



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
CARRERA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO



Monografía para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico

“Identificación de fenotipos de hemoglobina prevalentes en niños menores de 15 años del municipio de Santa Rosa del Peñón y su relación con los valores de la BHC”

Autores:

 Br. Ida Patricia Cruz Gámez
 Br. Cristopher Antonio Delgado Galo

Tutores:

Samuel Vílchez, PhD

Profesor titular

Dpto. Microbiología y Parasitología.

Patricia Blandón, MSc.

Profesora Asistente

Dpto. Microbiología y Parasitología.

RESUMEN

Las hemoglobinopatías constituyen un grupo de trastornos hereditarios de la hemoglobina que tienen una amplia distribución a nivel mundial, convirtiéndose en muchas regiones en verdaderos problemas de salud pública. Las hemoglobinopatías mayormente distribuidas en la población humana son la hemoglobina S, C, D, E y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) un 5% de la población mundial es portadora de gen de hemoglobina potencialmente patológico. En el ser humano existen tres hemoglobinas normales: la HbA, HbA₂ y HbF. Aproximadamente después del año de edad la más importante es la HbA y constituye aproximadamente el 95% de la hemoglobina total.

El objetivo del presente trabajo fue correlacionar los fenotipos de hemoglobina con los valores de la serie roja y cantidades de hemoglobina en niños menores de 15 años en el municipio de Santa Rosa del Peñón. Se estudiaron 100 muestras sanguíneas de niños por medio de electroforesis de hemoglobina en citrato agar, determinándose que el 12% presentaba un fenotipo HbAS y el 88% restante HbAA. Estadísticamente no se logró observar una diferencia significativa en la distribución de los valores de la BHC según fenotipos identificados, a excepción del conteo de glóbulos rojos donde se observa una tendencia con respecto a las medianas y la distribución de los conteos de estas células, siendo estos valores mayores en las muestras con fenotipos HbAA.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos primeramente a Dios por la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo, luz y camino.

Gracias a nuestros padres, por permitirnos culminar esta etapa de nuestras vidas, por confiar y creer en nuestros sueños. Agradecemos todos los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

Agradecemos a nuestros docentes por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial, a nuestros tutores de investigación quienes nos han brindado paciencia, orientación y han sido una guía en el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
2.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3.OBJETIVOS	4
3.1.OBJETIVO GENERAL	4
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
4.MARCO TEÓRICO	5
4.1Generalidades de la sangre	5
4.2Hemoglobina	6
4.2.1Estructura de la hemoglobina	6
4.2.2Biosíntesis de hemo	7
4.2.3Biosíntesis globina	8
4.2.4Unión de la hemoglobina	8
4.2.5Clasificación de la hemoglobina	8
4.3Epidemiología de las hemoglobinopatías	9
4.4Trastornos asociados a la hemoglobina	10
4.4.1Hemoglobina S	10
4.4.2Hemoglobina C	12
4.4.3Hemoglobina E	13
4.4.4Hemoglobina D	14
4.5Diagnóstico	14
4.5.1Electroforesis	14
4.5.2Electroforesis a pH ácido	15
4.5.3Electroforesis en agar citrato	15
4.5.4Electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino	15
4.5.5Prueba de Falciformación	16
4.5.6Método de cianuro de hemoglobina (HiCN)	16

4.5.7Espectrofotometría	16
4.5.8Cromatografía.....	17
4.5.9Western blot	17
5.DISEÑO METODOLÓGICO.....	19
5.1Tipo de estudio	19
5.2Área de estudio.....	19
5.3Población de estudio	19
5.4Tamaño de la muestra	19
5.5Tipo de muestreo.....	19
5.6Criterios de inclusión.....	19
5.7Criterios de exclusión.....	19
5.8Recolección de la muestra	20
5.9Procesamiento de la muestra	20
5.9.1Procedimiento para Biometría Hemática Completa.	20
5.9.2Procedimiento para determinación del patrón de hemoglobina en citrato-agar electroforesis	22
5.10Aspectos éticos.....	26
5.11Análisis estadístico	26
6.RESULTADOS	28
7.DISCUSIÓN	35
8.CONCLUSIONES.....	37
9.RECOMENDACIONES.....	38
10.BIBLIOGRAFÍA.....	39
11.ANEXOS.....	43



1. INTRODUCCIÓN

En el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), bajo la temática de “Talasemia y otras hemoglobinopatías” se registró que de 300,000 nacimientos al año el 5% de la población mundial es portadora de un gen de hemoglobina (Hb) potencialmente patológico y aproximadamente un 3,4% de las defunciones entre los niños menores de 5 años corresponden a hemoglobinopatías. ⁽¹⁾

La hemoglobina (Hb) es una proteína globular que se encuentra en el citoplasma de los eritrocitos y cuya función es transportar oxígeno desde los pulmones hacia los capilares de los tejidos. ⁽²⁾ En el ser humano encontramos tres variantes normales: la hemoglobina A (HbA), la hemoglobina A2 (HbA2) y la hemoglobina Fetal (HbF). Después del primer año de edad el fenotipo de HbA es el más importante cuantitativa y funcionalmente, y representa aproximadamente del 95-97% de la hemoglobina total. Sin embargo, existen variantes consideradas anormales, dentro de las que se destacan la HbS, HbC, la HbE. Y la HbD. ⁽³⁾

