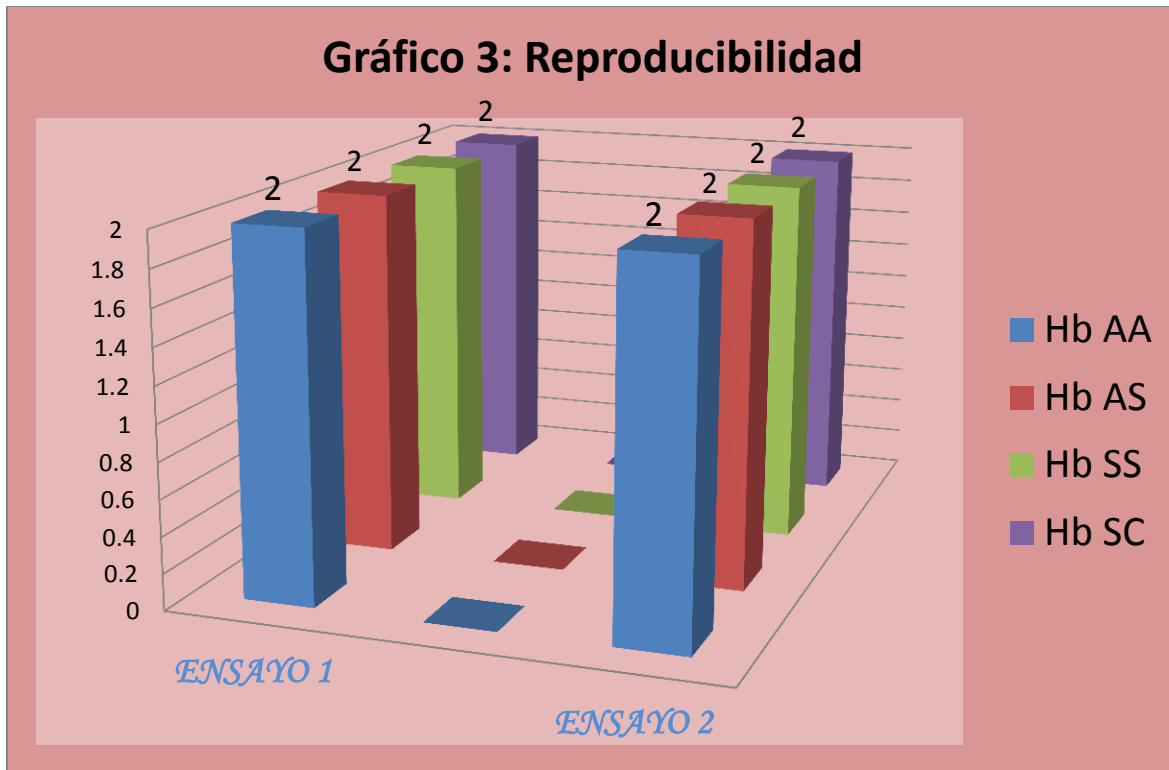


cual comparar los resultados, se utilizaron hemolizados controles con patología conocida traídas del CIHATA-Costa Rica.

A lo largo de los 12 ensayos se alternaron siempre controles junto a las muestras problemas. Un total de 22 veces fueron evaluados diferentes hemolizados controles con alguna hemoglobinopatía, de estos, ninguno mostro discrepancia en su patrón electroforético comparado al diagnóstico previo conocido. Además se ensayaron 14 Controles con patrón homocigoto Normal (Hb AA), no mostrando ningún problema en cuanto a su posición en las corridas electroforéticas.

Debido a la severidad de la enfermedad, la complejidad del diagnóstico, y el aspecto psicológico, el método que se utilice como referencia diagnostica tiene que ser 100% Sensible y más aun 100% específico, es decir que sea capaz de excluir la enfermedad o confirmarla, no es aceptable un falso positivo ni falsos negativos. Esta técnica es considerada la prueba de oro a nivel mundial (Bain, 2001), la facilidad en las variantes del protocolo nos permitió adecuarla a las condiciones del Laboratorio de Biología molecular sin alterar su eficacia diagnóstica.

### 10.3 Ensayo de Reproducibilidad de la tecnica de electroforesis en acetato de celulosa

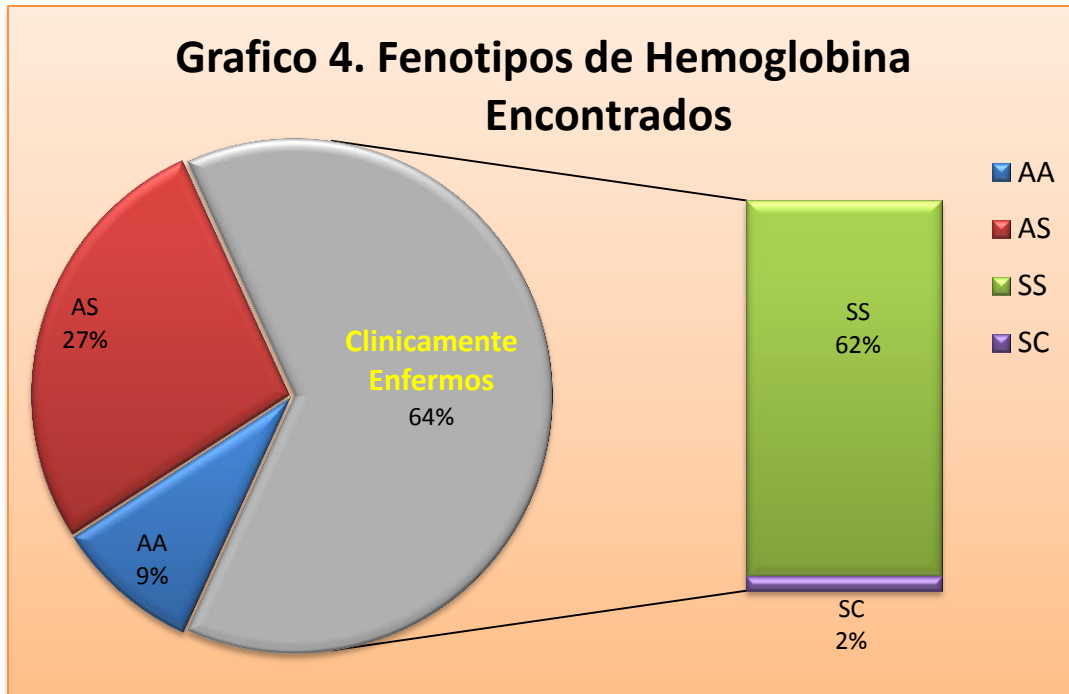


Fuente: Anexos (Tabla # 2.1)

La reproducibilidad es uno de los principios esenciales del método científico, y se refiere a la capacidad que tenga una prueba o experimento de ser reproducido o replicado. Cuando se evalúan técnicas cualitativas, el término reproducibilidad se limita a la capacidad que tiene la técnica de brindar, en condiciones distintas, el mismo resultado (positivo o negativo) sin poder evaluar la varianza de la misma.

