

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA  
UNAN MANAGUA  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD  
“LUIS FELIPE MONCADA”



*MONOGRAFÍA PARA OPTAR A TÍTULO DE LICENCIATURA EN  
BIOANÁLISIS CLÍNICO*

**Tema:** Caracterización fenotípica de hemoglobinas en pacientes con diagnóstico clínico de anemia drepanocítica y familiares en las cabeceras departamentales de Nicaragua mediante Electroforesis de Hemoglobina en tiras de acetato de celulosa, en el período Enero - Noviembre 2016.

**Autores:**

Br. Marianela del Pilar Ortiz López

Br. Yaneris del Socorro Requenez

Br. Jaslyn Jahoska Salinas Molina

**Tutor:**

PhD. Allan Pernudi Ubau. MSc. PhD.

**Asesor metodológico:**

MSc. Martha Xiomara Guerrero Delgado.

Managua, 2017

## *Caracterización fenotípica de hemoglobinopatías*

### ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	ANTECEDENTES .....	1
III.	JUSTIFICACIÓN .....	5
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	7
V.	OBJETIVOS .....	8
VI.	MARCO TEÓRICO. ....	9
6.1	Hemoglobinopatías .....	9
6.2	Hemoglobinopatías por HbS .....	9
6.3	Rasgos de hemoglobina AS.....	13
6.4	Hemoglobinopatías por HbC.....	13
6.5	Síndrome Drepanocítico doble heterocigoto SC. ....	14
6.6	Hemoglobina F.....	15
6.7	Hemoglobinas Raras .....	16
6.7.1	Hemoglobina Presbiteriana.....	16
6.8	Diagnóstico de hemoglobinopatías. ....	17
6.9	El mestizaje y su relación con las hemoglobinopatías en Nicaragua. ....	19
VII.	DISEÑO METODOLÓGICO .....	21
7.1	Tipo de estudio .....	21
7.2	Área de estudio.....	21
7.3	Universo y muestra.....	21
7.4	Tipo de muestreo .....	21
7.5	Instrumento y recolección de la información .....	22
7.6	Recolección de la muestra .....	22
7.7	Procesamiento y análisis de resultados.....	22
7.8	Materiales y métodos.....	22

## ***Caracterización fenotípica de hemoglobinopatías***

7.8.1 Preparación de Reactivos.....	22
7.8.2 Preparación del Hemolizado de Hemoglobina.....	23
7.8.3 Electroforesis de Hemoglobina.....	23
7.8.4 Tinción.....	24
7.9 Interpretación de Resultados .....	24
VIII. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES .....	25
IX. RESULTADOS .....	27
9.1. Confirmación de diagnóstico clínico.....	27
9.2. Comparación de los resultados con pruebas complementarias de la BHC.....	28
.....	29
9.3. Caracterización socio-demográfica de la prevalencia de hemoglobinopatías. ....	32
9.3.1 Distribución demográfica.....	32
9.3.2 Prevalencia de las hemoglobinopatías según grupo étnico.....	34
9.3.3 Prevalencia de las hemoglobinopatías según sexo.....	35
9.3.4 Prevalencia de las hemoglobinopatías según edad.....	36
9.4 Clasificación fenotípica de las hemoglobinas encontradas.....	37
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	38
10.1. Confirmación del diagnóstico clínico.....	38
10.2. Relación de los resultados con pruebas complementarias de la BHC.....	39
10.3. Caracterización socio-demográfica de la prevalencia de hemoglobinopatías. ....	40
10.3.1 Distribución demográfica .....	40
10.3.2 Prevalencia de las hemoglobinopatías según grupo étnico.....	42
10.3.3 Prevalencia de las hemoglobinopatías según sexo. ....	42
10.3.4 Prevalencia de las hemoglobinopatías según edad. ....	43
10.4 Clasificación fenotípica de las hemoglobinas encontrada. ....	43

## *Caracterización fenotípica de hemoglobinopatías*

XI.	CONCLUSIONES.....	45
XII.	RECOMENDACIONES .....	46
XIII.	REFERENCIAS .....	47
XIV.	ANEXOS.....	52

## *Caracterización fenotípica de hemoglobinopatías*

### **DEDICATORIA**

A Nuestro Señor Dios:

Por habernos permitido llegar hasta este punto de nuestras vidas, por su infinita bondad y amor y por habernos dado salud, fortaleza y sabiduría para lograr nuestros objetivos.

A Nuestros Padres:

Por ser el pilar fundamental en todo lo que somos, en toda nuestra educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante, por los ejemplos de perseverancia y constancia, pero más que nada, por su amor.

A nuestros maestros:

Por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta monografía, por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.

## *Caracterización fenotípica de hemoglobinopatías*

### **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos Al Instituto Politécnico de la Salud “Dr. Luis Felipe Moncada” UNAN Managua, por habernos permitido formarnos como buenos profesionales, al personal docente por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación académica , y por todos los conocimientos que nos han impartido a lo largo de nuestra etapa universitaria

Nuestro más sincero agradecimiento a todas la personas que con su aporte científico y humano han colaborado en la realización de este trabajo.

Especial mención y agradecimiento a las personas cuya colaboración ha sido importante en el desarrollo de este trabajo, Dr. Gerardo Mejía, Dra. Anaishelle Rodríguez, y a los médicos responsables de pediatría del hospital de Chinandega y Matagalpa por su disposición y apoyo.

Nuestro profundo agradecimiento a nuestro tutor PhD. Allan Pernudi Ubau por sus conocimientos, su persistencia, confianza y motivación, han sido fundamentales para nuestra formación como investigadoras y a nuestra Asesora MsC. Martha Xiomara Guerrero Delgado, quien marcó cada etapa de nuestro camino en este trabajo, apoyándonos en asesorías, aclarando dudas, gracias por su tiempo y apoyo para la elaboración de este trabajo monográfico.

## *Caracterización fenotípica de hemoglobinopatías*

### **VALORACIÓN DE TUTOR**

La drepanocitosis, también conocida como anemia drepanocítica o anemia de células falciformes es una enfermedad crónica. Se caracteriza principalmente por provocar un estado de hemólisis crónica severa y crisis vaso-Oclusivas.

A pesar de que esta enfermedad fue descrita hace casi un siglo y que es comprendida tanto a nivel proteico como molecular, se calcula que aproximadamente 300,000 individuos nacen anualmente con drepanocitosis u otro defecto de la hemoglobina.

En muchos países de la región Centro Americana se han hechos grandes esfuerzos para conocer la prevalencia de la drepanocitosis en la población, tomando como ejemplo el vecino país de Costa Rica, en donde desde hace más de tres décadas investigadores del CIHATA han estudiado esta patología. Sin embargo, en nuestro país la situación es diferente, hasta hace muy poco se iniciaron los primeros esfuerzos para tamizar la prevalencia de las hemoglobinas anormales en todo el territorio Nacional. El presente trabajo tuvo como objetivo principal la confirmación del diagnóstico clínico de drepanocitosis y adicionalmente el análisis a familiares de pacientes mediante la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa. Los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron de manera sorprendente la necesidad de instaurar esta técnica en las unidades de salud para apoyar al diagnóstico. Adicionalmente, se logró identificar una hemoglobina inestable con baja afinidad al oxígeno (Hemoglobina Presbiteriana), la cual fue publicada en una revista internacional, ratificando la importancia y alto nivel científico de este estudio.

Como tutor y asesor científico de este trabajo, me siento complacido con los resultados encontrados y el trabajo realizado por estas jóvenes científicas. Por consiguiente, doy fe que este trabajo reúne todos los requisitos científicos y metodológicos establecidos por la UNAN-Managua para ser presentado frente a un jurado.

---

Dr. Allan Pernudy Ubau MSc. PhD.  
Responsable del Laboratorio de Biología Molecular  
Docente del departamento de Bioanálisis Clínico  
POLISAL /UNAN-Managua

## *Caracterización fenotípica de hemoglobinopatías*

### **RESUMEN**

Las hemoglobinopatías son un grupo de trastornos congénitos de la hemoglobina con un patrón de herencia autosómico recesivo que incluyen las hemoglobinopatías estructurales producidas por la síntesis de una cadena de globina estructuralmente anormal.

Por esta razón se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, con el objetivo de caracterizar fenotípicamente la Hemoglobina en pacientes con diagnóstico clínico de anemia drepanocítica y familiares, en las cabeceras departamentales de Nicaragua mediante electroforesis de hemoglobina en tiras de acetato de celulosa, en el período Enero – Noviembre 2016.

Se efectuó en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera La Mascota, Hospital España de Chinandega y Hospital César Amador Molina de Matagalpa.

Para el diagnóstico clínico de hemoglobinopatías se utilizan datos clínicos y pruebas de laboratorio como el test de falciformación y extendido periférico. Sin embargo ya contamos con la prueba de Electroforesis de hemoglobina, permitiéndonos por primera vez en nuestro país conocer la prevalencia de las hemoglobinopatías en la población nicaragüense, logrando así la identificación de portadores homocigotos y heterocigotos que son importantes epidemiológicamente para poder mitigar la aparición de estas enfermedades empleando el método de electroforesis de hemoglobina.

Mediante la realización de estudio se obtuvieron los siguientes datos, HbAA 45.2%, HbAS 27%, HbAC 1.6%, HbSS 23%, entre esto se destaca el diagnóstico de una familia con Síndrome Drepanocítico doble heterocigoto (HbSC 1.6%) en el departamento de Matagalpa y adicionalmente se detectó en dos pacientes una variante de hemoglobina llamada Hemoglobina Presbiteriana (1.6%), siendo los primeros casos descritos en el país.

Sugerimos dar continuación al estudio de la presencia del gen causante de anemia de células falciforme a fin de conocer la magnitud del trastorno y determinar la prevalencia a nivel nacional, tomando como base los resultados aquí obtenidos y de esta manera beneficiar enormemente a la población  
Nicaragüense.



### I. INTRODUCCIÓN

Las hemoglobinas constituyen un grupo de trastornos hereditarios de la hemoglobina que tienen amplia distribución mundial, convirtiéndose en muchas regiones en verdaderos problemas de salud pública. Se transmiten de padres a hijos (hereditarios), en los cuales hay una estructura y producción anormal de la molécula de la hemoglobina.

Las tres hemoglobinas normales encontradas, son la HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), la Hb A<sub>2</sub>( $\alpha_2\delta_2$ ) y la Hb Fetal (HbF) ( $\alpha_2\gamma_2$ ). La producción de cadenas delta se estabiliza alrededor del año de edad, y por tanto los niveles de HbA<sub>2</sub>. Después del año de edad la HbA es la más importante cuantitativa y funcionalmente y corresponde aproximadamente al 95% de la hemoglobina total. La HbA<sub>2</sub> con menos del 3.8% y la HbF que se estima en menos del 2% completan en su orden las otras hemoproteínas importantes. En forma sencilla estas tres son las hemoglobinas “normales”. Un sujeto normal se denomina AA resaltando que prácticamente casi toda su hemoglobina es HbA (Oreamuno, 2016).

Las alteraciones de la hemoglobina se clasifican en defectos cualitativos y cuantitativos, en los cualitativos se produce una nueva molécula de hemoglobina (Hb) estructuralmente diferente de las hemoglobinas normales, las alteraciones cuantitativas no están incluidas en este estudio. En este grupo se incluyen las hemoglobinas anormales y aunque se han descrito más de 700 variantes, las principales son la HbS ( $\alpha_2\beta_2^{26}$  glu-val), HbC ( $\alpha_2\beta_2^{26}$  glu-lis) y la HbE ( $\alpha_2\beta_2^{26}$  glu-lis). En América y África son la S y la C las de mayor importancia clínica y epidemiológica, siendo la HbE su contraparte en el sudeste asiático (Oreamuno, 2016).

El único cambio del 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

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

acompaña a menudo por un cambio en la morfología en forma de media luna (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, la cual confirma su presencia (Ferguson, Sánchez, & Rojo, 2003).

### **II. ANTECEDENTES**

En Noviembre de 1910, el Dr. James Herrick hizo la primera descripción oficial en la literatura publicada de la anemia de células falciformes. El cardiólogo tenía un paciente joven, Gualterio Noel Clemente, de la Isla caribeña de Grenada en quien visualizó los síntomas de lo que ahora nos referimos como síndrome agudo del pecho, una complicación común de la anemia de células falciformes (Smith, 2015).

Aproximadamente un 5% de la población mundial es portadora de genes causantes de hemoglobinopatías, entre las que destacan la drepanocitosis. Se calcula que cada año nacen en todo el mundo más de 300 000 niños con formas grave de esta enfermedad (OMS, 2011).

En 1945, se realiza la primera publicación sobre la existencia de HbS anormales en Costa Rica, en donde reportan el caso de una mujer de 26 años, soltera, mestiza, de la ciudad de Cartago, que ingresó en el Hospital San Juan de Dios por extrema esplenomegalia e ictericia. La comunicación de laboratorio indica abundantes eritrocitos “S” alargados a manera de drepanocitos, reticulocitosis, eritroblastemia y una Hb de 8.8 g/dl (Saenz, 2005).

Por primera vez en 1949, la electroforesis mostró que la HbS se movía de manera distinta que la hemoglobina normal, sugiriendo un cambio molecular en la célula anormal (Smith, 2015).

En 1965, analizando en los Estados Unidos algunas muestras sanguíneas de individuos costarricenses de raza negra, reporta un doble heterocigoto Hb C/G-Philadelphia y un caso de persistencia hereditaria de HbF y, finalmente, Elizondo y Solano en 1965, destacan un caso doble heterocigoto por HbS y C, en un individuo híbrido de Guanacaste, en el que se evidenció

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

una coriorretinitis no tratada, alteraciones neurológicas y esplenomegalia (Saenz, 2005).

En 1978, en una familia de la ciudad de Atlanta, Estados Unidos, se describió por primera vez la variante de hemoglobina, Hb Presbiteriana, así mismo se describieron otros 3 casos, en Japón, España y Alemania (Moo-Pen, 1978).

En Nicaragua, en agosto del 2007 Pernudi, efectuó un estudio 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%.

En el año 2010, se realizó la estandarización de la electroforesis de hemoglobina en geles de agarosa por MsC. Martha Xiomara Guerrero, *et al*, de la UNAN-Managua, como un primer intento de mejorar el diagnóstico a los pacientes drepanocítico, esta se aplicó en el 2012 donde se estudiaron 30 pacientes del Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota” con diagnóstico clínico y los resultados obtenidos fueron los siguientes: 57% Hb SS y 43% Hb AS.