En la actualidad, se desconoce el número exacto de hemoglobinopatías, sin embargo, se pueden señalar dos condiciones más comunes: 1) drepanocitosis, siendo James Bryan Herrick en 1910 el primero en observar la “célula drepanocítica” y finalmente Linus Pauling en el año 1949 descubrió que la drepanocitosis se vincula con la presencia de una hemoglobina anormal o patológica (HbS) y, 2) las talasemias las cuales fueron descubiertas por George H. Whipple en 1907 que le dio el nombre al fusionar del griego "Thalasa" que significa "el mar" y de anemia, pues quiso asociar la enfermedad con el mar mediterráneo y el mar negro, por ser esas regiones donde hasta entonces había sido vista esa enfermedad. ^(1,4,5)

Las alteraciones en la molécula de hemoglobina en algunos casos no tienen consecuencias fisiológicas o hematológicas importantes. Sin embargo, niños con talasemia suelen nacer sanos y presentar síntomas (anemias) entre los 6 meses y 2 años de edad, los cuales, si no son diagnosticados y tratados oportunamente, pueden morir de anemia o de infecciones en los primeros años de vida. ^(1,6-8)

En Nicaragua muy pocos estudios se han realizado sobre las hemoglobinopatías, lo cual conlleva a escasa información sobre aspectos claves para entender esta problemática a nivel



Identificación de fenotipos de hemoglobina prevalentes en niños menores de 15 años del municipio de Santa Rosa del Peñón y su relación con los valores de la BHC



nacional ¿Qué grupos étnicos son más afectados? ¿Cuáles son los rangos de edades sintomáticos? ¿Cuál es el orden de frecuencia, la prevalencia nacional y la tasa de incidencia? o cualquier otro dato respectivo a hemoglobinopatías y su efecto. Así, estudios como el realizado por *Ortiz y Salinas* en el año 2016, reportan una prevalencia de portadores sanos con respecto a anemia drepanocítica en el departamento de Chinandega de un 32%, y un 29% en pacientes sintomáticos, cabe resaltar que principalmente niños menores de 11 años presentaban esta condición.⁽⁹⁾ Lo anterior resalta la importancia del diagnóstico temprano y la generación de una línea base sobre estas afectaciones que contribuya a llenar el vacío en conocimiento actual, lo que es uno de los principales propósitos del presente estudio. Esto a través de una caracterización fenotípica de los tipos de hemoglobinas en niños menores 15 años del municipio de Santa Rosa del Peñón.^(1,6-8)



1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Nicaragua existe escasa información acerca de las hemoglobinopatías, su diagnóstico y abordaje, desconociendo el orden de frecuencia de las mismas. Los desórdenes en la molécula de hemoglobina pueden contribuir a diferentes hemoglobinopatías, en algunos casos debido a estas alteraciones los eritrocitos adquieren una forma anormal por lo que presentan un tiempo de vida reducido. El fenómeno anterior puede contribuir al desarrollo de un cuadro de anemia severa, el cual puede complicarse provocando episodios de oclusión vascular aguda y alteraciones crónicas de origen isquémico. Estos tipos de episodios son los que afectan a la casi totalidad de los órganos y simultáneamente pueden conllevar al desarrollo de procesos infecciosos, que son las principales causas de muerte entre niños con trastornos hemoglobínicos, sobre todo porque no reciben tratamiento oportuno. ⁽¹⁾

Los avances en la atención preventiva y los nuevos tratamientos han reducido las complicaciones que surgen del padecimiento de estos trastornos. No obstante, las hemoglobinopatías siguen siendo un importante problema de salud en los infantes a nivel global. Según el Ministerio de Salud (MINSAL), en Nicaragua la prevalencia de anemia es del 28 % en niños de 12 a 59 meses, con promedio de hemoglobina de 10,6 mg/dL, y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) reporta una prevalencia de la malnutrición crónica y retardo en el crecimiento es del 17%.⁽¹⁰⁾ En base a lo antes mencionado se plantea la siguiente interrogante:

¿Cuáles son los fenotipos de hemoglobina en niños menores de 15 años del municipio de Santa Rosa del peñón y su relación con los valores de la serie roja y cantidades de hemoglobina?



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Correlacionar los fenotipos de hemoglobina con los valores de la serie roja y cantidades de hemoglobina en niños menores de 15 años en el municipio de Santa Rosa del Peñón.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la edad y sexo de la población en estudio.
- Caracterizar los fenotipos de hemoglobina en niños menores de 15 años mediante electroforesis citrato-agar.
- Determinar la probabilidad de encontrar valores patológicos en la serie roja y cantidades de hemoglobina según fenotipos identificados.
- Comparar los resultados de la electroforesis de hemoglobina con los valores de la BHC.