Se usaron muestras independientes las cuales eran muestras de diferentes lapsos de tiempos del mismo paciente y se demostró que ninguna de las muestras independientes mostró algún tipo de discrepancia, las bandas observadas siempre eran igual a las correspondientes a la primera muestra, considerándose el método 100% reproducible.

## 10.4 Clasificación Fenotípica de las Muestras en Estudio

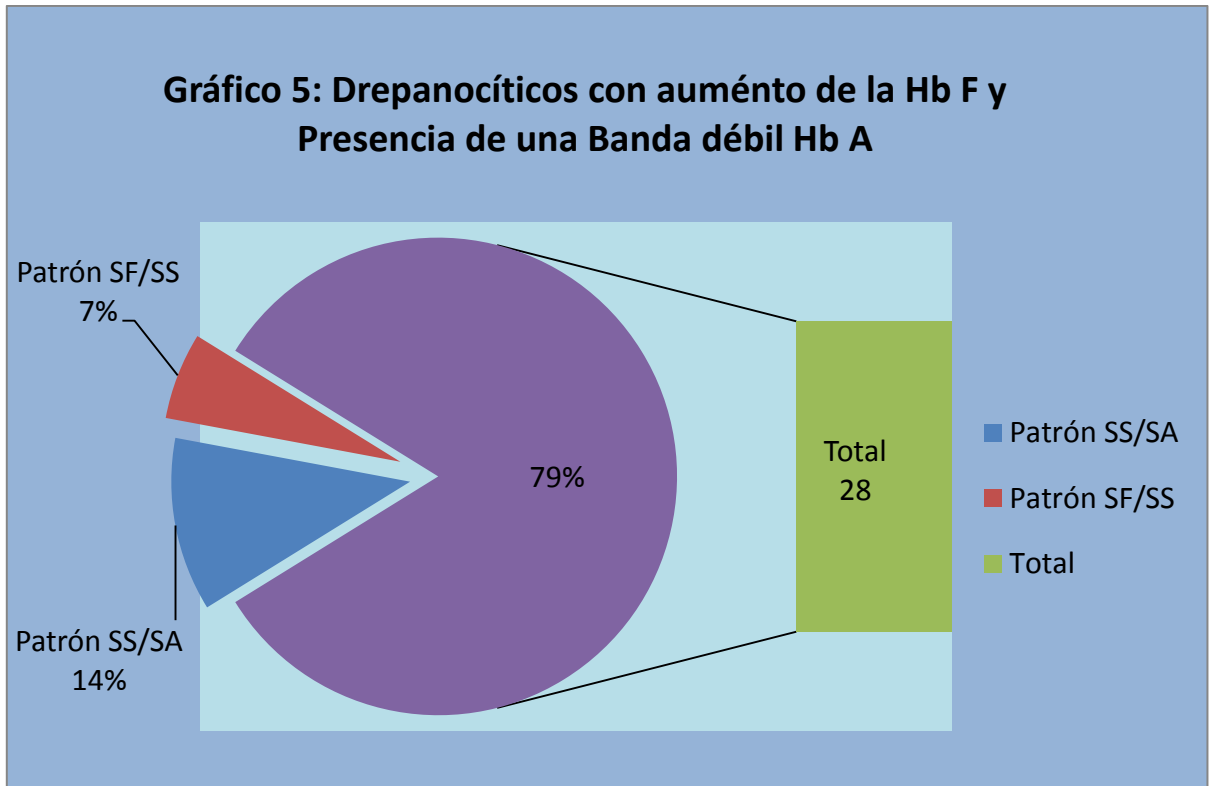


Fuente: Anexos (Tabla # 3)

Durante la estandarización de la técnica de electroforesis en acetato de celulosa se pudo caracterizar fenotípicamente al 9% de los pacientes sanos de la enfermedad de células falciformes, esto se debe a que durante la recolección de las muestras los pacientes eran quienes referían su diagnóstico y quizás la mayoría ignoraba su condición médica real.

La presencia de portadores asintomáticos (heterocigoto AS) se demostró en el 27% de los pacientes, estos son considerados clínicamente sanos y presentan síntomas leves o moderados solo en condiciones de hipoxia prolongada (altitud, submarinismo, anestesia y fatiga física). La importancia de su diagnóstico radica en términos epidemiológicos.

Los clínicamente enfermos se encontraron en un 64%, de estos cerca del 62% son drepanocíticos puros, es decir homocigotos SS, que esta es la forma más grave de la enfermedad. Solo se caracterizó a 1 paciente con fenotipo SC, considerado un trastorno menos grave que la drepanocitosis.



Fuente: Anexos (Tabla 3.1)

Es importante que durante la caracterización fenotípica se remarquen aquellos detalles observados en la corrida electroforética, que puedan tener relevancia médica. En un poco más del 7% de los pacientes drepanocíticos se encontró un aumento de la hemoglobina fetal, esto puede deberse al tratamiento con Hidroxiurea como un agente que induce la producción de Hb F, ya que esta suele considerarse “antifalciforme” porque no copolimeriza con la HbS, a la que torna más soluble (No se realizó cuantificación de la misma).

El termino SS/SA se refiere a pacientes drepanocíticos con un patrón electroforético que muestra una débil banda A, es decir que la banda A esta <30% en relación a la banda S. Alrededor del 14% de los pacientes analizados mostraban esta banda, la presencia de ésta se sospecha que pertenece a glóbulos rojos procedentes de las transfusiones sanguíneas recientes a la determinación electroforética, dichas transfusiones se realizan para compensar la anemia y contrarrestar los síntomas.