En el año 2015 Villalobos, *et al*, se estandarizó la electroforesis de hemoglobina en tiras de acetato de celulosa en la UNAN-Managua y se muestreo a 44 pacientes provenientes de la consulta de hematocológica del Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”, obteniendo un 67.37 % de Hb SS, y un 2.27% Hb SC. Esto representa el primer intento de caracterizarse las hemoglobinas anormales en el país.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Las hemoglobinopatías son trastornos congénitos de la hemoglobina con un patrón de herencia autosómico recesivo constituyen un problema de salud pública en diferentes áreas geográficas repartidas por todo el mundo, en la mayoría de las ocasiones en el estado de portador cursan de forma silente o asintomática pero en su forma homocigota o doble heterocigoto pueden causar una enfermedad grave. En la actualidad un 5% de la población mundial es portadora de un gen de la hemoglobina potencialmente patológica.

En América, la contribución africana ha sido predominante desde los inicios del siglo XVI, y cubre un período de más de 300 años, Por lo tanto, la presencia de hemoglobinas anormales es el producto de la inmigración de diversas poblaciones africanas.

Si se hace una analogía con los hallazgos en el África centro-occidental, la cuenca del Caribe y otras regiones de América tropical con alto índice de ancestros africanos, constituye otra especie de tierra de las hemoglobinopatías, en la cual la HbS asume la mayor importancia clínica y antropológica.

Debido al entrecruzamiento de diversas poblaciones africanas y europeas, con los grupos étnicos que residieron en nuestro país provocó la introducción de una serie de alteraciones hematológicas hasta ahora muy poco frecuentes. A pesar de esta situación, en Nicaragua no se ha realizado ningún tipo de estudio que revele la prevalencia de estas enfermedades en el país.

Por esta razón se procedió, por primera vez en nuestro país, en el Instituto Politécnico de la Salud, POLISAL, UNAN-MANAGUA, por Villalobos, *et al*, la estandarización de la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa realizado bajo la dirección del responsable del Laboratorio de Biología Molecular, ya que durante muchos años, antes de

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

dicha estandarización, el diagnóstico de hemoglobinopatías se realizaba con la ayuda de datos clínicos y pruebas de laboratorio tales como el test de falciformación y extendido periférico.

Dado que ya contamos con la prueba de oro, es necesario conocer por primera vez en nuestro país la caracterización fenotípica de las hemoglobinopatías en la población nicaragüense, logrando así la identificación de portadores homocigotos y heterocigotos que son importantes epidemiológicamente para poder mitigar la aparición de estas enfermedades.

El empleo de este método contribuye al mejoramiento de la calidad diagnóstica en los centros hospitalarios, siendo el diagnóstico confirmatorio recomendable para los casos de Hemoglobinopatía.

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

¿Cuál es el fenotipo de hemoglobina en los pacientes con diagnóstico clínico de anemia drepanocítica y familiares, en las cabeceras departamentales de Nicaragua mediante electroforesis de hemoglobina en tiras de acetato de celulosa, en el período Enero – Noviembre 2016?

### **V. OBJETIVOS**

#### Objetivo General

Caracterizar fenotípicamente la Hemoglobina en pacientes con diagnóstico clínico de anemia drepanocítica y familiares, en las cabeceras departamentales de Nicaragua mediante electroforesis de hemoglobina en tiras de acetato de celulosa, en el período Enero – Noviembre 2016.

#### Objetivos específicos

1. Confirmar mediante electroforesis de hemoglobina el diagnóstico clínico de anemia drepanocítica en los pacientes atendidos en las diferentes unidades de salud.
2. Comparar los resultados de la electroforesis de hemoglobina con pruebas complementarias de la Biometría Hemática Completa, (BHC).
3. Caracterizar socio-demográficamente los fenotipos de hemoglobinopatías en la población de estudio mediante electroforesis.
4. Describir fenotípicamente las hemoglobinas encontradas en los pacientes clínicamente diagnosticados con drepanocitosis y familiares.



### **VI. MARCO TEÓRICO.**

#### **6.1 Hemoglobinopatías**

Las hemoglobinopatías son un grupo de trastornos congénitos de la hemoglobina con un patrón de herencia autosómico recesivo que incluyen las hemoglobinopatías estructurales producidas por la síntesis de una cadena de globina estructuralmente anormal. Estas anomalías pueden ser un defecto cualitativo de la cadena o un defecto cuantitativo en su síntesis (McKenzie, 2000).

La investigación en torno a las hemoglobinopatías tiene una gran relevancia clínica porque contribuye al mejor conocimiento de algunos trastornos hematológicos y relevancia genética ya que partiendo de la herencia es de carácter autosómico recesivo.

Estas alteraciones afectan a cualquiera de las cadenas polipeptídicas, en consecuencia la función de la hemoglobina anormal va a depender no solo del tipo de cadena afectada, sino también de la parte en la cadena en que esa alteración se ha efectuado, y aún más importante del aminoácido sustituido (Saenz, et al. 2003).

Entre los defectos más comunes se encuentran la HbS, HbC y HbE aunque existen muchas más variantes consideradas “raras” por su baja frecuencia en la población a nivel mundial.

#### **6.2 Hemoglobinopatías por HbS**

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

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

que conduce al secuestro y fagocitosis de las células infectadas por el bazo (McKenzie, 2000).

### **Etiología y patogénesis.**

La HbS es producto de la sustitución de un residuo de ácido glutámico por una valina en la posición 6 de la N-terminal de la cadena beta. Esta sustitución produce cambios en la carga neta, en consecuencia cambia la movilidad electroforética de la hemoglobina (McKenzie, 2000).

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 ésta sea nula si en lugar de HbA existe HbF (Sans, et al., 2007). Este efecto de la HbF, permite evaluar opciones terapéuticas basadas en la inducción de síntesis de HbF durante la edad adulta.

La modificación del entorno químico que existe en esta molécula mutada, 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, et al., 2007)

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. 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. (McKenzie, 2000)

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

### **Manifestaciones clínicas.**

Las manifestaciones más frecuentes de esta enfermedad son:

Anemia; Crisis aplásica; Dactilitis o síndrome mano pie ( los niños pequeños pueden tener dolor e hinchazón en manos o pies); Episodios o crisis dolorosa (se dan con mayor frecuencia en los brazos, manos, piernas, o abdomen y se producen por la vaso-oclusión); Infecciones graves ( las personas afectadas, sobre todo niños, tienen un riesgo grande de padecer sepsis, meningitis y neumonías); Crisis de secuestro esplénico, ( el bazo crece por secuestro de glóbulos rojos en su interior);Accidente cerebrovascular (se da cuando la circulación cerebral se bloquea por glóbulos rojos falciformes). Complicaciones pulmonares; Infartos óseos (que afectan a huesos largos y vértebras y con la evolución de la enfermedad, se puede presentar necrosis de la cabeza femoral). Complicaciones visuales, cardíaca, de riñón, del hígado y vías biliares (Restrepo. 1992).

Una de las características más importantes de esta enfermedad es la vaso-oclusión que es particular de la Hb S, La vaso-oclusión se inicia y es sostenida por la interacción entre las células deformadas por la polimerización de la Hb S el endotelio de los vasos y algunos constituyentes del plasma. La desoxigenación de las células con hemoglobina S produce una salida de potasio de los glóbulos rojos, lo cual aumenta la densidad de los glóbulos y la tendencia de la hemoglobina S a polimerizarse. La adherencia de los hematíes al endotelio vascular ocurre como consecuencia de daño a las membranas celulares, al ser perturbadas las células endoteliales por los glóbulos rojos conteniendo hemoglobina polimerizada. El balance entre vasoconstrictores y vasodilatadores se altera a favor de los primeros y el flujo de la sangre se hace lento, de tal forma que los procesos de polimerización de la hemoglobina S, la deformidad de los glóbulos rojos y la vaso-oclusión ocurren antes del paso de la sangre (Rodríguez, 1998).

### **Afectaciones de otros órganos.**

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 *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella* spp (Quintero, et al., 2012).

**Úlceras en las piernas:** son complicaciones frecuentes y debilitantes en pacientes con anemia de células falciformes. Una inadecuada sustitución 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 periósticas; y pueden observarse áreas irregulares de osteosclerosis, representando áreas de infarto óseo (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 (derrame sanguíneo con infiltración a los tejidos) y signos proliferativos característicos de neoformaciones vascular compensadora (Sans, et al., 2007).

### **6.3 Rasgos de hemoglobina AS**

Los rasgos de hemoglobina AS ocurren cuando una persona recibe un gen para hemoglobina normal (A) de un padre y la variedad falciforme (S) del otro padre. (Holstein, 2011). Este no es trastorno tan grave como la drepanocitosis, 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).

### **6.4 Hemoglobinopatías por HbC**

La hemoglobina C (HbC) es originaria de África Occidental (Burkina Faso) y se extendió por todo el mundo como la hemoglobina S. Se compone de la mutación del gen de globina beta en el codón 6 (GAG-AAG), dando como resultado la sustitución del sexto aminoácido de la cadena beta de la hemoglobina humana, el ácido glutámico por el aminoácido lisina (Nagel, et al., 2001).

La Hb C fue la segunda variante de las hemoglobinas identificada electroforéticamente en 1950 en individuos de raza negra de Norteamérica. Y luego definida estructuralmente en 1960. Se acepta que la HbC ha surgido a raíz de una mutación de la HbA independiente de la ocurrida en la HbS, por un simple cambio de bases en el codón para ácido glutámico en la sexta posición de la cadena beta (Sáenz, 1984).

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

### **Etiología y patogénesis.**

Al igual que la HbS, la HbC tiene una solubilidad disminuida dentro del eritrocito. Los cristales intracelulares de HbC se forman bajo condiciones que deshidratan la célula al incrementarse la concentración de hemoglobina corpuscular media. Esta tendencia, contrario a la HbS, se presenta tanto en sangre oxigenada como desoxigenada (Sáenz, et al., 2003).

El resultado de la cristalización de la hemoglobina C lleva a una pérdida de la deformabilidad. La vida disminuida de los eritrocitos CC posiblemente se debe a su rigidez, lo cual les impide pasar con facilidad a la microcirculación (Sáenz, et al., 2003).

### **Manifestaciones clínicas.**

La enfermedad por hemoglobina C suele ser asintomática, pero es posible que los pacientes experimenten dolor articular y abdominal, el bazo frecuentemente aumenta de tamaño, y se produce hemolisis variable que produce anemia de leve a moderada (Mckenzie, 2000).

La esplenomegalia es un cuadro muy constante por la enfermedad de la HbC, puede ser asociada con dolor abdominal muy difuso, sin embargo, hay pequeñas evidencias debido a cambios hemodinámicos clínicamente significativos, los niveles de hemoglobina oscilan entre 8 y 12 g/dL, y hay un incremento marcado en el número de codocitos presente en sangre (Beutler, 2006).

### **6.5 Síndrome Drepanocítico doble heterocigoto SC.**

La hemoglobina Hb SC también llamada anemia de células falciformes es la segunda hemoglobinopatía más frecuente después de la falciforme homocigota. Se estima que hay 54,736 bebés nacidos con la enfermedad Hb SC cada año en todo el mundo (Weatherall, 2010).

Las variaciones morfológicas de los eritrocitos más frecuentes en la hemoglobina SC son: la formación de cristales en la Hb C, y las células falciformes en la Hb S, haciendo posible identificar a esta enfermedad con

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

sólo mirar los frotis de sangre periférica. Los eritrocitos falciformes pueden obstruir los vasos y tienen una vida útil reducida, lo que lleva a hiperhemólisis, vasculopatía difusa y daños al tejido en varios órganos. La composición de la hemoglobina SC es de aproximadamente 50% HbS y 50% de HbC. Si bien de forma individual la HbS y HbC no debe haber ninguna consecuencia clínica, la Hb SC combinadas en el estado de doble heterocigoto está acompañada por anomalías clínicas significativas. La razón principal es que HbC aumenta la formación de polímero intracelular de HbS por deshidratación de las células rojas (Bunn, et al., 1982), (Araujo, et al., 1999), (Ballas, et al., 1982).

### **Manifestaciones clínicas y complicaciones.**

La interacción entre la HbS y la HbC es de un curso más benigno que la drepanocitosis en ciertas complicaciones, sin embargo otras han sido reportadas con mayor frecuencia como: lesiones óseas y patología ocular (Serjeant, et al., 1973). Las manifestaciones más frecuentes en SC son hematuria renal recidivante, necrosis aséptica de la cabeza del fémur o del húmero, episodios de infarto pulmonar, complicaciones al final del embarazo y en el puerperio y, muy frecuentes, manifestaciones oculares como retinopatía proliferativa, hemorragia del vítreo y desprendimiento de la retina (Sáenz, et al., 1982).

### **6.6 Hemoglobina F**

La hemoglobina fetal es un tetrámero estructural de tipo  $\alpha_2\gamma_2$ , con cualidades muy particulares. Se destaca su alta afinidad por el  $O_2$  dada por su estructura y su baja interacción con el 2,3 difosfoglicerato (Bunn, 1977). La supervivencia de los glóbulos rojos con HbSS es de 10 a 15 días comparada con los 120 días de supervivencia, que tienen los glóbulos con una hemoglobina normal. Un aumento en la hemoglobina fetal (HbF) disminuye la polimerización de la Hb S, debido a la afinidad de la Hb F por el oxígeno. (Sáenz, 2004).

### **Terapia y su relación con la Hb F.**

El uso de hidroxiurea es la terapia actual más empleada, induce la síntesis de Hb F al disminuir la diferenciación terminal de células madres eritroides, lo cual aumenta la sobrevivencia del glóbulo rojo y disminuye las crisis drepanocíticas (Lanzkowsky, 1999). Su uso tiene como finalidad mejorar las crisis de dolor por episodios de crisis vaso-oclusivas, evitar la recurrencia de eventos pulmonares (síndrome torácico) y disminuyendo las hospitalizaciones (Sáenz, 2004).

El uso del ácido valpróico, aumenta la Hb F, al afectar la expresión génica de la globina y su gran ventaja con respecto a la hidroxiurea, es que no produce mielosupresión, sin embargo inhiben la proliferación de las células madre (Lanzkowsky, 1999).

### **6.7 Hemoglobinas Raras**

Se considera que una hemoglobinopatía es poco común o rara cuando se observa con una frecuencia menor del 0, 1 % en una población dada (Oficina Mundial de la Salud [OMSJ]).