3. MARCO TEÓRICO

4.1 Generalidades de la sangre

La sangre es un tejido vivo formado por líquidos y sólidos. Es una mezcla de líquidos y células que circulan por los vasos sanguíneos del sistema circulatorio. La parte líquida, llamada plasma, contiene agua, sales y proteínas. La parte sólida de la sangre contiene glóbulos rojos, responsables de transportar oxígeno y dióxido de carbono, los glóbulos blancos que forman parte del sistema inmunitario, y las plaquetas, responsables de la coagulación sanguínea.⁽²⁾

El plasma, es la porción líquida de la sangre y el principal componente, conforma el 55% de la sangre humana. Es más denso que el agua, tiene un gusto salado y su color es amarillento translúcido. Su composición es compleja, La mayor parte es agua y el resto es una mezcla de iones, nutrientes, desechos y proteínas plasmáticas, entre las que están el fibrinógeno y las globulinas.⁽²⁾

Los glóbulos blancos, son un tipo de célula sanguínea que se produce en la médula ósea y se encuentra en la sangre y el tejido linfático. Los glóbulos blancos son parte del sistema inmunitario del cuerpo y ayudan a combatir infecciones y otras enfermedades. Los tipos de glóbulos blancos son los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), los monocitos y los linfocitos (células T y células B). La prueba del recuento sanguíneo completo (BHC) a menudo incluye el número de glóbulos blancos. Este valor se usa para detectar afecciones como infecciones, inflamaciones, alergias y leucemias.

Las plaquetas, también conocidas como trombocitos, son células sanguíneas. Se forman en la médula ósea, un tejido similar a una esponja en sus huesos. Las plaquetas juegan un papel importante en la coagulación de la sangre. Normalmente, cuando uno de sus vasos sanguíneos se rompe, comienza a sangrar. Las plaquetas se coagularán (se agruparán) para tapar la lesión en el vaso sanguíneo y detener el sangrado.⁽²⁾

Los glóbulos rojos o eritrocitos o hematíes son el tipo de célula más numerosa de la sangre ya que constituyen el 99% de los elementos formes de la sangre. En realidad, no son verdaderas células porque no tienen núcleo ni otros organelos y su tiempo de vida es limitado (unos 120 días). Tienen forma de discos bicóncavos, con un diámetro medio de 8 micras, son



muy finos y flexibles y pueden deformarse para circular a través de los capilares más estrechos. Su principal función es la de transportar la hemoglobina.⁽²⁾

4.2 Hemoglobina

La hemoglobina (Hb) es una heteroproteína globular conjugada que está presente en el interior de los eritrocitos, cuya parte no aminoacídica o grupo protésico se conoce con el nombre de hemo formado por la protoporfirina IX y un átomo de hierro en estado ferroso: su función principal es transportar oxígeno (O₂) desde el aparato respiratorio hacia los capilares de los tejidos periféricos, y también se encarga del transporte de CO₂ de los tejidos periféricos hasta los pulmones para ser excretado y eliminado a través de la exhalación. Los valores normales en sangre son de 12-15 g/dl en mujeres y de 13-16 g/dl en hombres.⁽²⁾

Se denomina hemoglobinopatía al defecto de carácter hereditario, que tiene como consecuencia una estructura anormal en una de las cadenas de las globinas de la molécula de Hb. Sin embargo, suele reservarse el término Hemoglobinopatías para las anomalías de la Hb producidas por el simple cambio de un aminoácido en una de las cadenas de globina; el término talasemias se reserva para las hemoglobinopatías debidas a la falta de síntesis, total o parcial, de una cadena completa de globina.⁽¹¹⁾

4.2.1 Estructura de la hemoglobina

Las cuatro cadenas polipeptídicas de la Hb contienen cada una un grupo prostético hem. Un grupo prostético es la porción no polipeptídica de una proteína. El hem es una molécula de porfirina que contiene un átomo de hierro en su centro. El tipo de porfirina de la Hb es la protoporfirina IX; contiene dos grupos ácidos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos de la estructura de la porfirina. El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (+2) y puede formar cinco o seis enlaces de coordinación dependiendo de la unión del O₂ (u otro ligando) a la Hb (oxiHb, desoxiHb). Cuatro de estos enlaces se producen con los nitrógenos pirrólicos de la porfirina en un plano horizontal. El quinto enlace de coordinación se realiza con el nitrógeno del imidazol de una histidina denominada histidina proximal. Finalmente, el sexto enlace del átomo ferroso es con el O₂, que además está unido a un segundo imidazol de una histidina denominada histidina distal. Tanto el quinto como el sexto enlace se encuentran en un plano perpendicular al plano del anillo de porfirina.⁽³⁾



Las cadenas polipeptídicas α contienen 141 aminoácidos, las no α 146 (β , γ , δ) y difieren en la secuencia de aminoácidos. Se conoce desde hace décadas la estructura primaria de las cuatro cadenas de Hb normales. La estructura secundaria es muy similar: cada una exhibe 8 segmentos helicoidales designados con las letras A hasta la H. Esta distinción es fundamental pues los segmentos helicoides son rígidos y lineales, mientras que los no helicoidales son flexibles. Como el hierro del hem forma un puente covalente con la histidina proximal (F8) y el O₂ se une de forma covalente al hem y a la histidina distal (E7), el hem queda suspendido en una hendidura no polar entre los helicoides E y F.⁽³⁾

La parte porfirínica del hem se sitúa dentro de una bolsa hidrofóbica que se forma en cada una de las cadenas polipeptídicas. Las estructuras obtenidas por difracción de rayos X muestran que en la bolsa del hem existen unas 80 interacciones entre 18 aminoácidos y el hem. La mayoría de estas interacciones no covalentes se presentan entre cadenas apolares de aminoácidos y las regiones no polares de la porfirina.