## XI. CONCLUSIONES

1. Se logró estandarizar la técnica de electroforesis en Acetato de Celulosa, adecuándola a las condiciones del Laboratorio de Biología Molecular del Politécnico de la salud, obteniendo los mejores resultados a partir del ensayo 3, el cual evidencio una correcta migración de las hemoglobinas sin presentar tinción arrastre y con buena definición de las bandas.
2. La evaluación de la técnica, en cuanto a su utilidad diagnostica, resulto con una excelente sensibilidad y especificidad equivalente al 100%, indicando que puede ser utilizada en la identificación cualitativa de hemoglobinopatías.
3. La reproducibilidad fue comprobada realizando un ensayo por duplicado de muestras independientes bajo las mismas condiciones de trabajo, dando como resultado el mismo patrón electroforético para ambas muestras destacando de esta manera la factibilidad de uso de la técnica.
4. Los fenotipos encontrados en las muestras analizadas através de la técnica de electroforesis fueron pacientes depanocíticos (HbSS) con un 61.37%, portadores asintomáticos (HbAS) con un 27.27%, drepanocítico con Hb C (HbSC) con un 2.27% y HbAA con un 9.09% únicos considerados sanos.

## XII. RECOMENDACIONES

- ✚ Al departamento de Hemato-Oncología del Hospital Manuel de Jesús Rivera "La Mascota" empezar a utilizar la técnica de Electroforesis en Acetato de Celulosa, como método diagnóstico para la anemia drepanocítica y otras hemoglobinopatías, brindándoles el tratamiento adecuado.
- ✚ A la dirección del Hospital Manuel de Jesús Rivera "La Mascota" apoyar la implementación de nuevos métodos diagnósticos.
- ✚ Al departamento de Bioanálisis Clínico seguir promoviendo Investigaciones científicas enfocadas en el diagnóstico Hematológico.
- ✚ A los estudiantes en curso, realizar estudios de prevalencia del gen causante de anemia de células falciforme a fin de conocer la magnitud del trastorno en el país.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Guerra, E. D., & Fernández-García, A. (2007). LA ANEMIA DE HEMATÍES FALCIFORMES: INVESTIGACIONES PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. *Ciencia en su PC( 4)*, 1-11.
- Bain, B. J. (2001). *Haemoglobinopathy Diagnosis* (1era ed.). Londres, Inglaterra: Blackwell Science.
- Beutler, E. (2008). Enfermedades de las Celulas Falciformes y Trastornos Relacionados. En M. Beutler, M. Kipps, M. Collier, M. Seligsohn, & M. Leightman, *Hematología de Williams* (págs. 581-603).
- Biondi, G., Battistuzzi, G., Santolamazza, C., & et. al. (1988). Migration pattern and genetic marker distribution of the Afro-American population of Bluefields, Nicaragua. *ANNALS OF HUMAN BIOLOGY*, 15(6), 399-412.
- CAMPO DIAZ, M. C., FORTUN PRIETO, A., & FORTUN CAMPO, A. y. (2009). *Fisiopatología de la vaso-oclusión en la drepanocitosis*. Recuperado el 11 de 02 de 2015, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=\\$1561-31942009000100010&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=$1561-31942009000100010&script=sci_arttext).
- Conley, C. (1980). Sickle-cell anemia. En *The first molecular disease, in blood, pure and Eloquent* (pág. 319). New York: McGraw.Hill.
- Ferguson, D., Sánchez, E., & Rojo, J. (Jul-Sep de 2003). Prevalencia de Hemoglobina AS en una poblacion de adolescentes en Panama. *Revista Medica del Hospital General de Mexico, Vol. 66(3)*, 136-141.
- Finnegan, E., Turhan, A., Golan, D., & Barabino, G. (2007). Adherent Leukocytes Capture Sickle Erythrocytes in an In Vitro Flow Model of Vaso-Occlusion. *American Journal of Hematology*, 82:266–275.
- Frenette, P., & Atweh, G. (Abril de 2007). Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *Science in medicine*, 117(4), 850-858.
- JÁCOME , N. (30 de Abril de 2015). *Biología - Bioquímica*. Obtenido de ANEMIA FALCIFORME: [http://biologiabachilleratointer.blogspot.com/2015\\_04\\_01\\_archive.html](http://biologiabachilleratointer.blogspot.com/2015_04_01_archive.html)
- Kato, G., Hebbe, R., Steinberg, M., & Gladwin, M. ( September de 2009). Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Biology, Pathophysiology, Genetics, Translational Medicine and New Research Directions. *Am J Hematol.*, 84(9), 618–625.
- Kyle Mack, A., & Kato, G. (2006). Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol.*, 38(8), 1237–1243.

- Lobo , C., do Nascimento , E., Abelha , R., Queiroz , A., Connes P, Cardoso GP, . . . Ballas , S. (2015). Risk Factors of Pulmonary Hypertension in Brazilian Patients with Sickle Cell Anemia. *AD - Clinical Hematology Division, Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira*.
- McKensie, P. (2000). *Hematologia Clinica* (2da ed.). Baltimor: El Manual Moderno, S.A. de C.V.
- Medstater. (29 de Julio de 2011). *CIENCIA MÉDICA CONCISA*. Obtenido de <https://cienciamedicaconcisa.wordpress.com/2011/07/29/enfermedad-de-celulas-falciformes-sickle-cell-disease/>
- Odièvre, M. H., Verger, E., Silva-Pinto, A. C., & Elion, J. (Octubre de 2011). Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J Med Res., 134*(4), 532–537.
- OMS. (Enero de 2011). *Drepanocitosis y otras hemoglobinopatías*. Recuperado el 06 de Septiembre de 2016, de Centro de Prensa OMS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/es/>
- OMS. (Enero de 2011). *Drepanocitosis y otras hemoglobinopatías*. Recuperado el 10 de Octubre de 2016, de Centro de Prensa OMS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/es/>
- Oshrine , B., & Talano , J. (April de 2015). Curative treatment for severe sickle cell disease: allogeneic transplantation. *Clin Adv Hematol Oncol*, 249-56.
- Pita Fernández, S. P. (2003). Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España)*.
- Quintero, M., & Jimenez Hernandez, A. (2012). ANEMIA DE CELULAS FALCIFORMES. *Revista Gastrohnap, 14*(2), S27-S35.
- Romero, G. (1993). La poblacion de Origen Africano en Nicaragua. *Presencia africana en centroamerica*, 151-197.
- Saenz Renault, G., & Rodriguez Romero, W. (2003). Electroforesis de Hemoglobina. En G. F. Saenz Renault, *Hematologia Analitica* (4ta ed., Vol. II, págs. 239-252). San Jose, Costa Rica.
- Sans-Sabrafen, J., Besses Raebel, C., & Vives Corrons, J. (2007). *Hematologia Clinica* (Vol. 5ta). Barcelona, España: Graficas Murial, S.A.
- Schneider, R. (1974). Differentiation of Electrophoretically Similar Hemoglobins-Such as 5, D, G, and P; or A2, C, E, and O-by Electrophoresis of the Globin Chains. *CLIN. CHEM, 20*, 1111-1115.
- Silva Cde, A., Baldim, L., Nhoncane, G., Estevão Ida, & Melo, D. (23 de January de 2015). [Neonatal screening for hemoglobinopathies in São Carlos, São Paulo, Brazil: analysis of a series of cases]. *Revista Pediatrica de Sao Paulo*, 19-27.