Hay hemoglobinopatías muy poco comunes en algunas áreas geográficas y otras que aparecen como mutantes totalmente nuevas, siendo ambos hallazgos de gran interés como marcadores genéticos y aún clínicos, para una determinada población. (Elizondo, Saenz, Paez, & Arroyo, 1978)

#### **6.7.1**

La hemoglobina Presbiteriana es una nueva variante que migra por electroforesis entre Hb A y F en acetato de celulosa (pH 8,4), y en la posición de la Hb C en agar citrato (pH 6,0). La variante se encontró en una niña de 7 años de edad, su padre, y su abuela paterna, todos los cuales presentaban anemia leve. El bajo nivel de afinidad por el oxígeno probablemente puede explicarse sobre la base de la interrupción del enlace de hidrógeno entre  $\alpha 103$ -histidina (G1O) y el carbonilo de la  $\beta 108$  asparagina (G1O), que ahora se sustituye por lisina en la Hemoglobina Presbiteriana. (Moo-Penn, 1978).



## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

La sustitución de asparagina por lisina probablemente da lugar a la interrupción del enlace y la repulsión electrostática entre los residuos. Esto conduce a la reordenación de los residuos desestabilizando la conformación de oxígeno, que se refleja en la baja afinidad por el oxígeno de la Hb Presbiteriana. Datos de la velocidad de sedimentación indican que una sustancial disociación de los tetrámeros a dímeros no se produce en la Hb Presbiteriana en condiciones de oxigenación y que por lo tanto la baja afinidad del oxígeno no está directamente relacionada con el grado de disociación de la subunidad (Bonaventura, 1968).

### **6.8 Diagnóstico de hemoglobinopatías.**

- **Test de falciformación.**

En un medio carente de oxígeno ( $O_2$ ) 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  $O_2$ , se tapa con un cubreobjetos y se sellan los bordes con petrolato; en pocos minutos se puede observar el fenómeno. (Ferguson, et al., 2003).

- **Prueba de solubilidad de hemoglobina.**

El fundamento de la técnica utiliza un agente reductor: el ditionito de sodio (hidrosulfito de sodio), que induce un medio pobre en oxígeno, en un buffer de fosfatos de alta molaridad (2.24M). La prueba se desarrolla en tubos con 2 ml de buffer y ditionito. Si hay HbS el medio hipóxico va a inducir la formación de los polímeros de HbS (llamados tactoides) que producen turbidez, y el tubo que inicialmente es transparente, se vuelve turbio. Esto se considera una prueba presuntiva positiva por HbS.

Debido a que hay hemoglobinas que pueden generar también turbidez, se utiliza una segunda prueba llamada prueba confirmatoria de solubilidad. En esta se agrega urea al tubo que dio la prueba anterior positiva. Si hay HbS, el tubo se torna transparente, pues la urea rompe los enlaces hidrofóbicos que se forman entre los polímeros de turbio este permanece igual, ello

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

indica otra hemoglobinopatía. Ambas determinaciones deben complementarse con otras pruebas como electroforesis de Hb. Isoelectroenfoque o HPLC. (Oreamuno, 2016)

- **Electroforesis de hemoglobina.**

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, varias hemoglobinas (A, S, C, etc) pueden separarse con facilidad debido a sus diferencias de carga eléctrica neta causadas por las variantes estructurales (Sáenz, et al., 2003).

Todo escrutinio electroforético debe iniciarse a pH alcalino, pues es el sistema que mejor permite la identificación preliminar de hemoglobinas rápidas y lentas. Datos combinados (variación de pH) permiten la diferenciación, con un alto grado de especificidad. Este es el caso de la HbS que migra en la misma posición que la HbD, a pH 6.1, la HbD migra igual que la HbA, no así la HbS (Sáenz, et al., 2003).

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. Pero de las más de 1000 variantes de hemoglobinas conocidas, solo tres representan el 90 % de las hemoglobinopatías que son detectadas por medio de esta técnica. Estas son HbS, C, y E (Saenz, et al. 2003).

A pesar de los avances tecnológicos, 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)

- **Cromatografía líquida de alta definición (HPLC).**

La HPLC de intercambio catiónico es utilizada para la separación de los tipos de hemoglobina mediante una fase catiónica débil y elución de las partículas. A diferencia de la electroforesis en acetato de celulosa no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. La HPLC es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Con una fase móvil líquida interactiva, otro parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa. La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria. (García, 2002)

### **6.9 El mestizaje y su relación con las hemoglobinopatías en Nicaragua.**

Los genes mutantes de las hemoglobinopatías cualitativas (S,C), se encuentran principalmente en africanos y sus descendientes, siendo estos quienes difundieron estos genes anormales al continente americano, en contraste con los genes talasémicos que tienen su origen más amplio y fueron introducidos al trópico americano desde África, Europa y Asia (Saenz, 1988).

Aunque ambas HbC y HbS surgen del continente africano, se han realizado estudios moleculares, y fueron capaces de identificar el gen Hb C en tailandeses nativos, lo que demuestra un origen africano para la Hb C (Sutcharitchan, 1996). La incidencia de la HbC es de 17 a 28% en África occidental, en las proximidades del norte de Ghana (Williams, 1990). En Brasil, Araujo, *et al*, informó una incidencia de 0,6 a 1,0% de HbC por medio de la demostración de cristales (Arujo, 1964). También describió casos raros de Hb C en descendientes de italianos y portugueses. La Hb S se halla ampliamente distribuida entre la población del África Ecuatorial y Madagascar y con menos frecuencia en el área mediterránea, Península Arábiga y partes de la India. En América estas hemoglobinas se encuentran fundamentalmente en raza negra y en poblaciones híbridas, como marcadores indelebles del origen africano de sus ancestros (River, 1961).

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

Con relación a Nicaragua, los primeros negros africanos llegaron a partir de la tercera década del siglo XVI. Nicaragua, por su privilegiada posición en el istmo centroamericano, fue un lugar de encuentros de diferentes grupos raciales. Es así como, a la llegada de los españoles en el año 1524, el territorio se hallaba ocupado por grupos de diferentes características (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 si 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 con tres componentes fundamentales: indios, europeos y africanos (Romero, 1993).

En la actualidad, Nicaragua tiene una población llamada “criolla” caracterizada fenotípicamente por su ascendencia del africano y del indio (Romero, 1993). En Costa Rica la frecuencia de estas hemoglobinas ha sido de 8.2% para la HbS y de 2.4% para la HbC en población de raza negra, y de 8.9% y 0.3% en población híbrida del Guanacaste, respectivamente (Saenz, 1982).

### **VII. DISEÑO METODOLÓGICO**

#### **7.1 Tipo de estudio**

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, con el objetivo de Caracterizar fenotípicamente la Hemoglobina en pacientes con diagnóstico clínico de anemia drepanocítica y familiares, en las cabeceras departamentales de Nicaragua mediante electroforesis de hemoglobina en tiras de acetato de celulosa, en el período Enero – Noviembre 2016.

#### **7.2 Área de estudio**

Se efectuó en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera La Mascota, Hospital España de Chinandega y Hospital César Amador Molina de Matagalpa.

#### **7.3 Universo y muestra**

El universo y la muestra estuvieron conformados por un total de 126 individuos analizados 72 pacientes diagnosticados con anemia drepanocítica y 54 familiares de dichos pacientes, en las diferentes unidades de salud ubicadas en las cabeceras departamentales.

#### **7.4 Tipo de muestreo**

No probabilístico por conveniencia, utilizando los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes atendidos y diagnosticados clínicamente con anemia drepanocítica y sus familiares en las unidades de salud ubicadas en las cabeceras departamentales.
- Poseer vínculo sanguíneo con algún otro participante, al menos hasta el segundo grado.

Y los siguientes criterios de exclusión:

- Pacientes que han sido transfundidos en un lapso de 4 meses, antes del estudio.
- Familiares sin relación sanguínea.

### **7.5 Instrumento y recolección de la información**

Para la recolección de la información el equipo de trabajo se reunió brevemente con los médicos responsables de estos pacientes de las unidades de salud ubicadas en las cabeceras departamentales. El instrumento de recolección de la información fue una hoja de consentimiento informado dirigido al padre o tutor de cada niño, junto con una hoja de recolección de datos, con las cuales se obtuvieron datos socios demográficos, tales como edad, sexo, etnia y la clínica de los pacientes.

### **7.6 Recolección de la muestra**

La muestra fue tomada, en coordinación con el médico responsable de los pacientes en un día específico, designado para el muestreo en cada unidad de salud. Se tomaron en tubos de ensayo con anticoagulante EDTA-k3, al vacío, se confirmó el nombre y código de trabajo, para luego ser llevado al laboratorio de Biología Molecular del Instituto Politécnico de la Salud donde se realizó el hemolizados, se separaron alícuotas, posteriormente fueron procesados mediante electroforesis en acetato de celulosa.

### **7.7 Procesamiento y análisis de resultados**

La información se procesó haciendo uso del software Microsoft Office Word 2013. El procesamiento de la información recolectada a través de la hoja de recolección de datos se llevó a cabo elaborando una base de datos con asistencia del programa estadístico SPSS, se utilizó Excel 2013 y GraphPad Prism 5, para la elaboración de gráficos, y se utilizó Microsoft Power Point 2013 para la respectiva presentación.

### **7.8 Materiales y métodos**

#### **7.8.1 Preparación de Reactivos**

- Agua desionizada se utiliza en todo.
- Ácido acético glacial.
- 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).

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

- Solución decolorante: Diluir ácido acético 25 ml de ácido acético al 5% glacial más 975 ml de agua.

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

1. Centrifugar muestras anticoaguladas 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)

### **7.8.3 Electroforesis de Hemoglobina**

*Procedimiento pre-análisis: 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 µl de las muestras por orden numérico en los pocillos de la placa porta muestras.

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

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.

### **7.8.4 Tinción**

1. Las tiras de 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.

### **7.9 Interpretación de Resultados**

La interpretación de resultados se hizo en base a patrones ya establecidos, aun existiendo una cantidad excesiva de variantes de hemoglobina, las más frecuentes son las de Hb AA, Hb AS, Hb AC, Hb SS, Hb SC.



## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

### **VIII. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES**

<u>Variable</u>	<u>Sub-variable</u>	<u>Indicador</u>	<u>Valor</u>	<u>Escala</u>
Confirmación de diagnóstico clínico	Hba Normal	Presencia	Si-No	Px Sano
		Ausencia	Si-No	Px Enfermo
	Hba Anormal	Presencia	Si-No	Px Enfermo
		Ausencia	Si-No	Px Sano
Relación Electroforesis-BHC	RBC	10 <sup>6</sup> /ul	< 3.50	Disminuido
			3.50-5.50	Normal
			> 5.50	Aumentado
	HBA	g/dL	< 11.0	Disminuido
			11.0-16.0	Normal
			> 16.0	Aumentado
	HTO	%	< 37.0	Disminuido
			37.0-46.0	Normal
			> 46.0	Aumentado
	VCM	fL	< 80.0	Disminuido
			80.0-100.0	Normal
			> 100.0	Aumentado
	HCM	Pg	< 27.0	Disminuido
			27.0-34.0	Normal
			> 34.0	Aumentado
MCHC	g/dL	< 32.0	Disminuido	
		32.0-36.0	Normal	
		> 36.0	Aumentado	
Socio demografía	Demografía	Lugar de Nacimiento	Región del Pacífico	Managua
				Masaya
				Granada
				León
				Carazo
				Chinandega
				Rivas
			Región Central	Nueva Segovia

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

				Estelí
				Madriz
				Jinotega
				Matagalpa
				Boaco
				Chontales
				Río San Juan
				Región Autónoma
	Etnia	Blanca	Si-No	
		Mestiza	Si-No	
		Negro	Si-No	
	Edad	0-11	Si-No	
		12-18	Si-No	
		19-28	Si-No	
29-50		Si-No		
> 51		Si-No		
Sexo	Femenino	Si-No		
	Masculino	Si-No		
Clasificación Fenotípica	Tipo de hemoglobina	1 sola banda	AA	Normal
			SS	Drepanocítica
		2 bandas	AS	Portador
			AC	Portador
			SC	Doble heterocigoto
			SF	Drepanocítica con HbF
			Hb Raras	Portador

### IX. RESULTADOS

#### 9.1. Confirmación de diagnóstico clínico.

Tomando como referencia el total de pacientes que clínicamente fueron diagnosticados al asistir a sus consultas programadas por presentar sintomatología de anemia drepanocítica, se logró confirmar y clasificar a través de la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa en pH alcalino 8.2 a 72 pacientes, de estos 31 fueron confirmados para anemia drepanocítica, representando el 43% de los pacientes evaluados, 29 pacientes clasificados como SS y 2 pacientes como SC, estos a su vez son considerados como pacientes enfermos. El 57% restantes (41 pacientes) que fueron reportados como enfermos, fueron confirmados portadores; a 34 heterocigotos para AS, 2 pacientes AC, 2 pacientes Hba Presb y 3 pacientes sanos homocigotos AA (Gráfico 1).

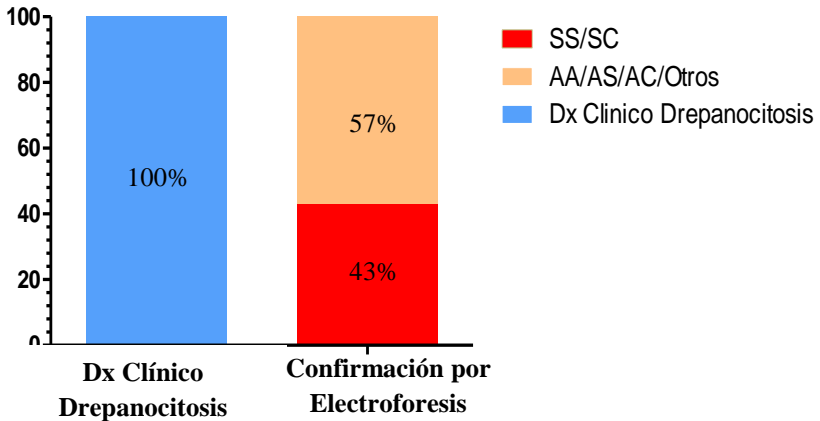


Gráfico 1. Confirmación mediante electroforesis de hemoglobina el diagnóstico clínico de anemia drepanocítica Fuente: Tabla 1

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

### 9.2. Comparación de los resultados con pruebas complementarias de la BHC.

Los gráficos reflejan la relación de conteo de glóbulos rojos (Grafico 2), hemoglobina (Grafico 3) y hematocrito (Grafico 4), con el fenotipo de hemoglobina encontrada de los pacientes en estudio, tomando como referencia los siguientes valores, conteo de glóbulos rojo de  $3.5-5.5 \times 10^6/\mu\text{L}$ , hemoglobina  $11.0-16.0 \text{ g/dL}$ , hematocrito  $37.0-46.0\%$ .