4.2.2 Biosíntesis de hemo

La biosíntesis de hemo ocurre en las mitocondrias y el citoplasma de los precursores del eritrocito, del pronormoblasto al reticulocito en la médula ósea. Los eritrocitos maduros no pueden producir hemoglobina debido a que pierden su mitocondria y la capacidad para utilizar el ciclo del ácido tricarbóxico necesario para la síntesis de hemoglobina.⁽³⁾

La biosíntesis del hemo comienza con la condensación de glicina y succinil coenzima A (CoA) catalizada por aminolevulinato sintasa para formar ácido aminolevulínico (ALA). En el citoplasma, el ácido aminolevulínico la deshidratasa (también conocida como porfobilinógeno sintasa) convierte ALA a porfobilinógeno (PBG). PBG sufre varias transformaciones en el citoplasma de hidroximetilbilano a coproporfinógeno III. Esta vía luego continúa en las mitocondrias hasta que, en el último paso de producción de hemo, Fe²⁺ combina con protoporfirina IX en presencia de ferroquelatasa (hemo sintasa) para hacer hemo.⁽³⁾

La transferrina, es una proteína plasmática, transporta hierro en el férrico. (Fe³⁺) para desarrollar células eritroides. Transferrina se une a los receptores de transferrina en la célula precursora eritroide, membranas y los receptores y transferrina (con unión hierro) se



introducen en la célula en un endosoma. La acidificación del endosoma libera el hierro de la transferrina. El hierro se transporta fuera del endosoma al interior de las mitocondrias donde se reduce al estado ferroso, y se une con protoporfirina IX para producir hemo, este abandona la mitocondria y se une a las cadenas de globina en el citoplasma.⁽⁹⁾

4.2.3 Biosíntesis globina

Seis genes estructurales controlan la síntesis de las seis cadenas de globina. Los genes alfa y zeta se encuentran en el cromosoma 16, los genes gamma, beta, delta y épsilon se asocian con el cromosoma 11.

La vía de la síntesis proteica continúa en la traducción del código genético de la cadena final del polipéptido de globina. Cada grupo de cadenas simples se sintetiza en cantidades iguales y las cadenas se liberan de los ribosomas hacia el citoplasma.⁽³⁾

4.2.4 Unión de la hemoglobina

Luego de su liberación de los ribosomas, las cadenas de globina se unen a hemos y luego se porean. Una cadena alfa y una no alfa se combinan para formar dímero, y dos dímeros se combinan de manera espontánea para formar tetrámeros, esto completa la molécula de hemoglobina.⁽³⁾

La combinación de cadenas alfa y beta es más común, seguida por combinaciones de cadenas de globina alfa con gamma y alfa con delta/ la molécula de hemoglobina que contiene dos cadenas alfa y dos betas se denominan hemoglobina A (HbA). La hemoglobina A2 (HbA₂), contiene dos cadenas alfas y dos deltas. La hemoglobina F, dos alfas y dos gammas. Las distintas cadenas de globina de hemoglobina difieren en la cantidad de carga por moléculas.⁽³⁾

4.2.5 Clasificación de la hemoglobina

En condiciones normales en los individuos se forman seis variantes de la hemoglobina. En diferentes etapas del desarrollo del individuo podemos encontrar las siguientes:

Embrionarias: Se destacan por ser hemoglobinas transitorias con gran afinidad por el oxígeno, dentro de estas encontramos Gower 1 ($\xi_2\varepsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$), Hemoglobina Portland ($\xi_2\gamma_2$).



Fetales: Presentes en el nacimiento en una proporción de 7:1, es de las más importantes del feto y del neonato. Produciéndose como trazas en la vida adulta en condiciones normales, conocida respectivamente como Hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$).⁽¹²⁾

En la etapa después del nacimiento, durante el desarrollo y su adultez encontramos:

Hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$): La hemoglobina A1 es un tipo de hemoglobina, llamada también hemoglobina del adulto o hemoglobina normal, que representa aproximadamente el 97 % de la hemoglobina sintetizada en el adulto. Está formada por dos globinas alfa y dos globinas beta. Algunas enfermedades, como las formas graves de talasemia, pueden hacer que los niveles de hemoglobina A sean bajos y que los niveles de hemoglobina F sean altos.⁽³⁾

Hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$): En el neonato representa menos del 0,5% del total de Hb, mientras que en el adulto representa el 0,3% a 2,6%, dichos valores dependen en parte del método empleado para su cuantificación. Su estructura es muy homogénea debido a que las cadenas α y δ de la Hb tan sólo difieren en 10 de los 146 aminoácidos que componen la secuencia primaria de la cadena. En vista de su baja cantidad en los glóbulos rojos, la Hb A2 es poco probable que tenga algún papel fisiológico en el transporte de O₂.⁽⁶⁾

Hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$): La hemoglobina fetal es un tetrámero estructural de tipo alfa2 gama2, con cualidades muy particulares. Se destaca su alta afinidad por el O₂ dada por su estructura y su baja interacción con el 2,3 difosfoglicerato.