Svarch, E. (20 de 01 de 2009). *Fisiopatología de la drepanocitosis*. Recuperado el 08 de 02 de 2015, de [http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol25\\_1\\_09/hih03109.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol25_1_09/hih03109.htm)

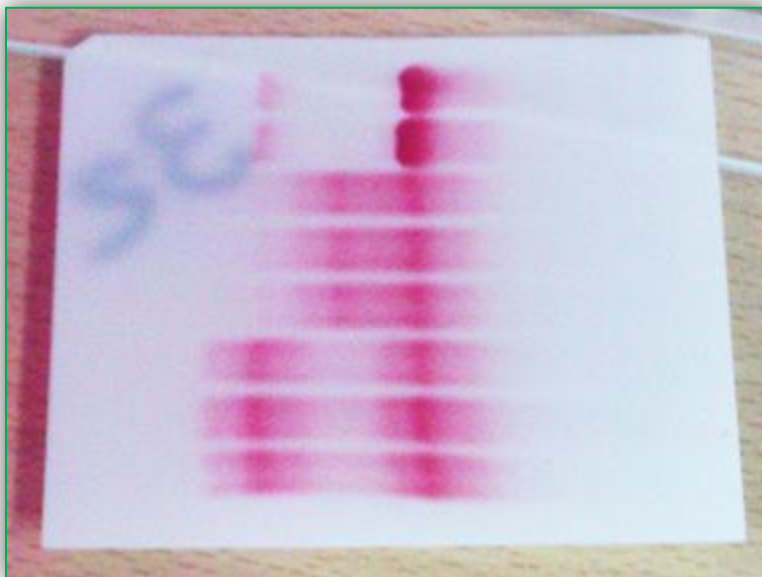
Vives Corrons, J. (2006). Defectos Congenitos de la Hemoglobina. Hemoglobinopatias estructurales. En J. Sans-Sabrafen, C. Besses Raebel, & J. L. Vives Corrons, *Hematologia Clinica* (págs. 183-201).

## **XIV. ANEXOS**

## ANEXO 1. BITÁCORA

Electroforesis: 01-2015

Fecha: 29/08/2015

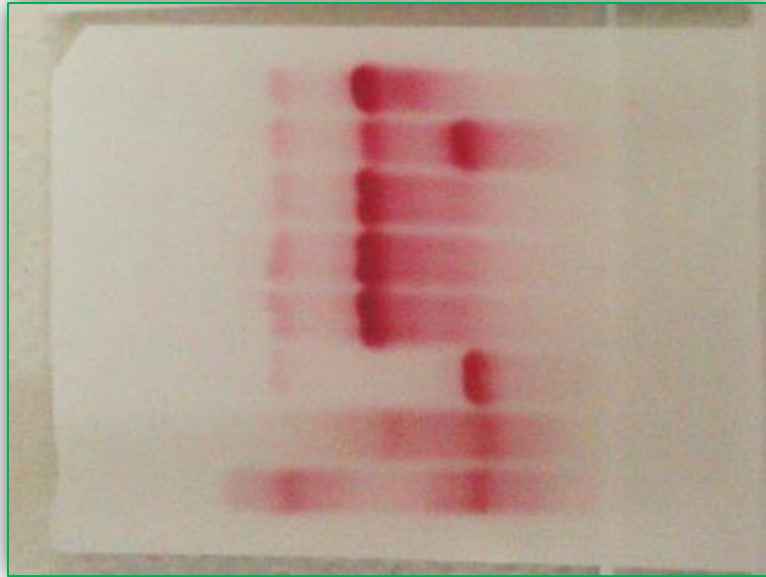


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	AA-2015	AA
2	AA-2015	AA
3	AS-2015	AS
4	AS-2015	AS
5	AS-2015	AS
6	AC-2015	AC
7	AC-2015	AC
8	AC-2015	AC

## BITÁCORA

Electroforesis: 02-2015

Fecha: 29/08/2015

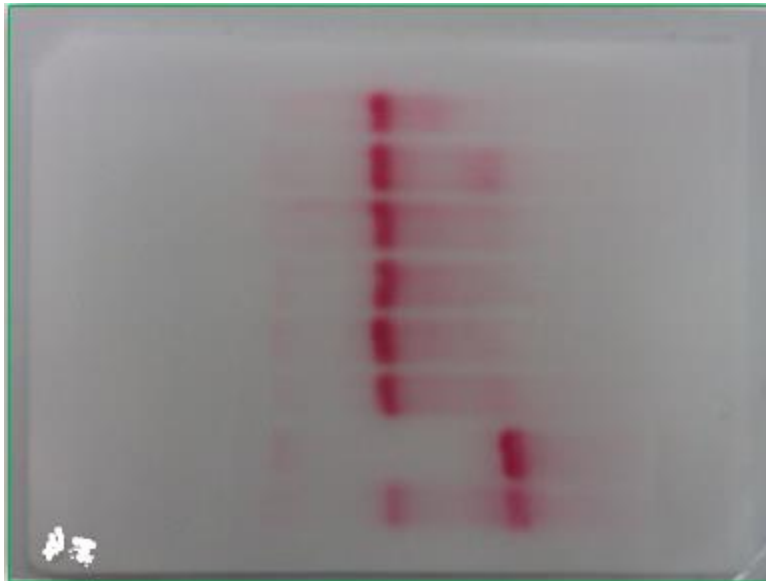


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-01	SS
2	15Hb-02	AS
3	15Hb-03	SS
4	15Hb-04	SS
5	15Hb-05	SS
6	AA-2015	AA
7	AS <sub>1</sub> -2015	AS
8	AC-2015	AC