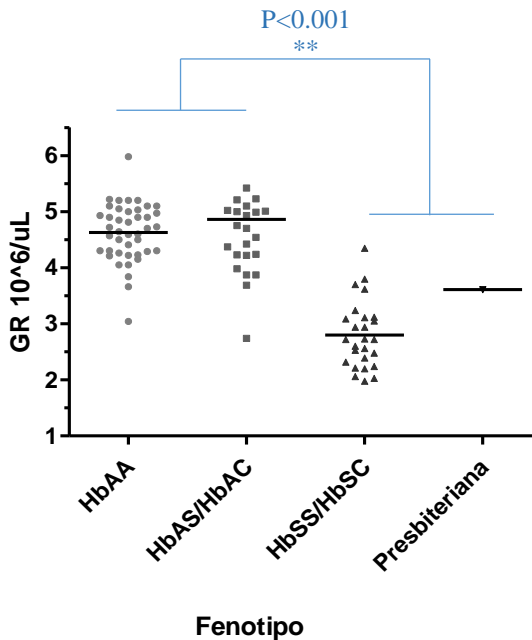


Gráfico 2. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es  $<0.001$  existe diferencia significativa. Fuente: Tabla 2

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

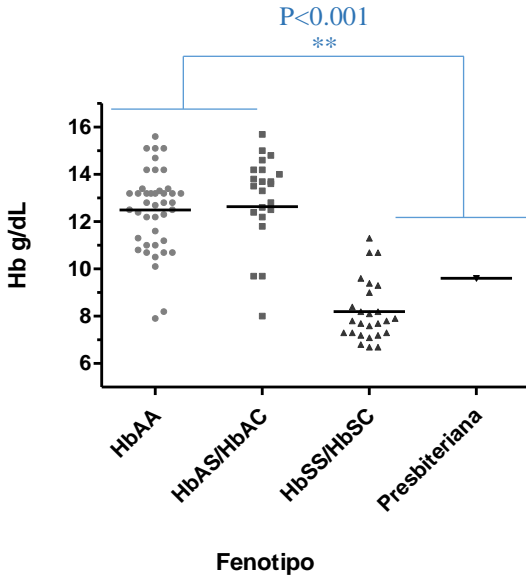
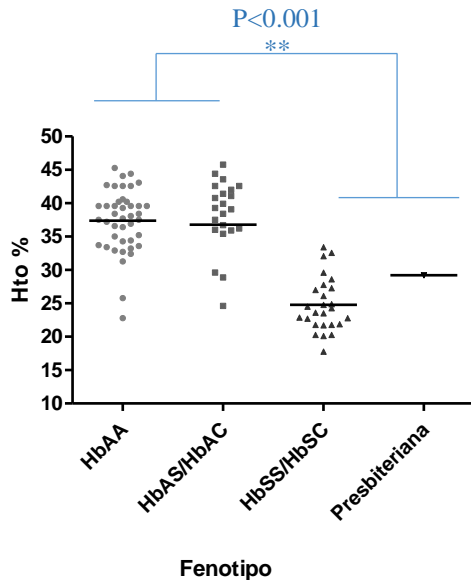


Gráfico 3. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es  $< 0.001$  existe diferencia significativa. Fuente: Tabla 3

Gráfico 4. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es  $< 0.001$  existe diferencia significativa. Fuente: Tabla 4



## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

Los gráficos reflejan la correlación de conteo de MCH (Grafico 5), MCHC (Grafico 6) y VCM (Grafico 7 ), con el fenotipo de hemoglobina encontrada de los pacientes en estudio, tomando como referencia los siguientes valores, MCH 27.0-34.0 pg, MCHC 32.0-36.0 g/dL, VCM 80.0-100.0 fL

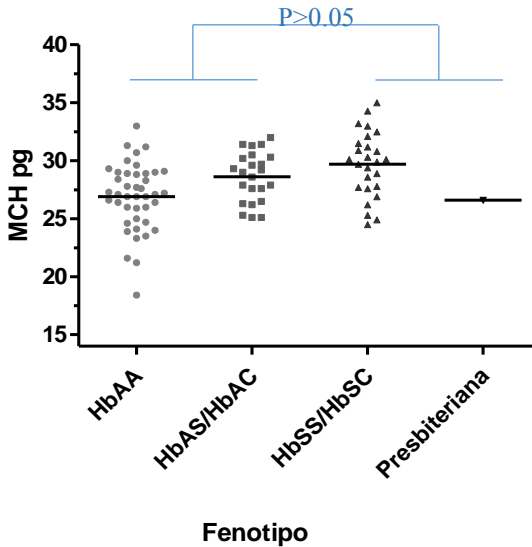


Gráfico 5. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es  $>0.05$  no existe diferencia significativa. Fuente: Tabla 5

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

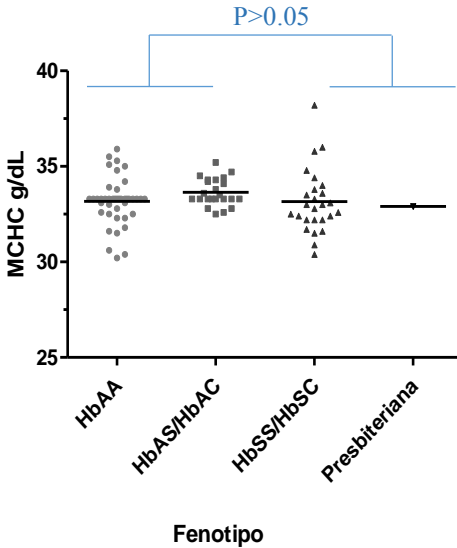
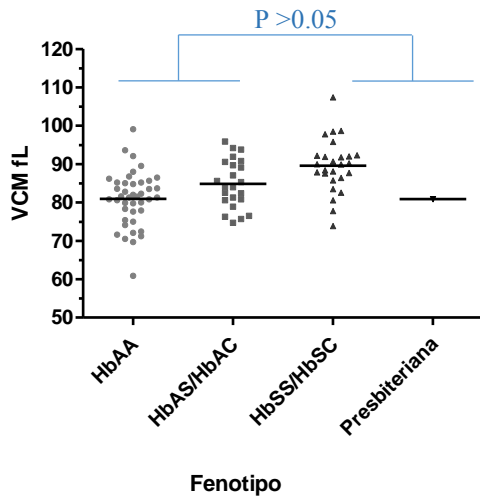


Gráfico 6. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es  $>0.05$  no existe diferencia significativa. Fuente: Tabla 6

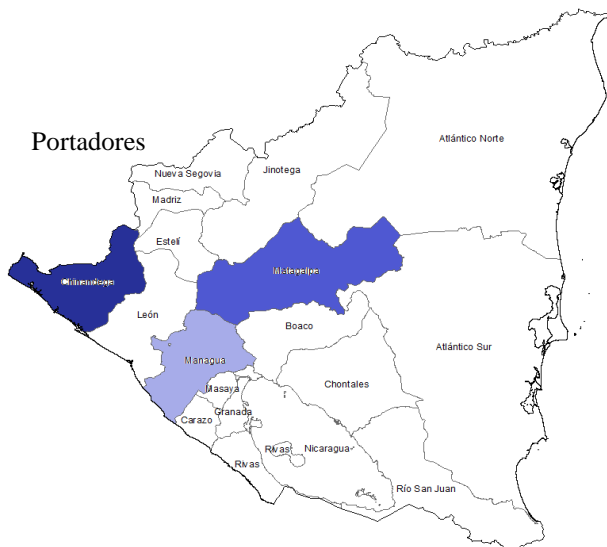
Gráfico 7. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es  $>0.05$  no existe diferencia significativa. Fuente: Tabla 7



### 9.3. Caracterización socio-demográfica de la prevalencia de hemoglobinopatías.

#### 9.3.1 Distribución demográfica.

Al distribuir demográficamente las hemoglobinas anormales encontradas, el siguiente mapa, refleja las zonas en donde se encontró presencia de portadores, tanto AS y AC, siendo Chinandega el departamento con mayor incidencia de dicha condición, con 12 casos, seguido de Matagalpa con 9 casos, Managua con 8 casos, Masaya, con 4 casos, León con 3 casos, Nueva Segovia y Río San Juan, presentando 1 caso respectivamente (Gráfico 8).

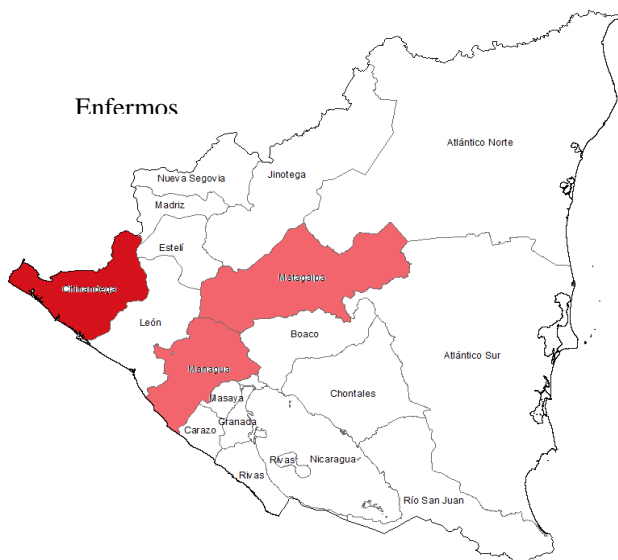


**Gráfico 8. Caracterización Demográfica. Se observa la distribución de las hemoglobinas AS/AC, según departamentos. Fuente: Tabla 8**



## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

Al distribuir demográficamente las hemoglobinas anormales encontradas, el siguiente mapa, refleja las zonas en donde se encontró presencia de pacientes enfermos, tanto SS y SC, siendo Chinandega el departamento con mayor incidencia con 9 casos, seguido de Matagalpa y Managua con 7 casos respectivamente, Rivas con 3 casos, Chontales con 2 casos, Masaya, Estelí y Granada con 1 caso, cada departamento (Gráfico 9).

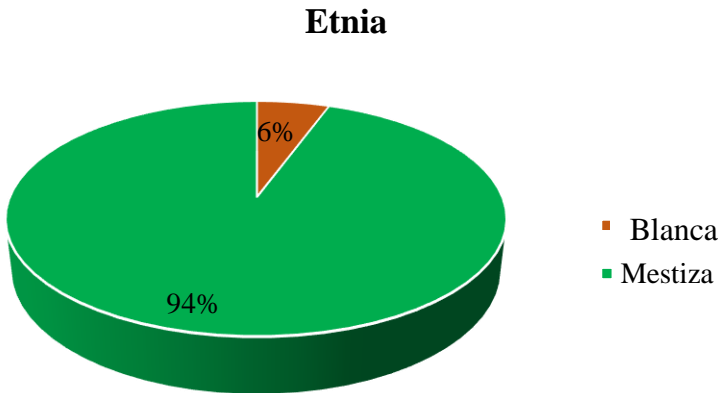


**Gráfico 9. Caracterización Demográfica. Se observa la distribución de las hemoglobinas SS/SC, según departamentos. Fuente: Tabla 8**

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

### 9.3.2 Prevalencia de las hemoglobinopatías según grupo étnico.

Tomando como referencia el total del universo muestreado, en los resultados se observó una mayor frecuencia de la etnia mestiza, con un 94% con los siguientes resultados de hemoglobina: AA 55 casos, para un 46%, AS/AC 34 casos, para un 29% y SS/SC 28 casos para un 24%, y Hba Presbiteriana 2 casos, para un 2%, seguido de la etnia blanca con un 6%, AA 2 casos, para un 29%, AS/AC 2 casos, para un 29% y SS/SC 3 casos, para un 43% y para la etnia negra no se analizó ningún paciente (Gráfico 10).

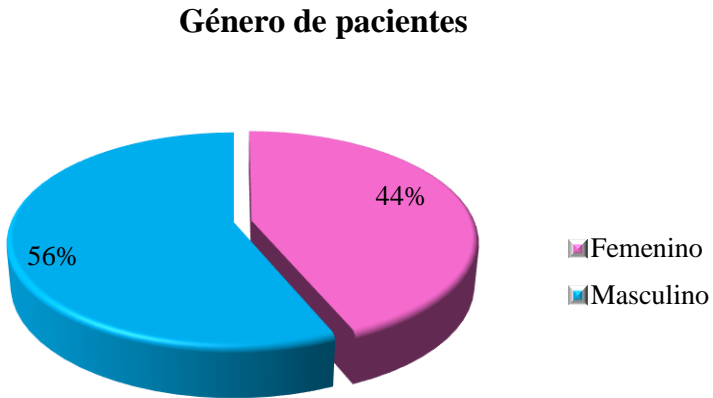


**Gráfico 10. Caracterización según grupo étnico. Se observa la distribución de las etnias, según la frecuencia. Fuente: Tabla 9**

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

### 9.3.3 Prevalencia de las hemoglobinopatías según sexo.

Se analizaron los datos según la variable sexo, obteniendo un predominio de la hemoglobina AA, 26 para el sexo femenino y 31 para el masculino, seguido de los portadores AS/AC con 19 casos de sexo femenino y 17 masculinos, el resto de hemoglobinas SS, SC, fueron encontradas en ambos sexos, 9 pacientes de sexo femenino y 22 del sexo masculino, para Hba Presbiteriana 1 caso tanto para el sexo femenino como para masculino. En los pacientes predomina el sexo masculino con un 56%, seguido del sexo femenino con un 44% (Gráfico 11).

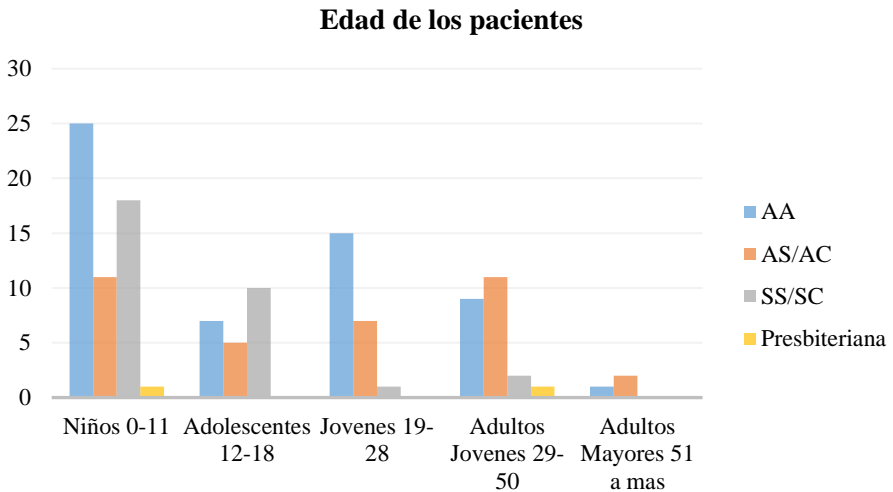


**Gráfico 11. Hemoglobinopatías según sexo. Se observa la distribución de las hemoglobinas, según sexo. Fuente: Tabla 10**

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

### 9.3.4 Prevalencia de las hemoglobinopatías según edad.

Se analizaron los datos según la variable edad, presentando un mayor porcentaje las edades entre 0-11, obteniendo 25 pacientes sanos, 12 pacientes portadores y 18 pacientes enfermos. En las edades entre 12-18, con 7 pacientes sanos, 5 pacientes portadores y 10 pacientes enfermos, dentro del rango 19-28, con 15 pacientes sanos, 7 pacientes portadores y 1 paciente enfermo, en las edades entre 29-50, con 9 pacientes sanos, 11 pacientes portadores y 0 pacientes enfermos, en los adultos mayores de 51 años, con 1 paciente sano, 2 pacientes portadores y no se encontró ninguna condición de enfermo (Gráfico 12).