4.3 Epidemiología de las hemoglobinopatías

Las hemoglobinopatías representan un importante problema sanitario en un 71% de los 229 considerados países, de los cuales un 89% se presentan en el total de todos los nacimientos. Cada año nacen más de 330 000 niños afectados (83% de casos de anemia de células falciformes y 17% de casos de talasemia). A nivel mundial, en torno a un 7% de las mujeres embarazadas son portadoras de talasemia β o α cero, o de hemoglobina S, C, D Punjab o E, y más de un 1% de las parejas corren riesgo.⁽¹³⁾



La constitución hematológica de la población en general de toda Centroamérica, refleja los rasgos genéticos heredados de sus antepasados indígenas, así como de los inmigrantes africanos, asiáticos y europeos que allí se establecieron. Cabe notar como ejemplo que algunos marcadores genéticos se caracterizan por un polimorfismo equilibrado, particularmente de los genes de las hemoglobinas S y C, las cuales son de extracción africana y se consideran tóxicos para la proliferación de los agentes etiológicos de la malaria, en especial de *Plasmodium falciparum*. Todos estos factores han afectado la frecuencia con que se manifiestan hoy día las hemoglobinas anormales y talasemias en Centroamérica y otras localidades de la América tropical. ⁽²⁾

4.4 Trastornos asociados a la hemoglobina

4.4.1 Hemoglobina S

La anemia de células falciformes es la hemoglobinopatía sintomática más común en todo el mundo, con una incidencia mayor en África. Cabe resaltar que, 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 la célula parasitada adquiriera la forma falciforme con más facilidad, lo que conduce al secuestro y fagocitosis de las células infectadas por el bazo. ⁽¹⁴⁾

Herencia

Es una hemoglobinopatía hereditaria se transmite y padece por ambos sexos con los caracteres de la herencia mendeliana dominante. Sólo padecen la enfermedad los homocigóticos. Los heterocigóticos puros, es decir, los que heredan el gen patológico solamente de uno de los padres y tienen el alelomorfo normal, son simplemente portadores del estigma drepanocítico, lo que se reconoce por la presencia de la hemoglobina S en los eritrocitos. Los heterocigóticos mixtos, es decir, los que heredan de uno de los padres el gen para la hemoglobina S y del otro uno para otra de las variantes patológicas de hemoglobina, padecen una forma atípica de Anemia Drepanocítica. ⁽¹⁵⁾



La característica genética y constante de los eritrocitos es la presencia de un tipo anormal de hemoglobina o HbS, que por ser muy poco soluble al estado reducido precipita fácilmente cuando falta el oxígeno en el plasma. (6) Las personas con hemoglobina S heterocigotos (HbAS) son asintomáticos (rasgo drepanocítico) y la morfología eritrocitaria es normal. La hemoglobina S homocigota (Hb SS) o anemia drepanocítica se caracteriza por una anemia hemolítica grave, que aparece a los pocos meses de nacer cuando la Hb S reemplaza a la Hb fetal. (7)

Etiología

La anemia de células falciformes es un trastorno causado por una mutación del gen de la globina β que sustituye por valina el sexto aminoácido, el ácido glutámico. La HbS ($\alpha 2\beta 2$ 6 Glu \rightarrow Val) se polimeriza de forma reversible cuando se desoxigena para formar una red gelatinosa de polímeros fibrosos que incrementa la rigidez de la membrana del eritrocito, aumenta la viscosidad y produce deshidratación por escape de potasio y entrada de calcio. Estos cambios producen también la forma de hoz característica, los drepanocitos pierden la flexibilidad necesaria para atravesar los capilares finos. Poseen membranas “pegajosas” que se adhieren de manera anormal al endotelio de las vénulas pequeñas. Estas anomalías provocan episodios impredecibles de vasooclusión microvascular y destrucción prematura de los eritrocitos (anemia hemolítica). (7)

Aspectos Clínicos

El niño recién nacido está protegido por el alto nivel de hemoglobina fetal en los glóbulos rojos durante las primeras 8-10 semanas de vida. Conforme el nivel baja, las manifestaciones clínicas de la enfermedad aparecen, las manifestaciones hematológicas son aparentes hacia la décima o duodécima semana de vida. Las manifestaciones clínicas son resultado de la vaso-oclusión y la hemólisis que conducen a isquemia e infartos tisulares con manifestaciones agudas y crónicas; es una enfermedad de presentación variable de un individuo a otro, con afectación en múltiples órganos (hueso, pulmones, cerebro, riñón, bazo) y se caracteriza por periodos de crisis repetidas o ausencia de síntomas por tiempo prolongado. (15)



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

Crisis Dolorosas: El dolor puede presentarse en cualquier zona del cuerpo, pero lo más frecuente es que se sienta en el tórax o las extremidades. Cualquier interrupción en el flujo sanguíneo al cuerpo puede provocar dolor, inflamación y posible muerte del tejido adyacente que no recibe la suficiente cantidad de sangre ni de oxígeno.

Crisis aplásica: Son de tipo parecido a las de los pacientes con otros trastornos hemolíticos, en los que el recuento de reticulocitos cae a niveles bajo, indicando que la producción de glóbulos rojos ha disminuido drásticamente.