# BITÁCORA

Electroforesis: 03-2015

Fecha: 29/08/2015

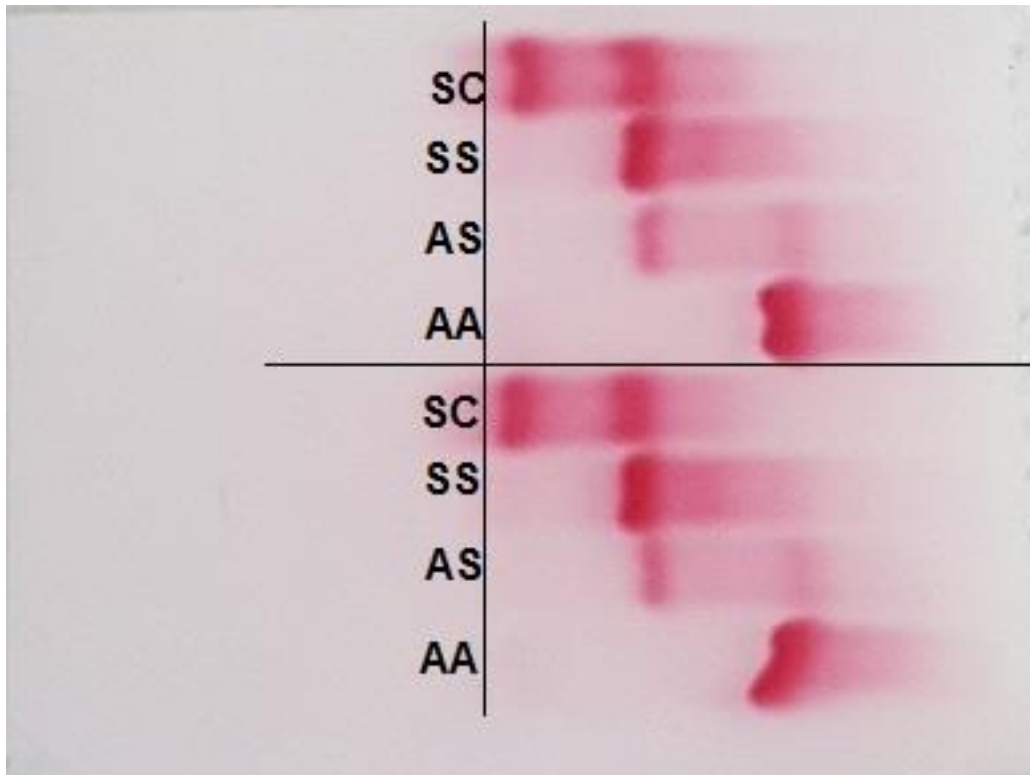


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-01	SS
2	15Hb-02	SS/SA
3	15Hb-03	SS
4	15Hb-04	SS
5	15Hb-05	SS
6	15Hb-06	SS
7	AA-2015	AA
8	AS <sub>1</sub> -2015	AS

# BITÁCORA

Electroforesis: 04-2015

Fecha: 02/09/2015

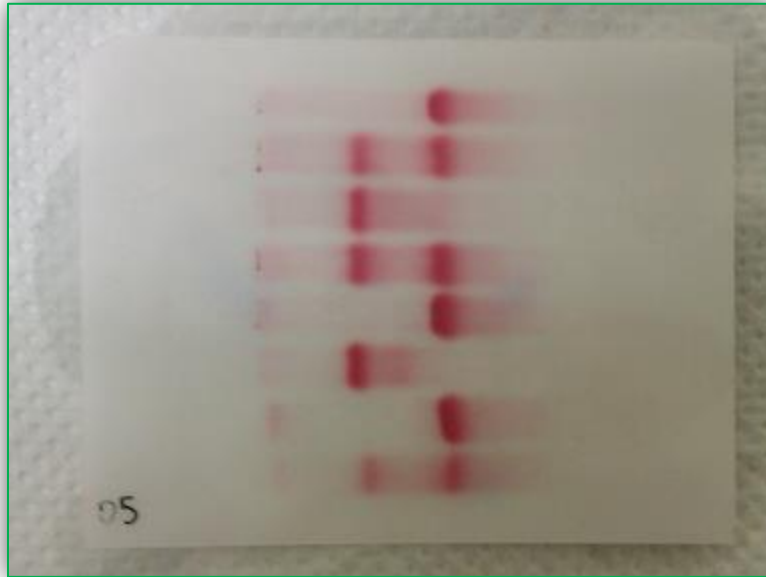


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	SC-2015	SC
2	SS-2015	SS
3	AS-2015	AS
4	AA-2015	AA
5	SC-2015	SC
6	SS-2015	SS
7	AS-2015	AS
8	AA-2015	AA

# BITÁCORA

Electroforesis: 05-2015

Fecha: 02/09/2015

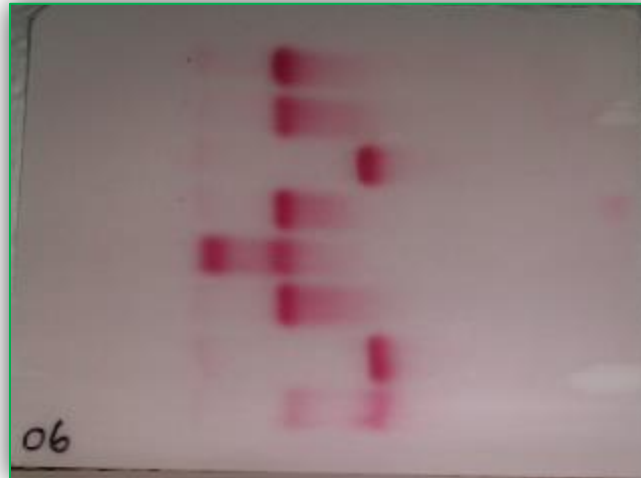


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-07	AA
2	15Hb-08	AS
3	15Hb-09	SS
4	15Hb-10	AS
5	15Hb-11	AA
6	15Hb-12	SS
7	AA-2015	AA
8	AS <sub>1</sub> -2015	AS