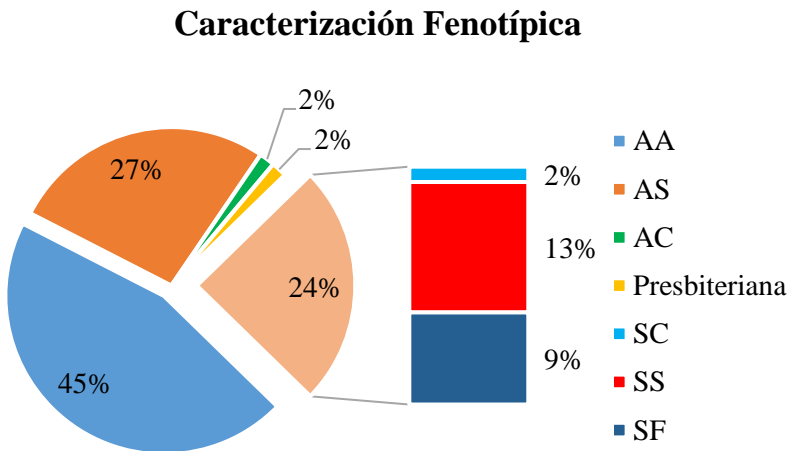


**Gráfico 12. Hemoglobinopatías según edad. Se observa la distribución de las hemoglobinas, según sexo. Fuente: Tabla 11**

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

### 9.4 Clasificación fenotípica de las hemoglobinas encontradas.

A través de la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa estandarizada por Villalobos, *et al.*, 2015 se logró clasificar fenotípicamente 45% de pacientes sanos, la presencia de portadores heterocigotos en un 30.2%, de los cuales 27% son heterocigotos AS, 2% heterocigotos AC y un 2% para hemoglobina Presbiteriana. Se obtuvo un 24% de los pacientes enfermos, lo que corresponde a un 13% drepanocíticos homocigotos SS, 9% drepanocíticos que presentaban hemoglobina fetal, y 2% presentaron síndrome doble heterocigoto SC, considerándose un trastorno menos grave que la drepanocitosis (Gráfico 6).



**Gráfico 13. Clasificación fenotípica. Se muestran el porcentaje de hemoglobinas según los resultados obtenidos de los pacientes analizados. Fuente: Tabla 12**

### **X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

#### **10.1. Confirmación del diagnóstico clínico.**

El presente estudio se realizó a pacientes que estaban clínicamente diagnosticados en los departamentos de Managua, Matagalpa y Chinandega, con el fin de realizarles la prueba de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa para confirmar la condición de anemia drepanocítica y dar a conocer la importancia de esta prueba en el diagnóstico de la anemia drepanocítica.

El diagnóstico de la anemia falciforme se basa en la identificación de la hemoglobina S. En su estado homocigoto, el cuadro clínico orienta a su diagnóstico, lo mismo que la biometría hemática y el frotis de sangre periférica. Sin embargo, el portador AS puede no ser diagnosticado hasta que se realicen otras pruebas de laboratorio como la Inducción de drepanocitos o 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 drepanocitosis.

Por medio de la electroforesis de hemoglobina realizada a 72 pacientes con diagnóstico clínico se confirmó la presencia de anemia drepanocítica en 31 individuos, 29 homocigotos SS y 2 doble heterocigoto SC.

Se excluyeron a 34 individuos que resultaron ser portadores del rasgo falciforme AS y 2 portadores de Hb AC (considerados como sanos) que si bien no presentan sintomatología de anemia drepanocítica, no están exentos de padecer otra patología que afecte su salud y al realizar test de falciformación será evidente la formación de drepanocitosis por la presencia de la hemoglobina S por lo que pueden incluirse dentro del grupo de pacientes con anemia drepanocítico erróneamente.

Se identificaron 3 pacientes con resultados de electroforesis de hemoglobina con patrón Hb AA (Hb normal), estos deberán seguir en estudio para identificar la patología que los afecta y así recibir el tratamiento adecuado para su condición.

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

Se destaca el hallazgo de una variante rara de hemoglobina que no se había descrito nunca antes en el país y que a nivel mundial solo existían 4 casos, el hallazgo se realizó en una niña con sospecha clínica de anemia y mediante esta técnica se identificó dicha variante lo que representa un alto beneficio para el diagnóstico y tratamiento adecuado para la paciente.

Este trabajo demuestra la importancia que tiene la técnica “electroforesis de hemoglobina” como la prueba de oro para realizar el diagnóstico eficaz de la anemia drepanocítica y otras hemoglobinopatías debido a que es una prueba altamente sensible para identificar las hemoglobinas presentes en el torrente sanguíneo mediante patrones conocidos así como para poder detectar sobre todo al portador de hemoglobina AS, brindarle consejería genética y darle seguimiento, recordando que estas personas desconocen totalmente su estado mientras no se realicen los estudios adecuados. (Gráfico 1)

### **10.2. Relación de los resultados con pruebas complementarias de la BHC.**

En los resultados del estudio reflejados en los gráficos 2, 3 y 4, no hay una diferencia significativa entre los valores de pacientes sanos y portadores; como lo refleja la literatura el estado de portador benigno sin manifestaciones hematológicas, los parámetros eritroides se encuentran normales (Cela, et al., 2010).

En el caso de los pacientes drepanocíticos (Hb SS), los pacientes doble heterocigotos (Hb SC) y Hb Presbiteriana con respecto a los pacientes sanos y portadores si existe diferencia significativa, se observan valores disminuidos para la Hb, GR y Hto. Las células no pueden cambiar de forma fácilmente, así que tienden a hemolizarse, por lo que la célula falciforme solo vive de 10, 20 días; por esta razón el cuerpo comienza a tener problemas en la producción de nuevos glóbulos rojos con la rapidez suficiente para reemplazar a los que mueren por lo que el número de glóbulos rojos es menor de lo normal.

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

En el caso de la hemoglobina, las células falciformes no son flexibles y se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos, causando una obstrucción que disminuye o detiene el flujo de sangre, cuando esto sucede el oxígeno no logra llegar a los tejidos, causando una disminución en el valor de la hemoglobina (National Heart, Lung, and Blood Institute. 2016).

En los resultados del estudio reflejados en los gráficos, 5, 6 y 7 no hay una diferencia significativa entre los valores de pacientes sanos, portadores y enfermos ya que en un estado de portador benigno (Hb AS/Hb AC), se reflejan parámetros eritroides, morfología e índices corpusculares normales (Cela, et al., 2010). La condición de portador es considerada como un paciente sano por lo que la presencia de la HbS o HbC no es causa de que presente una anemia.

En individuos con Hb SS la biometría hemática completa muestra una anemia normocítica o ligeramente macrocítica, la VCM y la HCM se hallan dentro de la normalidad, pero la deformabilidad eritrocitaria explica que en los equipos de hematología automáticos pueda observarse un falso aumento del VCM. En cualquiera de los casos el examen morfológico de la extensión de sangre muestra una proporción variable de eritrocitos falciformes (Vives Corrons, 2006).

En condición de doble heterocigoto (Hb SC) el VCM es menor que en la Hb SS, con promedio alrededor del límite inferior de la normalidad, HCM es similar y CHCM es más elevado a causa de un más alto porcentaje de células hiperdensas. (Cela, et al., 2010)

### **10.3. Caracterización socio-demográfica de la prevalencia de hemoglobinopatías.**

#### **10.3.1 Distribución demográfica**

En el continente americano, la presencia de hemoglobinas anormales es producto de la inmigración y entrecruzamiento de diversas poblaciones europeas y africanas con los grupos amerindios residentes, provocando una mezcla racial con la introducción de mutaciones en el gen de la hemoglobina (Sáenz, 2005).



## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

En este estudio los datos demuestran que la población estudiada exhibe 2 importantes mutaciones en su molécula de hemoglobina presentando características fenotípicas de hemoglobina S y hemoglobina C, dando así, a pacientes portadores tanto AS como AC y pacientes enfermos drepanocíticos SS y doble heterocigoto SC.

Si bien se observa una distribución de los fenotipos en los distintos departamentos, dado que fueron pacientes captados en el Hospital infantil Manuel de Jesús Rivera La Mascota, y fueron clasificados según su lugar de nacimiento, así mismo se coordinó un muestreo con el hospital de Matagalpa, y Chinandega, se trató de coordinar muestreos en otras cabeceras departamentales, pero debido a que no existe o no llevan un debido registro de los pacientes diagnosticados con anemia drepanocítica, no se logró acceder a estos.

Según los datos obtenidos, la mayor frecuencia de fenotipos se observa en el departamento de Chinandega, tanto para pacientes portadores, como para pacientes enfermos, seguido de Managua donde hay igual proporción de pacientes enfermos que en Matagalpa, pero la frecuencia de pacientes portadores varía, esto se debe a que en Matagalpa hubo acceso a los familiares de los pacientes con diagnóstico o sintomatología clínica, no así para los demás departamentos, ya que se observa cierta discrepancia en cuanto a la presencia de pacientes portadores AS y pacientes homocigotos SS (Gráfico 8 y 9), tal es el caso del departamento Managua al cual no se pudo tener acceso a los familiares de los pacientes.

En Matagalpa, resultó una familia con Síndrome drepanocítico, esto dado a que la madre es portadora para AC y el padre para AS, teniendo un hijo doble heterocigoto para SC, y otro hijo portador AC. (Gráfico 8 y 9)

En el departamento de Managua durante el estudio se realizó el hallazgo de una variante rara de hemoglobina en una paciente atendida en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera La Mascota, cuyo diagnóstico era desconocido para los médicos, al realizar el estudio, en colaboración de la Universidad de Costa Rica y la Universidad de Boston para realizar HPLC y

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

secuenciación del gen  $\beta$ -globin, se encontró que el papá es también portador de esta variante llamada Hemoglobina Presbiteriana, siendo éste, el quinto caso reportado a nivel mundial, obteniendo de ésta un artículo científico que se ha publicado en la revista Hemoglobyn. (Anexo 2)

### **10.3.2 Prevalencia de las hemoglobinopatías según grupo étnico.**

En América las hemoglobinas anormales se encuentran fundamentalmente en raza negra y en poblaciones híbridas, como marcadores indelebles del origen africano de sus ancestros (River, et al., 1961).

Nicaragua es un país multiétnico, pluricultural y multilingüe, cuenta con una variedad de pueblos indígenas y afro-descendientes, esas poblaciones se encuentran ubicadas en la costa Caribe, Pacífico y Centro Norte del país. La mayoría de los nicaragüenses son mestizos, por otra parte, existe una porción de población de origen europeo, principalmente español. Además de los dos grupos anteriores existe una parte pequeña de población negra (costa Caribe) e indígena. Tanto en la Nicaragua del Pacífico como en la del centro, hubo una importante presencia negra que dejó una huella profunda en la formación étnica colonial (Romero, 1993).

La anemia drepanocítica fue una enfermedad ligada a la etnia, debido a los cruces de raza ésta enfermedad se ha diseminado ampliamente alrededor del mundo. Es importante mencionar que en éste estudio la mayor parte de la población investigada era de raza mestiza, ya que Nicaragua es un país con una población étnica muy variada, sin embargo la literatura refiere predominio en las personas de raza negra o su descendencia. (Gráfico 10)

### **10.3.3 Prevalencia de las hemoglobinopatías según sexo.**

El sexo no es una variable que influya en la frecuencia y/o prevalencia de este padecimiento, dado que no es una enfermedad ligada al sexo. Se considera que la anemia drepanocítica es una enfermedad de herencia autosómica recesiva, autosómica significa que el gen está en uno de los primeros 22 pares de cromosomas que no determina el género, por lo que la enfermedad afecta por igual a hombres y mujeres (INFOGEN, 2016).

## ***Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas***

Se encontró un predominio del sexo masculino, tanto para pacientes sanos, portadores, como para paciente enfermos, ya que se muestrearon más pacientes del sexo masculino, que del sexo femenino. (Grafico11)

### **10.3.4 Prevalencia de las hemoglobinopatías según edad.**

La distribución de la población por edad es importante para el diagnóstico de la enfermedad y su pronóstico, se considera que la enfermedad se manifiesta en la infancia. La mayoría de personas con anemia drepanocítica son diagnosticadas entre el primer y tercer año de vida, es decir después que la hemoglobina fetal alcanza los niveles de la vida adulta. Al perderse el efecto protector de la hemoglobina, aparecen los primeros síntomas de esta enfermedad (Pila, et al., 2002).

Es importante considerar que la esperanza de vida de las personas con anemia drepanocítica ha mejorado desde 1960. En 1973 estudios realizados post mortem por Platt, 1994, revelaron que, el 20% de las muertes se producían en los primeros 2 años de vida, un 33% ocurría antes del quinto año, el 50% entre los 5 a 30 años y 17% después de la edad de 30 años. Estudios posteriores mostraron que el 85% sobrevivieron los 20 años (Platt, et al., 1994).

Tanto el diagnóstico prenatal como al momento del nacimiento permite la atención integral de la persona desde muy temprano en la vida e incluye la orientación y educación a sus familiares para lograr una mayor sobrevivencia e incorporación plena a la sociedad (Losada, et al., 2006). (Grafico 12)

### **10.4 Clasificación fenotípica de las hemoglobinas encontrada.**

En la muestra analizada se encontró 30.2% de portadores (si bien no son personas enferma), son estos los que perpetúan la enfermedad, al relacionarse con otros portadores tienen un 25% de probabilidad de que sus hijos sean enfermos.