Secuestro esplénico (acumulación): crisis resultado de la acumulación de células falciformes en el bazo. Esto puede producir una disminución repentina de hemoglobina y poner en peligro la vida si no se trata rápidamente. El riesgo de infección es una preocupación de importancia en los niños con deficiencia esplénica. La infección es la principal causa de muerte en los niños menores de 5 años en esta población.

Crisis Hemolíticas: La duración de la vida del glóbulo rojo esta acortada en todas las variedades de enfermedad de células falciformes. Puede súbitamente estar aún más reducida, probablemente por una serie de razones. Ictericia señal y síntoma comunes de la anemia drepanocítica. Las células falciformes no viven tanto tiempo como los glóbulos rojos normales y, por lo tanto, mueren a una velocidad más rápida que la capacidad de filtración del hígado.⁽¹⁵⁾

4.4.2 Hemoglobina C

La hemoglobina C (Hb C) es originaria de África Occidental (Burkina Faso) y se extendió por todo el mundo como la hemoglobina S. 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 Hb C ha surgido a raíz de una mutación de la Hb A independiente de la ocurrida en la Hb S, por un simple cambio de bases en el codón para ácido glutámico en la sexta posición de la cadena beta.⁽¹⁴⁾



Etiología

La hemoglobina C es una hemoglobinopatía hereditaria. Se debe a una mutación en la cadena de beta-globina en la que el glutamato (ácido) es reemplazado por lisina (básica) en la sexta posición de la cadena de beta-globina. Esta mutación hace que la Hb C sea menos soluble que la Hb A, formando cristales hexagonales.⁽¹⁶⁾ La Hb C se caracteriza por la sustitución del ácido glutámico de la posición 6 de la cadena β por lisina. Es propia del África occidental. El estado homocigoto (Hb CC) se caracteriza por una ligera anemia hemolítica crónica con esplenomegalia. El estado heterocigoto (Hb AC) no produce trastorno alguno. Aunque la Hb C tiende a cristalizar en condiciones de hipoxia, no produce crisis vasoclusivas como las de la Hb S. La morfología eritrocitaria se caracteriza por la aparición de dianocitos.⁽¹⁶⁾

La sustitución de ácido glutámico por lisina en la sexta posición de la cadena de beta-globina induce una interacción electrostática entre grupos beta-6-lisilo cargados positivamente y moléculas adyacentes cargadas negativamente, lo que conduce a una menor solubilidad de la HbC en los eritrocitos. Debido a esto, se produce la formación de cristales, lo que aumenta la viscosidad de la sangre y reduce la vida útil de los glóbulos rojos. Pero, a diferencia de la anemia de células falciformes, que es causada por la sustitución de ácido glutámico por valina, la Hb C no causa polimerización intracelular durante la tensión baja de oxígeno. Por tanto, en general, la crisis vasooclusiva no se observa con la enfermedad de la hemoglobina C a menos que se combine con la anemia falciforme (Hb SC).⁽¹⁶⁾

Manifestaciones clínicas

El rasgo de hemoglobina C (HbAC) es clínicamente silencioso. La enfermedad de la hemoglobina C (HbCC) también es un trastorno leve y la mayoría de las personas no presentan ningún síntoma. Pero algunos pacientes pueden experimentar anemia hemolítica leve y, por lo tanto, pueden quejarse de síntomas como fatiga, aturdimiento, debilidad, palidez de la piel. En la exploración física, puede haber esplenomegalia leve a moderada y, en ocasiones, puede aparecer ictericia.⁽¹⁷⁾

4.4.3 Hemoglobina E

La hemoglobinopatía E homocigota es una hemoglobinopatía que causa anemia hemolítica leve, en general sin esplenomegalia. La hemoglobina (Hb) E es la tercera hemoglobina más



prevalente en todo el mundo (después de la Hb A y la Hb S). Ocurre principalmente en la población del sudeste asiático (> 15% de incidencia de enfermedad homocigota)

La diseminación de la variante a Norteamérica se debió a la inmigración Indochina a los Estados Unidos hacia el final de la década de los 70. La incidencia de Hb E entre los niños refugiados alcanza hasta el 19%. La movilidad electroforética de la Hb E es similar, aunque ligeramente más rápida que la Hb C a pH alcalino. Puede diferenciarse de la Hb C mediante electroforesis a pH ácido, desplazándose junto con la Hb A, y es inestable frente a oxidantes. Los síndromes por Hb E se asocian con marcada microcitososis e hipocromía, simulando un síndrome talasémico. El estado de doble heterocigoto para Hb E y β talasemia se caracteriza clínicamente por talasemia mayor.