# BITÁCORA

Electroforesis: 06-2015

Fecha: 02/09/2015



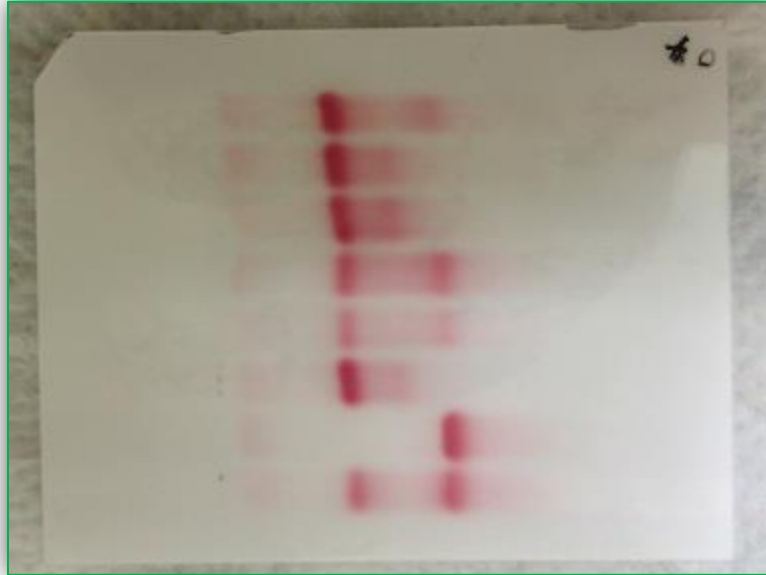
Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-13	SS
2	15Hb-14	SS
3	15Hb-15	AA
4	15Hb-16	SS
5	15Hb-17	SC
6	15Hb-18	SS
7	AA-2015	AA
8	AS <sub>1</sub> -2015	AS



# BITÁCORA

Electroforesis: 07-2015

Fecha: 05/09/2015

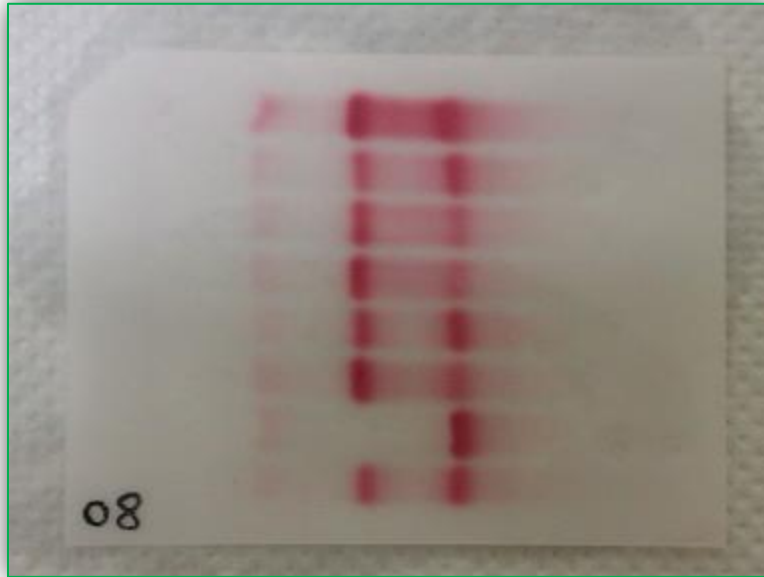


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-19	SS/SA
2	15Hb-20	SF/SS
3	15Hb-21	SF/SS
4	15Hb-22	AS
5	15Hb-23	AS
6	15Hb-24	SS
7	AA-2015	AA
8	AS <sub>1</sub> -2015	AS

# BITÁCORA

Electroforesis: 08-2015

Fecha: 05/09/2015

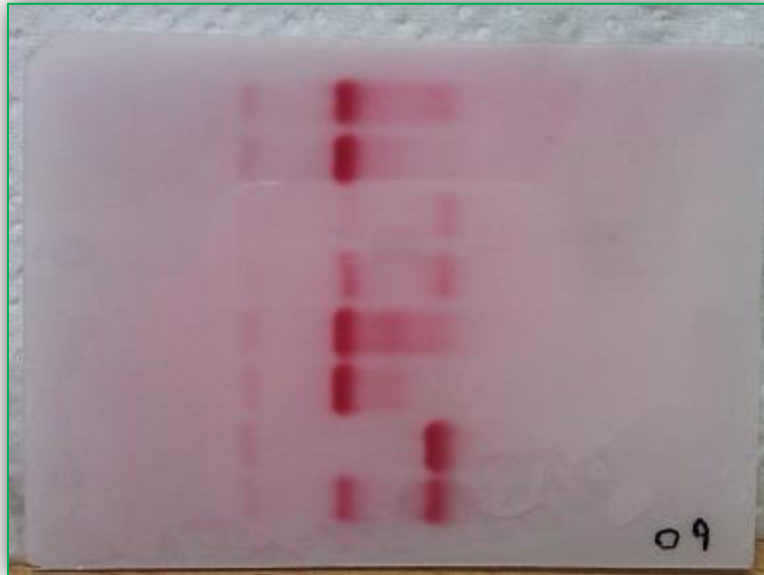


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-22	AS
2	15Hb-22b	AS
3	15Hb-23	AS
4	15Hb-23b	AS
5	15Hb-25	AS
6	15Hb-26	AS
7	AA-2015	AA
8	AS <sub>1</sub> -2015	AS

# BITÁCORA

Electroforesis: 09-2015

Fecha: 05/09/2015

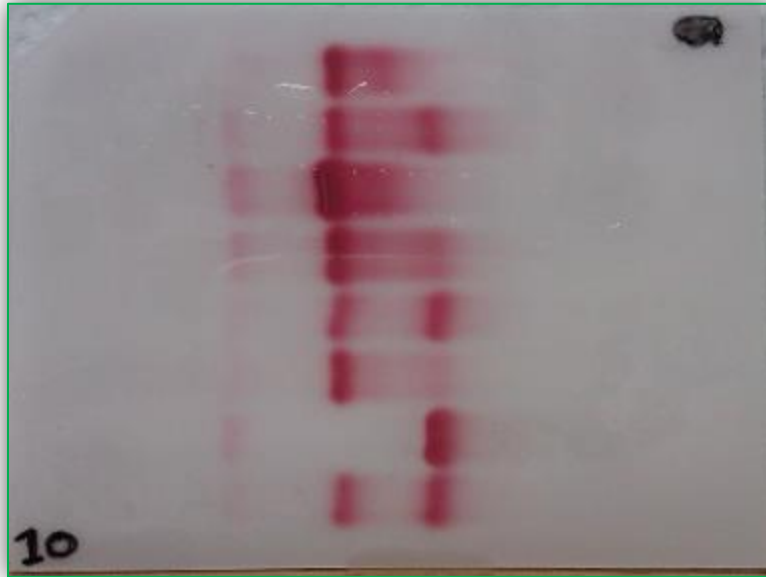


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-19	SS/SA
2	15Hb-19b	SS
3	15Hb-27	AS
4	15Hb-28	AS
5	15Hb-29	SS
6	15Hb-30	SS
7	AA-2015	AA
8	AS <sub>1</sub> -2015	AS