La importancia del diagnóstico oportuno de las hemoglobinopatías radica en prevenir la propagación de dichos síndromes y el tratamiento de la enfermedad. Los diagnósticos presuntivos acompañados por datos clínicos

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

sugestivos solo pueden ser confirmados por una prueba electroforética, esto nos reflejan la importancia de utilizar esta técnica, dentro de los centros hospitalarios para que los pacientes reciban la atención adecuada a su enfermedad.

Con base a los resultados obtenidos podemos enfatizar en hacer de la electroforesis de hemoglobina la técnica indicada para llevar a cabo el diagnóstico definitivo de las hemoglobinas anormales en el país. Así mismo se realizó el hallazgo de una variante de Hemoglobina Presbiteriana, hasta ese momento desconocida en el país.

Con respecto al gran número de pacientes con HbAA es porque el muestreo incluyó también a los familiares de los pacientes los que en su mayoría eran personas con una hemoglobina normal, a excepción de los padres de los pacientes drepanocíticos los que en eran portadores, la importancia de realizar el muestreo a los familiares como refiere la literatura, es que en cualquier caso, cuando se requiera un diagnóstico preciso (consejo genético), es imprescindible realizar análisis (electroforesis de hemoglobina) y estudio de los progenitores (Cela, et al., 2010). (Gráfico 13)

### **XI. CONCLUSIONES**

1. El diagnóstico de la anemia falciforme se basa en la identificación de la hemoglobina S. En su estado homocigoto, el cuadro clínico orienta a su diagnóstico, lo mismo que la BHC y el frotis de sangre periférica. Por medio de la técnica electroforesis de hemoglobina realizada a 72 pacientes con diagnóstico clínico se confirmó la presencia de anemia drepanocítica en 31 individuos, 29 homocigotos SS y 2 doble heterocigoto SC.
2. En relación a los parámetros de la biometría hemática completa entre los pacientes sanos y portadores con respecto a los pacientes drepanocíticos (SS), doble heterocigoto (SC) y Hba Presbiteriana, hay una diferencia significativa en el conteo de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito dado que se observa una disminución debido a la destrucción temprana de las células, más no se encontró diferencia significativa en los índices corpusculares.
3. La caracterización demográfica se realizó en 3 departamentos, pero la muestra obtenida no es suficiente para poder determinar la prevalencia de las hemoglobinas anormales en el país en el cual se encontró un predominio en la etnia mestiza, seguida de un pequeño porcentaje de población blanca, es importante recalcar que el estudio abarco en su mayoría pacientes mestizos. El sexo no es un factor predisponentes para padecer esta condición sin embargo se obtuvo un predominio del sexo masculino, ya que se muestrearon más pacientes de este sexo. La edad predominante es entre 0 - 11, ya que es a temprana edad que la enfermedad se manifiesta, el estudio estuvo conformado por pacientes menores de 18 años.
4. Se clasificó fenotípicamente a los pacientes en estudio, de estos se obtuvo la presencia de portadores heterocigotos en un 31%, de los cuales 27% son heterocigotos AS, 2% heterocigotos AC y 2% Hb presbiteriana. Se confirmó un 24% de los pacientes clínicamente enfermos, lo que corresponde a un 13% drepanocíticos homocigotos SS, 9% drepanocíticos que presentaban hemoglobina fetal, y 2% presentaron síndrome doble heterocigoto SC.

### **XII. RECOMENDACIONES**

- Al MINSA apoyar proyectos que estudien las hemoglobinopatías en el país para beneficio de la población en general.
- Al Hospital Manuel de Jesús Rivera "La Mascota" implementar la Técnica de Electroforesis en Acetato de Celulosa, como método diagnóstico para la anemia drepanocítica y otras hemoglobinopatías, brindándoles el tratamiento adecuado.
- A las unidades de salud llevar el debido control y estadística de los pacientes con anemia drepanocítica para promover proyectos y facilitar la coordinación de los mismos.
- Al departamento de Bioanálisis Clínico seguir promoviendo investigaciones científicas enfocadas en el diagnóstico de estas enfermedades para poder conocer y brindar asesoramiento genético sobre las mismas.
- A los estudiantes en curso, dar continuación al estudio de la presencia del gen causante de anemia de células falciforme a fin de conocer la magnitud del trastorno y determinar la prevalencia a nivel nacional, tomando como base los resultados aquí obtenidos y de esta manera beneficiar enormemente a la población Nicaragüense.

### **XIII. REFERENCIAS**

- Álvarez-Guerra, E. D., & Fernández-García, A. (2007). La anemia de hematíes falciformes: investigaciones para el diagnóstico y tratamiento. (4), 1-11.
- Araújo, J., Batissoco, A., & Bodemeir, L. (1999). "In vivo" and "in vitro" demonstration of hemoglobin C crystals in non-splenectomized patients. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*; 41(4).
- Araujo, J., Ribeiro, V., Araujo. (1964). Aspectos Moleculares, Genéticos y Clínicos *Rev. Hosp. Clin. Fac.Medicina. S. Paulo*; 42: 260-266.
- Ballas, S., Lewis, C., Noone, A., Krasnow, S., Kamarulzaman, E., Burka, E. (1982). Clinical, Hematological, and Biochemical Features of Hb SC Disease. *Am J Hematol*; 13(1):37-51.
- Beutler, E. (2006). Disorders of hemoglobin structure: Sickle cell anemia and related abnormalities. Lichtman, M.A. *Williams Hematology*. Septima edicion. Editorial Macgraw-Hill medical.
- Beutler, E. (2008). Enfermedades de las Celulas Falciformes y Trastornos Relacionados. En M. Beutler, M. Kipps, M. Collier, M. Seligsohn, & M. Leihman, *Hematologia de Williams*. 581-603.
- Bonaventura, J. and Riggs, A. F. (1968) *J. Biol. Chem*: 243,980-991.
- Brandan, N., Aguirre, M., Gimenez, C. (2008). Hemoglobina. Facultad de medicina UNNE. Pp: 8.  
[https://docs.moodle.org/all/es/images\\_es/5/5b/Hemoglobina.pdf](https://docs.moodle.org/all/es/images_es/5/5b/Hemoglobina.pdf)
- Bunn, F., Forget, B.G. Ranney, H.M. *Hemoglobinopathies*. W.B. Saunders Co. New York, 1977; 28-94.

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

- Bunn, H., Noguchi, C., Hofrichter, J., Schechter, G., Schechter, A., Eaton, W. (1982). Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. *Proc Natl Acad Sci*;79(23):527-31.
- Cela, E., Cervera, A., Rives, S., Gonzalez, A. (2010) Guía de práctica clínica sobre la enfermedad de células falciformes pediátrica. Sociedad Española de Hematología y oncología pediátricas. <http://www.sehop.org/>
- Ferguson, D., Sánchez, E., & Rojo, J. (Jul-Sep de 2003). Prevalencia de Hemoglobina AS en una población de adolescentes en Panamá. *Revista Médica del Hospital General de Mexico*, Vol. 66(3), 136-141.
- García, R. (2002) Cromatografía. Instituto de biotecnología UNAM. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>
- Holstein, D. (2011). Rasgo de célula falciforme y Anemia de célula falciforme. Colorado Sickle Cell Treatment & Research Center Newborn Screening Follow-up Program. <http://www.ucdenver.edu/academics/colleges/medicalschool/centers/sicklecell/Pages/Home.aspx>
- INFOGEN. (11 de abril de 2016). Defectos al nacer. Anemia drepanocítica o enfermedad de células falciformes. INFOGEN. [www.infofen.org.mx](http://www.infofen.org.mx).
- Kyle Mack, A., & Kato, G. (2006). Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol.*, 38(8), 1237–1243.
- Lanzkowsky P. *Pediatric Hematology and Oncology*. California: Academic Press. 1999.
- Losada Buchillon R, Bravo Cortada I, Charles K, Capildeo K, Agramonte O, Silva J. Pacientes con drepanocitosis y edad avanzada en Trinidad y Tobago. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2006;22(2).



## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

- McKenzie, P. (2000). *Hematología Clínica* (2da ed.). Baltimore: El Manual Moderno, S.A. de C.V.
- Moo-Penn, W., Wolff, J., Simon, G., Vacek, M., Jue, D., Johnson, M. (1978). Hemoglobin Presbyterian:  $\beta 108$  (G10) Asparagine  $\rightarrow$  Lysine. A Hemoglobin Variant With Low Oxygen Affinity. *Febs Letters*: 92(1)
- Morris C., Kuypers F., Larkin S. et al. Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* 111:498, 2000.
- Nagel R, Steinberg M. (2001) Hemoglobin SC Disease and HbC Disorders. In: Steinberg M, Forget B, Higgs D, Nagel R. *Disorders of Hemoglobin. Genetic, Pathophysiology, and Clinical Management.* Cambridge University Press, New York, 756-766.
- National Heart, Lung, and blood institute. (2 de agosto de 2016). Recuperado el 2016, de <https://www.nhlbi.nih.gov/health-spanish/health-topics/temas/sca>.
- Pila Pérez R, Pila Peláez R, Gabriel O, Herere R, Tamakloe K. Anemia de células falciformes: Estudio comparativo en Cuba y Santa Lucia. *Rev Archivo Médico de Camaguey.* 2002;6
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. La mortalidad en la enfermedad de células falciformes. Esperanza de vida y factores de riesgo de muerte prematura. *N Engl J Med* . 1994;330(23):1639-1644.
- Quintero, M., & Jimenez Hernandez, A. (2012). Anemia de células falciformes. *Revista Gastrohup*, 14(2), S27-S35.
- Restrepo, A. et al. (1992). *Fundamentos de Medicina. Hematología.* Editorial. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín. Colombia. Pag. 97-101.

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

- River, G., Robbins, A., & Schwartz, S. (1961). S-C Hemoglobin: A Clinical Study. *Blood*; 18(4), 385-416.
- Rodriguez, J.M. (1998) Medicina al día. Avances sobre Anemia Falciforme. *Acta Medica Dominicana*, 20 (6) <http://www.bvs.org.do/avance.htm>
- Romero, G. (1993). La población de origen africano en Nicaragua. Presencia africana en Centroamerica. Primer edición. Mexico; 151-197.
- Saenz R., Saenz G., Muñoz C., Chaves. (1984) Enfermedad homocigota por hemoglobina C. Primer reporte nacional. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños Costa Rica*, 19 (2). 25 – 30.
- Sáenz, G., Rodríguez W. (2003). Hemoglobinopatía clínica. En Sáenz G. F. *Hematología Analítica. Tomo I, cuarta edición*. Editorial EDNASSS, Costa Rica.
- Sáenz, G., Rodríguez W. (2003). Hemoglobinopatía clínica. En Sáenz G. F. *Hematología Analítica. Tomo II, cuarta edición*. Editorial EDNASSS, Costa Rica.
- Sáenz, G., Ramírez, V., & Chaves, M. (1982). Enfermedad por hemoglobina SC y patología ocular. *Act. Méd. Costo*; 25(3), 249-254.
- Sans-Sabrafen, J., Besses Raebel, C., & Vives Corrons, J. (2007). *Hematología Clínica (Vol. 5ta)*. Barcelona, España: Graficas Murial, S.A.
- Serjeant, G., Ashcroft, M. & Serjeant, R. (1973). The clinical features of haemoglobin SC disease in Jamaica. *Brit. J. Haemat*; 24:491.
- Sutcharitchan, P; Ong, H Fucharoen, S. et al . (1996). El primer informe de la Hb enfermedad CE: consideraciones de diagnóstico que plantea un

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

gen extraviado. En: Congreso de la Sociedad Internacional de Hematología, 26, Singapur, 1996. (Int J. Haemat, 64 (1)

Vives Corrons, J. (2006). Defectos Congénitos de la Hemoglobina. Hemoglobinopatías estructurales. En J. Sans-Sabrafen, C. Besses Raebel, & J. L. Vives Corrons, Hematología Clínica (págs. 183-201).

Weatherall, D. (2010). The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. Blood; 115(22):4331-6

Williams, W., Beutler, E., Erslev, A., Lichtman, Ma - Hematología . 4. ed. New York, McGraw-Hill, 1990. p. 314.

## XIV.ANEXOS

### Anexo 1. Tablas

**Tabla 1. Confirmación de diagnóstico clínico**

Patrón	Porcentaje	Frecuencia
<b>Total</b>	100%	72
SS/SC/SF	43%	31
AA/AS/AC/Pres	57%	41

**Relación de los resultados con las pruebas complementarias de la Biometría Hemática Completa**

**Tabla 2 Relación patrón – hemoglobina**

Patrón	HB valor			Total
	< 11.0	11.0-16.0	> 16.0	
AA	10	13	0	23
AS/AC	3	13	0	16
SS/SC	32	1	0	33
<b>Total</b>	38	27	0	72

**Fuente Bitácora**

**Tabla 3 Relación patrón – recuento GR**

Patrón	RGC			Total
	< 3.50	3.50-5.50	>5.50	
AA	1	21	1	23
AS/AC	1	15	0	16
SS/SC	28	5	0	33
<b>Total</b>	23	41	1	72

**Fuente Bitácora**

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

**Tabla 4 Relación patrón - hematocrito** Fuente Bitácora

Patrón	HCT valor			Total
	< 37.0	37.0-46.0	> 46.0	
AA	15	9	0	24
AS/AC	7	9	0	15
SS/SC	34	0	0	34
<b>Total</b>	48	18	0	72

**Tabla 5 Relación patrón - VCM** Fuente Bitácora

Patrón	MCVvalor			Total
	< 80.0	80.0-100.0	> 100.0	
AA	12	11	0	23
AS/AC	6	13	0	19
SS/SC	4	26	1	31
<b>Total</b>	22	42	1	72

**Tabla 6 Relación patrón - HCM** Fuente Bitácora

Patrón	MCH valor			Total
	< 27.0	27.0-34.0	> 34.0	
AA	13	9	1	23
AS/AC	5	13	1	19
SS/SC	5	22	4	31
<b>Total</b>	23	36	6	65

**Tabla 7 Relación patrón - CHCM** Fuente Bitácora

Patrón	Valor MCHC			Total
	< 32.0	32.0-36.0	> 36.0	
AA	6	17	0	23
AS/AC	0	19	0	19
SS/SC	5	25	1	31
<b>Total</b>	11	53	1	65