4.4.4 Hemoglobina D

La Hb D tiene una movilidad electroforética idéntica a la Hb S a pH alcalino. Se distingue de la Hb S por su solubilidad normal, una movilidad electroforética en gel de agar a pH ácido claramente diferente. No produce falciformación. Las propiedades electroforéticas y de solubilidad de la Hb G son tan similares a la D, que las dos generalmente no se diferencian por estas técnicas. Existen al menos 11 variantes de cadena β y seis variantes de cadena α que tienen las características electroforéticas y de solubilidad de las hemoglobinas D y G. La Hb D-Punjab, es lejos la más común de las variantes de Hb D, presentándose en una frecuencia de 1-3% de la población de la región occidental de la India y en pequeño número en comunidades europeas que tienen lazos coloniales con aquel país. En Norteamérica la variante más prevalente es la Hb G-Philadelphia, una anomalía de cadena encontrada especialmente en negros. ⁽¹⁸⁾

4.5 Diagnóstico

4.5.1 Electroforesis

La electroforesis de hemoglobina es la prueba de laboratorio más relevante para el diagnóstico de los síndromes clínicos que resultan de las alteraciones de la hemoglobina, es decir, de las hemoglobinopatías. ⁽¹⁸⁾ Las hemoglobinas patológicas se diferencian entre sí de



la hemoglobina normal en su punto isoeléctrico, por lo que es posible separarlas fácilmente por electroforesis. ⁽³⁾

El principio de la electroforesis consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz porosa, según su peso molecular o tamaño; movimiento generado por el campo eléctrico.⁽¹⁹⁾

En la práctica diaria el soporte más empleado es el acetato de celulosa a pH 8,6. En medio alcalino la Hb se carga negativamente y migra hacia al ánodo (+). Es una técnica simple, rápida para la detección de las hemoglobinopatías más comunes. Las variantes estructurales que presentan una variación de carga eléctrica a pH alcalino se separan de la Hb A.^(19,20)

4.5.2 Electroforesis a pH ácido

Es muy efectiva en la detección inicial de variantes de Hb. La mayoría de las Hb tiende a desplazarse igual que la HbA, y las que lo hacen de forma distinta es porque el aminoácido sustituido está relacionado con la unión al 2,3 DPG. Los factores que intervienen en la separación de las Hb son, además de la carga eléctrica, las interacciones fisicoquímicas entre la fase sólida (agar) y las moléculas de Hb, que dependen de la localización superficial de la mutación.^(19,20)

4.5.3 Electroforesis en agar citrato

Se realiza a pH 6 y presenta más problemas técnicos que la anterior. Diferencia a la HbC, S, A y F, y en ella corren igual que la A las HbD, E, G, lepore, H y J; la Bart's se sitúa en la misma posición que la F. En acetato de celulosa a pH 6,5 se separan las HbH y Bart's de otras variantes de movilidad rápida.^(19,20)

4.5.4 Electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino

Rutinariamente se realiza este tipo de EF a pH 8,4-8,6 usando una membrana de acetato de celulosa como sustrato, y es un método simple, rápido y sensible. Detecta las variantes de Hb más comunes, y tradicionalmente es la técnica más utilizada para la evaluación inicial. A pH alcalino, la Hb es una proteína cargada negativamente y que en un campo eléctrico migra hacia el ánodo (+). Las variantes de Hb con distintas cargas en su superficie se separan de la HbA y, por tanto, todas las detectadas son diferentes de ella. Puede haber Hb anormales sin cambio en la carga, y por tanto no serán diferenciadas. ⁽¹⁹⁾



4.5.5 Prueba de Falciformación

Las pruebas para la detección de Hb S se basan en la capacidad de dicha hemoglobina de formar polímeros de desoxi-HbS a bajas presiones de oxígeno que deforman al eritrocito adquiriendo la forma característica de hoz (drepanocito). La sangre del paciente se incuba con un agente reductor como el metabisulfito de sodio al 2% preparado en el momento de su uso. Partes iguales de metabisulfito de sodio al 2% y sangre extraída con cualquier anticoagulante se mezclan y se coloca una gota de la mezcla sobre un portaobjetos tapando con un cubreobjetos y sellando los bordes. Luego de 30 min - 1 h de incubación a temperatura ambiente se examina al microscopio con objetivo 40X y se observa la formación o ausencia de drepanocitos. Ocasionalmente la prueba puede necesitar hasta 24 h para positivizarse. En ese caso el vidrio debe conservarse en caja de Petri.⁽²¹⁾

4.5.6 Método de cianuro de hemoglobina (HiCN)

El método de la cianometahemoglobina (HiCN) fue propuesto en 1961 por Van Kampen y Zijlstra como procedimiento para la estandarización de la hemoglobina. En 1967 el Comité Internacional de Estandarización de Hematología (ICSH) recomienda el método de la HiCN y se procede a la elaboración de un patrón de HiCN de referencia. En 1982 el patrón HiCN de referencia fue considerado como “Patrón de Referencia Internacional” por la OMS, persistiendo esta recomendación hasta nuestros días.⁽²²⁾

El principio de este método consiste en convertir la hemoglobina en HiCN mediante la adición de cianuro potásico y ferrocianuro. De esta forma se consigue un compuesto estable que presenta un pico máximo de absorbancia a 540nm y el cual sigue la Ley de Lambert-Beer. La absorbancia de la muestra se compara con una solución de HiCN estandarizada, de concentración y absorbancia conocida.⁽²²⁾

4.5.7 Espectrofotometría

El estudio a nivel bioquímico de cualquier biomolécula requiere la utilización de técnicas analíticas que permitan su determinación cualitativa y cuantitativa, así como su caracterización físico-química y biológica. Uno de los métodos más sencillos, accesibles, útiles y utilizados es la espectroscopía, en general, y la espectroscopía ultravioleta-visible, en particular. Se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en solución y en muestras



biológicas, con el empleo 1 de reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar y forman un producto coloreado que permite detectarlo en muestras complejas.