# BITÁCORA

Electroforesis: 10-2015

Fecha: 05/09/2015

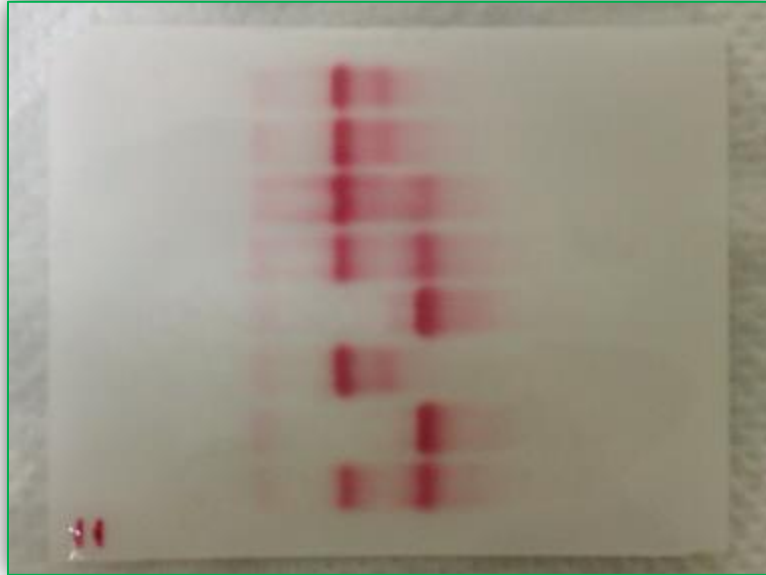


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-31	SS
2	15Hb-32	AS
3	15Hb-33	SS
4	15Hb-34	SS/SA
5	15Hb-35	AS
6	15Hb-36	SS
7	AA-2015	AA
8	AS <sub>1</sub> -2015	AS

# BITÁCORA

Electroforesis: 11-2015

Fecha: 05/09/2015

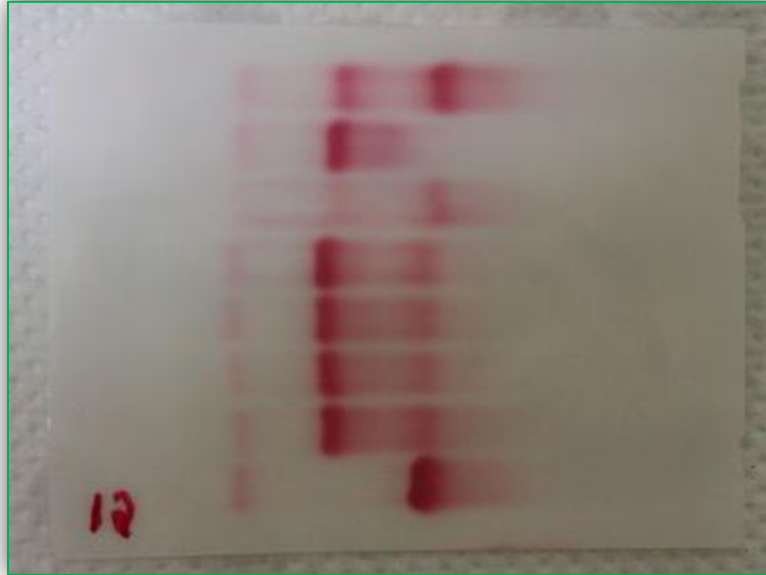


Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-37	SS
2	15Hb-38	SS
3	15Hb-39	SS/SA
4	15Hb-40	AS
5	15Hb-41	AA
6	15Hb-42	SS
7	AA-2015	AA
8	AS <sub>1</sub> -2015	AS

# BITÁCORA

Electroforesis: 12-2015

Fecha: 05/09/2015



Posición	Cód. Muestra	Patrón Electroforético
1	15Hb-43	AS
2	15Hb-44	SS
3	15Hb-27	AS
4	15Hb-2b	SS/SA
5	15Hb-34	SS/SA
6	15Hb-36	SS/SA
7	15Hb-39	SS/SA
8	AA-2015	AA

## **Protocolo Estandarizado**

### **Preparación del Hemolizado de Hemoglobina**

1. Centrifugar muestras anticuaguladas x 5 min a 3000 rpm. Remover el plasma.
2. Lavar los hematíes 4 veces por resuspensión suave en solución salina al 0.85%, centrifugación a 3000 r.p.m. durante 5 minutos y aspiración cuidadosa del sobrenadante.
3. Hemolizar los hematíes por 3 minutos mezclando vigorosamente con EDTA-KCN, en una relación 1:1 con el paquete de células.(Utilizar Vortex)
4. La misma cantidad añadida de solución hemolizante, se debe añadir de cloroformo. mezclar por 3 min Con el Vortex.
5. Centrifugar la mezcla por 10 min a 4100 rpm
6. Alicuotar el Hemolizado de Hemoglobina (Parte superior)

### **Electroforesis de Hemoglobina**

Nota: Antes de iniciar el procedimiento se debe preparar el TBE 1X y se debe medir el pH, el cual debe ser 8.4-8.6.

1. Las tiras de Acetato de Celulosa deben sumergirse por al menos 20 min en TBE 1X antes de su Uso.
2. Eliminar el exceso de tampón poniendo las tiras entre dos hojas de papel de filtro, con cuidado de que no lleguen a secarse por completo.
3. Extender las tiras sobre el puente de modo que la superficie penetrable quede hacia la parte superior.
4. Llenar con el tampón correspondiente la cámara de migración (unos 140 mL por compartimento) y Se coloca un soporte de papel filtro, de manera que haga contacto con el Buffer y el sitio donde se colocara la tira.