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

Tabla 8. Distribución Demográfica

		Frecuencia Portadores	% Portadores	Frecuencia Pacientes SS/SC	% Pacientes SS/SC	Total
Procedencia	Managua	8	21%	7	23%	15
	Granada	0	0%	1	3%	1
	Masaya	4	11%	0	0%	4
	Estelí	0	0%	1	3%	1
	Nueva Guinea	0	0%	1	3%	1
	Rivas	0	0%	3	10%	3
	Boaco	0	0%	0	0%	0
	Chinandega	12	32%	9	29%	21
	León	3	8%	0	0%	3
	Rio San Juan	1	3%	0	0%	1
	Chontales	0	0%	2	6%	2
	Carazo	0	0%	0	0%	0
	Matagalpa	9	24%	7	23%	16
	Nueva Segovia	1	3%	0	0%	1
	Jinotega	0	0%	0	0%	0
	RAAN	0	0%	0	0%	0
	Honduras	0	0%	0	0%	0
	<b>Total</b>	38	100%	31	100%	69

Fuente Bitácora

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

**Tabla 9 Prevalencia según grupo étnico**

Etnia	Frecuencia	Porcentaje
Blanco	7	6%
Mestiza	119	94%
<b>Total</b>	126	100%

Fuente Bitácora

**Tabla 10 Prevalencia según sexo**

Sexo	Frecuencia	Porcentaje
Femenino	55	44%
Masculino	71	56%
<b>Total</b>	126	100%

Fuente Bitácora

**Tabla 11 Prevalencia según edad**

Patrón	Edad de los pacientes (agrupado)					Total
	Niños 0-11	Adolescentes 12-18	Jóvenes 19-28	Adultos Jóvenes 29-50	Adultos Mayores 51 a mas	
AA	25	7	15	9	1	57
AS/AC	11	5	7	11	2	36
SS/SC	18	10	1	2	0	31
Presbiteriana	1	0	0	1	0	2
<b>Total</b>	55	22	23	23	3	126

Fuente Bitácora

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

**Tabla 11** Clasificación fenotípica de las hemoglobinas encontradas

<b>Hemoglobinas Fenotipo</b>		
<b>Patrón</b>	Frecuencia	Porcentaje
<b>AA</b>	57	45.2 %
<b>AS</b>	34	27.0 %
<b>AC</b>	2	1.6 %
<b>Pres</b>	2	1.6 %
<b>SC</b>	2	1.6 %
<b>SS</b>	17	13.5 %
<b>SF</b>	12	9.5 %
<b>Total</b>	126	100.0 %

**Fuente Bitácora**



# Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

## Anexo 2. Artículo

### Hemoglobin



### Hemoglobin Presbyterian HBB:c.327C>G in a Nicaraguan Family.

Journal:	<i>Hemoglobin</i>
Manuscript ID	LHEM-2016-0197.R1
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	09-Feb-2017
Complete List of Authors:	Pernudy, Allan; Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua, Polytechnic Institute of Health, Clinical Bioanalysis Salinas-Molina, Jaslyn; Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua, Polytechnic Institute of Health, Clinical Bioanalysis Requenez, Yaneris; Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua, Polytechnic Institute of Health, Clinical Bioanalysis Ortiz-López, Mariana; Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua Puller, Ann-Christin; Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua, Polytechnic Institute of Health, Clinical Bioanalysis García-Rosales, Kenia; Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua, Polytechnic Institute of Health, Clinical Bioanalysis Rodríguez-Estrada, Anaishelle; Children's Hospital Manuel de Jesus Rivera, Hematology/Oncology Rodríguez, Walter; Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Hematology Section Mejía-Baltodano, Gerardo; Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua, Central Laboratory of Health Lou, Hong-Yuan; Boston University School of Medicine, Pathology & Laboratory Medicine Chui, David; Boston University School of Medicine, Medicine
Keywords:	Hemoglobin Presbyterian, DNA sequencing, Unstable hemoglobin

**Hemoglobin Presbyterian HBB:c.327C>G in a Nicaraguan Family.**

Allan Pernudi-Ubau<sup>1</sup>, Jaslyn Salinas-Molina<sup>1</sup>, Yaneris Requenez<sup>1</sup>

Marianela Ortiz-Lopez<sup>1</sup>, Ann-Christin Puller<sup>1</sup>, Kenia Garcia-Rosales<sup>1</sup>

Anaishelle Rodriguez-Estrada<sup>2</sup>, Walter Rodriguez-Romero<sup>3</sup>, Gerardo

Mejia-Baltodano<sup>4</sup>, Hong-Yuan Luo<sup>5</sup>, David H.K. Chui<sup>5</sup>

<sup>1</sup> *Molecular Biology laboratory "MA. Elmer Cisneros in memoriam", Polytechnic Institute of Health, National Autonomous University of Nicaragua UNAN-Managua, Nicaragua.* <sup>2</sup> *Department of Hematology/Oncology Children's Hospital Manuel de Jesus Rivera, Managua, Nicaragua.* <sup>3</sup> *Faculty of Microbiology, Clinical Analysis Department, Section of Hematology, University of Costa Rica, Costa Rica.* <sup>4</sup> *Central Laboratory of Health, National Autonomous University of Nicaragua, UNAN-Managua, Nicaragua.* <sup>5</sup> *Department of Medicine and Hemoglobin Diagnostic Reference Laboratory, Boston University School of Medicine, USA*

**Corresponding author:** Allan Pernudi Ubau: [pernudi@gmail.com](mailto:pernudi@gmail.com)

Telephone : +505 8962-0874

Fax number: +505 2277-4943

**Abstract**

Hemoglobin (Hb) is the protein responsible for oxygen transportation. It is a tetrameric protein comprising two  $\alpha$ - and two  $\beta$ -globin subunits. In the literature, a large number of mutations in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin genes have been documented. Among these mutations, Hb Presbyterian (*HBB*:c.327C>G) is a naturally occurring mutant exerting low oxygen affinity. C to G exchange (AAC>AAG) in codon 108 of the  $\beta$ -globin gene ( $\beta$ 108) results in the substitution of asparagine (Asn) by lysine (Lys). Here, we document the identification of *HBB*:c.327C>G in a 6-year-old female patient and her father from Nicaragua and Cuba, respectively. Presence of the abnormal hemoglobin was confirmed by cellulose acetate electrophoresis, HPLC and genomic DNA sequencing. The  $\beta$ -globin gene sequences for both, father and daughter, disclosed the heterozygous mutation in codon 108 for *HBB*:c.327C>G. The mutant hemoglobin has been previously reported for four families from North America, Germany, Japan, and Spain. This is the fifth family with *HBB*:c.327C>G described to date and the first report in Latin America.

**Keywords:** Hemoglobin Presbyterian; Unstable hemoglobin; DNA sequencing

1  
2  
3 Hemoglobin (Hb) is a tetrameric heme-containing protein comprising of two  $\alpha$ - and two  
4  $\beta$ -globin chain subunits. There are now more than 1,200 known variant hemoglobins  
5 [1]. Most have normal functions for oxygen binding and delivery. There are ~150  
6 variant hemoglobins with either high or low oxygen affinity, and another ~150 unstable  
7 variant hemoglobins. We now report a Nicaraguan family in whom the father and his 6-  
8 year old daughter are carriers of Hb Presbyterian, an unstable variant hemoglobin with  
9 low oxygen affinity.  
10

11  
12  
13  
14  
15  
16 A 6-year old girl was well and found to have hypochromic microcytic anemia. She was  
17 treated with iron and folate supplements for 2 years, but no transfusions. In 2016, she  
18 presented with anemia and pale to yellowish skin coloration, fatigue, exhaustion and  
19 tachycardia, frequent perspiration and constant headache. Her blood count results were  
20 Hb 9.6g/dl, RBC  $3.6 \times 10^6/\mu\text{l}$ , WBC  $6.8 \times 10^3/\mu\text{l}$ , MCV 81fl, MCH 27pg, MCHC  
21 33g/dl, platelets  $357 \times 10^3/\mu\text{l}$ .  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28 A family study was undertaken. Her mother was well. Her father, a 28-year old man of  
29 Cuban descent was also clinically well, but had a borderline low Hb level (12.2g/dl).  
30 Hemoglobin analysis by alkaline cellulose acetate electrophoresis was done (Fig. 1). A  
31 variant hemoglobin fraction migrating near HbA between HbA and HbS was found in  
32 the father and his 6-year old daughter, but neither in the mother nor their son.  
33  
34  
35  
36  
37

38 Hemoglobin analysis by cation high-performance liquid chromatography (HPLC) was  
39 carried out on both the father and his daughter. Fig. 2 shows the chromatogram on the  
40 father's hemolysate.  
41  
42  
43  
44

45 Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. The  $\beta$ -globin genes  
46 were sequenced. Both the father and his daughter were carriers of Hb Presbyterian,  $\beta$   
47 codon 108 AAC>AAG or Asparagine108Lysine; *HBB*:c.327C>G (Fig. 3). The mother  
48 and their son did not have any  $\beta$ -globin gene mutation. All 4 family members did not  
49 have  $\alpha$ -globin gene deletions (data not shown).  
50  
51  
52  
53  
54

55 Hb Presbyterian has been previously reported in four families from North America,  
56 Germany, Japan, and Spain [2-5]. We now document the identification of the same  
57  
58  
59  
60

variant hemoglobin in a 6-year-old girl and her father from Nicaragua with Mestizo descent.

The AAC>AAG mutation in  $\beta$  codon 108 results in the substitution of asparagine by lysine, i.e., the tenth residue of the *G helix* in the  $\beta$ -globin chain (G10) [2,6,7]. Asparagine in  $\beta$ -globin codon 108 is a constituent of the central cavity and is linked by hydrogen bonding to histidine in  $\alpha$ -globin codon 103 thereby conferring the  $\alpha_1\beta_1$  contact [8]. This contact is necessary for maintaining the stability of the Hb molecule [9]. Disruption of the hydrogen bond between  $\beta$ 108 Asn and  $\alpha$ 103 His weakens the  $\alpha_1\beta_1$  contact, destabilizes the oxy state while favors the deoxy-formation, thus leading to lower oxygen affinity in Hb Presbyterian [2].

Mice engineered to be homozygous for the Hb Presbyterian mutation had hemolytic anemia, while heterozygous mice had 30% Hb Presbyterian but without significant hematological abnormalities. In the current report, the proband and her father had 23% and 24% Hb Presbyterian respectively, considerably less than that of a stable variant  $\beta$ -globin hemoglobin. Furthermore, a flocculent precipitate was detected in a heat stability test on the propositus' hemolysate (data not shown). Taken together, these findings are consistent with Hb Presbyterian being a relatively unstable variant hemoglobin. Using the Hb Presbyterian mouse experimental model, researchers were also able to demonstrate enhanced oxygen delivery and tissue oxygenation in increased physical exercise despite mild anemia [10], further confirming that Hb Presbyterian is a variant hemoglobin with decreased oxygen affinity. Correspondingly, p50 of the propositus' blood was determined by using a blood gas analyzer (Nova-biomedical) and found to be 31.1 mm Hg which is increased compared to the normal range of 25-29 mmHg. The mutant hemoglobin has been previously reported only for four families. This is the fifth family with *HBB:c.327C>G* described to date and the first report in Latin America.

#### Acknowledgments

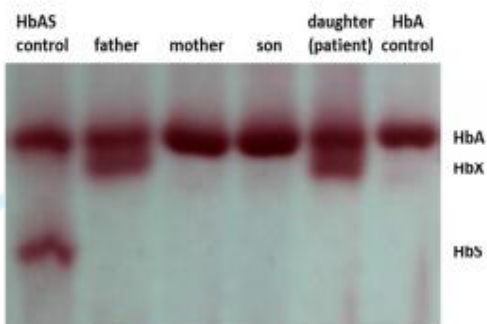
This study was supported in part by a grant from *Fondos para proyectos de Investigación (FPI)*, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. UNAN-Managua

#### References:

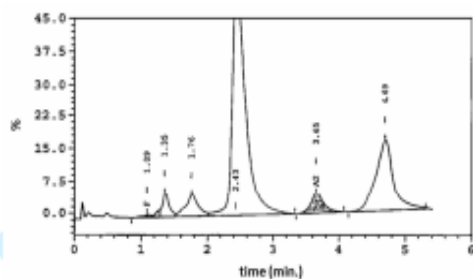
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1. G.P. Patrinos , B. Giardine, C. Riemer, W. Miller, D.H.K. Chui, N.P. Anagnou, H. Wajzman, R.C. Hardison, *Nucleic Acids Research* 32(Database issue): D537-D541 (2004).
2. W.F. Moo-Penn, J.A. Wolff, G. Simon, M. Vacek, D.L. Jue and M.H. Johnson, *FEBS letters* 92 (1), 53–56 (1978).
3. E. Kohne, L.J. Behnken, D. Leupold, H. Rogge, H. Martin and E. Kleihauer, *Hemoglobin* 3 (5), 365–370 (1979).
4. K. Harano, T. Harano, S. Shibata, H. Mori, S. Ueda, K. Imai and M. Seki, *Hemoglobin* 8 (4), 407–411 (1984).
5. A. Villegas, J.B. Wilson, S.S. Chen, F. Calero, L. Reinares, T.H. Huisman and D. Espinos, *Acta haematologica* 76 (2-3), 161–163 (1986).
6. G. Fermi, *Journal of molecular biology* 97 (2), 237–256 (1975).  
J. Schnee, C. Aulehla-Scholz, A. Eigel and J. Horst, *Human genetics* 84 (4), 365–367 (1990).
7. M.F. Perutz, H. Muirhead, J.M. Cox, L.C. Goaman, F.S. Mathews, E.L. McGandy and L.E. Webb, *Nature* 219 (5149), 29–32 (1968).
8. J.S. Sack, L.C. Andrews, K.A. Magnus, J.C. Hanson, J. Rubin and W.E. Love, *Hemoglobin* 2 (2), 153–169 (1978).
9. Y.-i. Suzuki, T. Shimizu, H. Sakai, M. Tamaki, K.i. Koizumi, T. Kuriyama, E. Tsuchida, H. Koseki and T. Shirasawa, *Biochemical and biophysical research communications* 295 (4), 869–876 (2002).
10. M. Izumizaki, M. Tamaki, Y.-i. Suzuki, M. Iwase, T. Shirasawa, H. Kimura and I. Homma, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 285 (4), R747-53 (2003). doi:10.1152/ajpregu.00104.2003.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

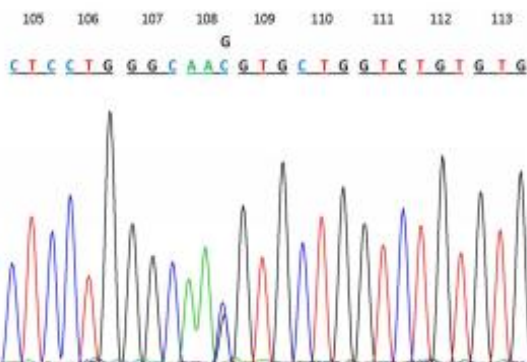


**Figure 1:** Cellulose acetate electrophoresis of hemolysates (TBE-buffer, pH 8.4) indicating presence of abnormal hemoglobin in the propositus (daughter) and her father. From left to right: HbAS control, father, mother, son, daughter, HbA control.