5. Pipetear 10  $\mu$ l de las muestras por orden numérico en los pocillos de la placa portamuestras.
6. Utilizando el súper Z se cargan las muestras de 2 a 3 veces y se depositan en la tira Una sola vez.

Nota: Una vez depositada la muestra es importante realizar una señal que nos indique el orden de las mismas

7. Colocar la tira con el acetato hacia arriba y las muestras cargadas hacia el polo negativo, sobre el puente realizado con el papel filtro.
8. Conectar la corriente, aplicando una diferencia de potencial de 250 voltios durante 45 minutos.

### **Tinción**

1. Las tiras se sumergen por 5 min en Ponceau S diluido con ácido tricloroacético (0.5 g / 100 ml).
2. La decoloración se realiza con Ácido Acético al 5 %, 3 repeticiones de 5 min cada una, en Agitación.

### **Fijación**

1. Las tiras decoloradas se sumergen en metanol absoluto durante 5-10 min.
2. Se elimina el exceso de fijador (metanol absoluto), y la tira se coloca sobre el *Hot Plate* de manera que la celulosa este hacia arriba y toda la superficie del acetato este en contacto con el plato.
3. Retirar inmediatamente después que toda la celulosa se evapore, y guardar con cinta adhesiva en un cuaderno de registro.



## ANEXO 2. Tablas de Resultados

**Tabla 1. Variante de Protocolo**

Nº de Ensayo	Volumen de Muestra	Voltaje	Tiempo de Corrida	Tiempo en Ponceau	Tiempo Decoloración	Resultados
1	10 ul (Aplicación directa)	280 V	30 min	3 min	3 min x 3 repeticiones	Se observó una buena distribución de las bandas, los controles migraron de la manera que se esperaba, pero no hubo buena decoloración y se registró una tinción de arrastre. Los controles de HbAA mostraban una banda demasiado fuerte por lo que se decidió diluirla con el reactivo hemolizante en la siguiente corrida. La Técnica mostro buen desempeño, por lo que también se procedió a montar Pacientes juntos a controles.
2	7 ul (Dilución ½)	250 v	35 min	5 min	5 min	Buena migración. Mejoro la decoloración, pero se reflejó una alta concentración de muestra. Controles migraron de manera correcta.

Nº de Ensayo	Volumen de Muestra	Voltaje	Tiempo de Corrida	Tiempo en Ponceau	Tiempo Decoloración	Resultados
3	10 ul (Dilución 1/2.5)	250 V	45 min	5 min	5 min	Condiciones de mejor migración electroforética. Las proteínas migraron de forma adecuada, y se observaban muy bien las bandas. Se decidió utilizar estos datos como estándar para las demás corridas.

<b>Tabla 2. Evaluación del método</b> <b>Relación entre el resultado de la técnica de electroforesis y la presencia o ausencia de hemoglobinopatías con el uso de controles de patología conocida</b>		
	Presencia de Hemoglobina Anómala (S,C,F, etc)	Presencia de Hb A Homocigoto (Normal)
<b>Método Positivo</b>	22	0
<b>Método Negativo</b>	0	14
Sensibilidad= $(22/22+0) \times 100 = 100\%$		
Especificidad= $(14/14+0) \times 100 = 100\%$		

<b>Tabla 2.1. Evaluación del método</b> <b>Ensayo de Reproducibilidad</b>					
ENSAYO 1	Patrón electroforético	Veces ensayado	ENSAYO 2	Patrón electroforético	Veces ensayado
Hb AA	AA	2	Hb AA	AA	2
Hb AS	AS	2	Hb AS	AS	2
Hb SS	SS	2	Hb SS	SS	2
Hb SC	SC	2	Hb SC	SC	2

<b>Tabla 3. Fenotipos encontrados en las muestras en estudio mediante la Electroforesis en Acetato de Celulosa</b>			
	Patrón Electroforético	Encontrados	Porcentaje
<b>Homocigoto</b>	AA	4	9.09%
	SS	27	61.37%
<b>Heterocigoto</b>	AS	12	27.27%
	SC	1	2.27%
<b>Total</b>		44	100%

<b>Tabla 3.1. Drepanocíticos con aumento de la Hb F y Presencia de una débil banda Hb A</b>		
	Encontrados	Porcentaje
<b>Patrón SS/SA</b>	4	14.29%
<b>Patrón SF/SS</b>	2	7.14%
<b>Sin Observaciones</b>	22	78.57%
<b>Total</b>	28	100%

## **ANEXO 3. Preparación de Reactivos y Materiales Utilizados**

---

### **Reactivos**

- ✓ Reactivo hemolizante: 1,0 g de etilendiaminotetraacetato tetrasódico por litro de agua que contiene 0,2 g de KCN por litro.
  - ✓ Solución colorante: 5 g de Ponceau S por litro de solución de ácido tricloroacético (0.5 g / 100 ml).
  - ✓ Solución decolorante: Diluir ácido acético 25 ml de ácido acético glacial más 975 ml de agua.
  - ✓ Tampón TBE pH 8.4-8.6: 10.2 gr de Tris (hidroximetil) amino-metano + 0.6 gr de EDTA (ácido, sal disódica) + 3.2 gr H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, en 1000 ml de Agua destilada.
- 

### **Materiales Utilizados**

- ✓ Cámara Electroforética Marca Helena
  - ✓ Súper Z Marca Helena
  - ✓ Placas de acetato de celulosa (Titán III, 2 3/8" X 3" Helena)
  - ✓ Fuente de Poder
  - ✓ Vortex
  - ✓ Centrifuga
  - ✓ Tubos con EDTA k3
  - ✓ Tubos de Vidrio 12x75 mm
  - ✓ Papel Filtro
  - ✓ Papel Absorbente
  - ✓ Viales
  - ✓ Pipeta Automáticas
  - ✓ Pipeta de Pasteur
  - ✓ Probeta de 1000 ml
-

## ANEXO 4. HOJA DE ENTREGA DE RESULTADOS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA  
INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD  
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR



Nombre:	Fecha:
Procedencia:	
Muestra #:	Reporte #:

### Reporte de Laboratorio

**Electroforesis Hemoglobina:**

---

Dr. Allan Pernudy M.Sc. Ph.D.  
Cód. MINSAs 18541  
Laboratorio Biología Molecular  
POLISAL/ UNAN–Managua