**Figure 2:** Cation BioRad Variant II HPLC chromatogram of hemolysate from proband's father, showing HbF (0.3%) eluting at 1.09 min, HbA (61.4%) at 2.43 min, HbA2 (4.7%) at 3.65 min, and variant hemoglobin (24.3%) at 4.69min.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Figure 3:** Nucleotide sequencing of the proband's  $\beta$ -globin gene, codons 105 – 113 revealing codon 108 with C>G heterozygosity (AAC>AAG).





### Anexo 3. Consentimiento informado

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
NICARAGUA  
INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD

Licenciatura en Bioanálisis Clínico  
Hemoglobinopatías

### FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PREVALENCIA DE HEMOGLOBINOPATÍAS EN POBLACIÓN  
INFANTIL NICARAGUENSE.

Código (número) de proyecto:

---

Nombre del Investigador: *Marianela Ortiz, Yaneris Requenez, Jaslyn Salinas*

Nombre del participante:

---

#### A. PROPÓSITO DEL PROYECTO:

Nosotros, *Marianela Ortiz, Yaneris Requenez, Jaslyn Salinas*, estudiantes de la Licenciatura en Bioanálisis Clínico de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, esperamos obtener mediante este estudio, la información necesaria para conocer en Nicaragua la presencia de alteraciones de la hemoglobina; sustancia que transporta el oxígeno en la sangre y que cuando está disminuida causa anemia, la cual se refleja por cansancio, mareos y debilidad general.

La población de Nicaragua históricamente ha tenido niños con problemas de la sangre como las anemias, algunas de las cuales pueden ser trastornos hereditarios que se transmiten de padres a hijos y que afectan a la hemoglobina.

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

Los niños con este tipo de enfermedades suelen nacer sanos, pero se vuelven anémicos entre los seis meses y los dos años de vida. Si no son detectados y tratados a tiempo, la mayoría puede sufrir complicaciones o enfermarse en los primeros años de vida. Nuestro estudio pretende ayudar a diagnosticar este tipo de enfermedades.

### **B. ¿QUÉ SE HARÁ?:**

Si usted y su hijo(a) aceptan participar en este estudio, se les realizará lo siguiente:

- ◆ Una entrevista en la cual usted responderá preguntas sencillas, leerá cada punto de este documento, y si usted está de acuerdo, se procederá a sacarle sangre del brazo a su hijo (una cucharadita), limpiando la vena con algodón y alcohol, utilizando agujas y tubos plásticos estériles. Al finalizar la toma se le colocará una curita en el lugar donde se tomó la muestra.
- ◆ Una vez tomada la muestra, se almacenará en condiciones óptimas hasta su procesamiento, posteriormente se realizarán diferentes ensayos para buscar defectos en la hemoglobina.

### **C. RIESGOS:**

La participación en este estudio puede significar cierto riesgo o molestia para el niño(a) por lo siguiente:

- ◆ Entumecimiento o cierto dolor en el momento de la punción para la toma de muestra, además, ardor causado por el alcohol y en ciertas ocasiones, un pequeño hematoma (morete).

### **D. BENEFICIOS:**

- ◆ Como resultado de su participación en este estudio, el beneficio será obtener los resultados de laboratorio, que actualmente no todos se realizan en el país. Con su participación en este estudio, también será posible que los investigadores aprendan más acerca de las enfermedades de la hemoglobina y éste conocimiento beneficiará a otras personas en el futuro.
- ◆ Si los exámenes realizados a su hijo presentaran alguna alteración, usted será comunicado y su hijo recibirá atención médica por parte del médico de referencia de dicho Hospital.

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

- E.** Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted tiene el derecho a negarse a participar o a retirarse del estudio en cualquier momento, sin que ésta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que requiera su hijo.
- F.** Su participación, la información brindada por usted y los resultados obtenidos en este estudio, son confidenciales, los resultados podrán aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de manera anónima.
- G.** Usted no perderá ningún derecho legal por firmar este documento.
- H.** Usted se mantendrá informado de cualquier variación en este proyecto, a través de vía telefónica o mediante visitas personales realizadas por los investigadores o colaboradores en el estudio.
- I.** Una vez terminado el estudio, usted será informado de los resultados obtenidos por el investigador.

### CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en ésta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a que mi hijo(a) participe como sujeto de investigación en este estudio

---

Nombre, cédula y firma del padre/madre/representante legal  
fecha

---

Nombre, cédula y firma del testigo  
fecha

---

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento  
fecha

## *Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas*

### **Anexo 4. Hoja de recolección de datos.**

#### HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Código

DATOS GENERALES

Fecha: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Hora: \_\_\_\_\_ am / pm

#### 1. Datos Familiares

Nombre de la madre: \_\_\_\_\_

Nombre del padre: \_\_\_\_\_

Nombre del tutor: \_\_\_\_\_

Parentesco con el niño(a): madre  padre  abuelo(a)  hermano(a)

Otra relación familiar:

\_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento de los padres:

Padre: \_\_\_\_\_

Madre: \_\_\_\_\_

Dirección actual:

\_\_\_\_\_

Barrio: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_

Tel: \_\_\_\_\_

Numero de hermanos: \_\_\_\_\_

#### 2. Datos del niño(a)

Nombres y Apellidos:

\_\_\_\_\_

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

Sexo:    
F M

Edad: \_\_\_\_\_ años

Etnia: Blanco  Mestiza  Negra

Color de piel \_\_\_\_\_

Forma de labios \_\_\_\_\_

Tipo de pelo \_\_\_\_\_

Forma de nariz \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento: (d/m/a) \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ Centro  
Hospitalario \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ Centro \_\_\_\_\_ Hospitalario

Barrio: \_\_\_\_\_ Departamento: \_\_\_\_\_

Escolaridad         
1 2 3 4 5 6

¿Ha sido diagnosticado(a) con anemia alguna vez? Sí  No

Ha presentado algunas de las siguientes manifestaciones clínicas:

Cansancio/Debilidad  Palidez  Coloración amarilla (ictericia)

Dolor de Cabeza constante  Otros  Ninguna

¿Cuáles? \_\_\_\_\_

¿Ha sido transfundido alguna vez?: Sí  No

Cuando y Porqué: \_\_\_\_\_

## Caracterización Fenotípica de Hemoglobinas

### Anexo 4. Formato de reporte 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. MINSAL 18541  
Laboratorio Biología Molecular  
POLISAL/ UNAN–Managua



Figura 1. Tiras de acetato de celulosa sumergida en solución tampón (TBE)



Figura 2. Porta Muestras de la casa Helena Laboratories



Figura 3. Peine dispensador -súper Z-



Figura 4. Cámara electroforética



Figura 5. Hemolizados de hemoglobina



Figura 6. Alícuotas de hemolizados

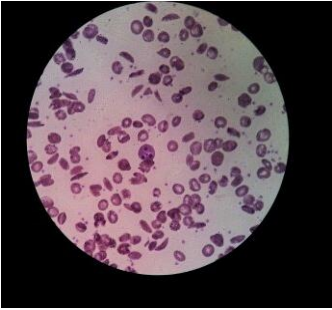


Figura 7. Aspectos morfológicos de los eritrocitos falciformes en la HbSC

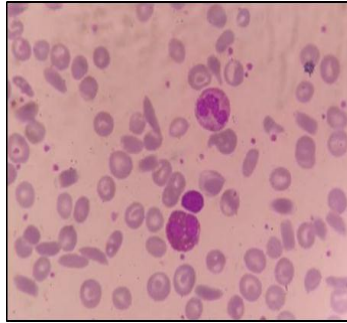


Figura 8. Frotis sanguíneo en la HbSC, presencia de drepanocitos, codocitos y cristales de Hb típicos de la HbC.

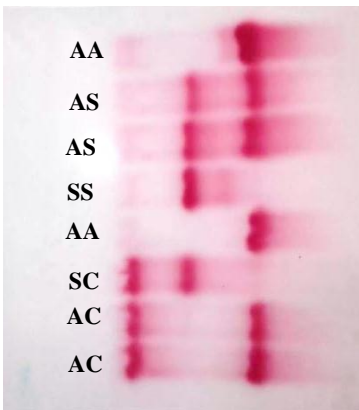


Figura 9. Corrida electroforética.

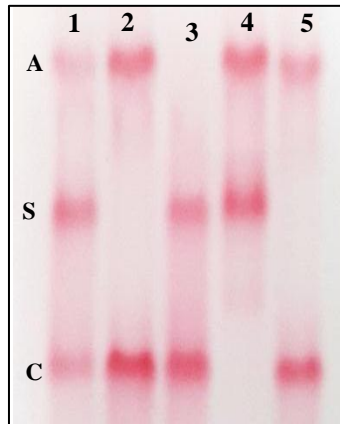


Figura 10. Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa pH alcalino. 1. Pool ASC, 2. Madre AC, 3. Paciente SC, 4. Padre AS, 5. Hermana AC



**Anexo 5. Lista de resultados de Electroforesis**

<b>N°</b>	<b>Código de muestra</b>	<b>Patrón</b>	<b>Procedencia</b>
1	Hb-45	AS	Masaya
2	Hb-46	AA	Chontales
3	Hb-47	AA	Carazo
4	Hb-48	AA	Rivas
5	Hb-49	AA	Managua
6	Hb-50	AS	Managua
7	Hb-51	AA	Masaya
8	Hb-52	AS	Masaya
9	Hb-53	AS	Masaya
10	Hb-54	AS	Masaya
11	Hb-55	AA	Masaya
12	Hb-56	AA	Rivas
13	Hb-57	AS	Rio San Juan
14	Hb-58	SS	Rivas
15	Hb-59	AA	Managua
16	Hb-60	AS	Managua
17	Hb-61	AA	Boaco
18	Hb-63	SC	Granada
19	Hb-64	SS	Managua
20	Hb-65	SS	Chontales
21	Hb-66	AA	Chinandega
22	Hb-67	SS	Chinandega
23	Hb-69	SS	Managua
24	Hb-70	SS	Managua
25	Hb-71	SS	Chinandega
26	Hb-72	SS	Managua
27	Hb-73	SS	Chinandega
28	Hb-74	SS	Estelí
29	Hb-76	AS	León
30	Hb-77	SS	Managua
31	Hb-78	AA	Estelí
32	Hb-79	AA	Granada
33	Hb-80	SS	Rivas
34	Hb-81	AS	Managua
35	Hb-82	SS	Chontales
36	Hb-83	SS	Rivas

37	Hb-85	AA	Managua
38	Hb-86	SS	Nueva Guinea
39	Hb-87	SS	Managua
40	Hb-88	AA	Managua
41	Hb-89	SS	Managua
42	Hb-90	AA	Managua
43	Hb-92	AS	Matagalpa
44	Hb-93	AA	Matagalpa
45	Hb-94	SS	Matagalpa
46	Hb-95	AS	Matagalpa
47	Hb-96	SS	Matagalpa
48	Hb-97	AS	León
49	Hb-98	AS	León
50	Hb-99	AS	Matagalpa
51	Hb-100	AA	Matagalpa
52	Hb-101	AA	Matagalpa
53	Hb-102	SS	Matagalpa
54	Hb-103	AS	Nueva Segovia
55	Hb-104	AS	Matagalpa
56	Hb-105	SS	Matagalpa
57	Hb-106	AA	Estelí
58	Hb-107	SC	Matagalpa
59	Hb-108	AC	Matagalpa
60	Hb-109	AC	Matagalpa
61	Hb-110	AS	Matagalpa
62	Hb-112	AA	Matagalpa
63	Hb-113	AA	Matagalpa
64	Hb-114	AA	Matagalpa
65	Hb-115	AA	Matagalpa
66	Hb-116	AA	Matagalpa
67	Hb-117	SS	Matagalpa
68	Hb-118	AS	Matagalpa
69	Hb-119	SS	Matagalpa
70	Hb-120	AS	Matagalpa
71	Hb-121	AA	Masaya
72	Hb-122	AA	Carazo
73	Hb-123	SS	Chinandega
74	Hb-124	Presbiteriana	Managua

75	Hb-125	AA	Managua
76	Hb-126	AA	Managua
77	Hb-127	Presbiteriana	Managua
78	Hb-128	AA	Matagalpa
79	Hb-129	AA	Masaya
80	Hb-130	AA	Managua
81	Hb-131	AS	Managua
82	Hb-132	AA	Managua
83	Hb-133	AA	Matagalpa
84	Hb-135	AA	León
85	Hb-136	AA	León
86	Hb-137	AA	Managua
87	Hb-138	AA	Chinandega
88	Hb-139	AS	Chinandega
89	Hb-140	AA	Jinotega
90	Hb-141	AA	Managua
91	Hb-142	AA	RAAN
92	Hb-143	AA	RAAN
93	Hb-144	AA	RAAN
94	Hb-145	AA	Honduras
95	Hb-146	AS	Managua
96	Hb-147	AS	Managua
97	Hb-148	AS	Managua
98	Hb-149	SS	Chinandega
99	Hb-150	AS	Chinandega
100	Hb-151	AS	Chinandega
101	Hb-152	AS	Chinandega
102	Hb-153	SS	Chinandega
103	Hb-154	AS	Chinandega
104	Hb-155	SS	Chinandega
105	Hb-156	AA	Chinandega
106	Hb-157	AS	Chinandega
107	Hb-158	SS	Chinandega
108	Hb-159	AS	Chinandega
109	Hb-160	AA	Chinandega
110	Hb-161	AA	Chinandega
111	Hb-162	AS	Chinandega
112	Hb-163	AS	Chinandega

113	Hb-164	AA	Chinandega
114	Hb-165	AA	Chinandega
115	Hb-166	AS	Chinandega
116	Hb-167	AA	Chinandega
117	Hb-168	AA	Chinandega
118	Hb-169	SS	Chinandega
119	Hb-170	AS	Chinandega
120	Hb-171	AS	Chinandega
121	Hb-172	AA	Chinandega
122	Hb-173	AA	Chinandega
123	Hb-174	AA	Chinandega
124	Hb-175	AA	Chinandega
125	Hb-176	AA	Chinandega
126	Hb-177	AS	Chinandega

Fuente: Registro de Laboratorio



Figura 11. Recolección de datos a los pacientes y familiares en las Unidades de Salud



Figura 12. Extracción de muestra sanguínea a los pacientes y familiares.



Figura 13. Pacientes y familiares recibiendo charla sobre la importancia del estudio.