El fundamento de la espectroscopia se basa en la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas. ⁽²³⁾

4.5.8 Cromatografía

La cromatografía es un método de separación de mezclas complejas, que es ampliamente utilizado en diversas ramas de la ciencia. Para ello emplea el principio de la retención selectiva, que consiste en el distinto comportamiento de los componentes de una mezcla sobre un soporte específico (como papel, gas, un líquido neutro, etc.). ⁽²⁴⁾

La separación por cromatografía implica dos fases distintas:

- **Fase estática.** Inicia cuando se aplica la mezcla a su soporte específico y se prepara para la aplicación de la móvil.
- **Fase móvil.** Se procede a mover otra sustancia sobre el soporte, permitiendo así su reacción con los componentes de la mezcla, para que la diferencia entre la velocidad de reacción sirva como criterio de separación.

Dependiendo de su naturaleza, algunas sustancias tenderán a moverse y otras a permanecer sobre el soporte, conforme a cuántas fases estáticas y móviles de diversa condición (líquida, sólida y gaseosa) se lleven a cabo. ⁽²⁴⁾

4.5.9 Western blot

El Inmunoblot o Western blot es una técnica mediante la cual se separan proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida y después se transfieren electroforéticamente a un papel de nitrocelulosa o una membrana similar, donde son detectadas con anticuerpos que reconocen los antígenos que hay en ellas. Consta de tres fases:



1. En la primera fase se separan las proteínas (extractos dérmicos o epidérmicos) mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, de esta manera los antígenos proteicos que se quieren utilizar para detectar los anticuerpos son separados electroforéticamente en un gel según su peso molecular.
2. En una segunda fase denominada immunobloting o immunotransferencia se transfieren las proteínas que han quedado separadas en el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa mediante una nueva técnica de electroforesis.
3. En la tercera y última fase se utiliza el papel de nitrocelulosa para identificar los anticuerpos dirigidos contra las proteínas transferidas. El papel se corta a tiras y se incuba con los sueros en estudio, posteriormente se incuban las tiras con un reactivo o anticuerpo secundario que permitirá detectar los anticuerpos que se han unido a las proteínas presentes en las tiras. ⁽²⁵⁾



4. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Tipo de estudio

Descriptivo de corte transversal.

5.2 Área de estudio

El municipio de Santa Rosa del Peñón, ubicado en el departamento de León en la República de Nicaragua. Santa Rosa del Peñón es el segundo municipio con menor extensión de este departamento y destaca entre los de la región del norte como uno de los de mayor riqueza mineral. El municipio presenta dos tipos de topografías: plana en todo el casco urbano y quebrada en la zona rural. Posee una población actual de 9,530 habitantes de los cuales 7,677 (80.5%) corresponden al área rural. ⁽²⁶⁾

5.3 Población de estudio

La población de estudios estuvo compuesta según el último censo del INIDE (Instituto Nacional de Información de Desarrollo) por 3,652 niños menores de 15 años de edad del municipio de Santa Rosa del Peñón. ⁽²⁶⁾

5.4 Tamaño de la muestra

Se incluyeron 100 muestras de sangre venosa de 100 niños procedentes del municipio de Santa Rosa del Peñón departamento de León.

5.5 Tipo de muestreo

Muestreo no probabilístico por conveniencia.

5.6 Criterios de inclusión

- Niños menores o iguales a 15 años de edad.
- Niños procedentes del municipio de Santa Rosa del Peñón.

5.7 Criterios de exclusión

- Niños con procesos infecciosos.



- Niños mayores de 15 años.

5.8 Recolección de la muestra

Las muestras D-identificadas fueron obtenidas en el municipio de Santa Rosa del Peñón, a partir de las muestras de sangre que fueron extraídas de niños de la ONG Compassion, a los cuales se les realizó exámenes como parte de su chequeo médico anual. El número de la muestra fue seleccionado de manera aleatoria de acuerdo a la accesibilidad de las muestras. Luego fueron llevadas en un termo a 4°C al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas UNAN-LEÓN para su correspondiente procesamiento.

5.9 Procesamiento de la muestra

5.9.1 Procedimiento para Biometría Hemática Completa.

La serie roja, los blancos y los niveles de hemoglobina fueron obtenidos por medio del análisis de las muestras sanguíneas en el citómetro EDAM H30, analizador de hematología automatizado de 3 partes.

Fundamento hematología automatizado

Los contadores hematológicos son equipos de última tecnología que utiliza múltiples aplicaciones físico químicas, que, junto con la informática, permiten analizar los diferentes parámetros que se incluyen en el hemograma. La tercera generación incorporó mejoras a la ingeniería de los contadores, la discriminación de la población de glóbulos blancos en tres diferenciales: linfocitos, células medias y granulocitos neutrófilo.

Componentes básicos de un contador hematológico.

Circuito hidráulico

- Diluidor/Dilutor: sistema que diluye la concentración de las células sanguíneas y las suspende en soluciones conductoras isotónicas para adecuarla a las capacidades de medida del dispositivo.
- Aspirador: sistema que toma la muestra diluida y la conduce hacia el dispositivo de medida.
- Sistema de fluidos: transporta las suspensiones celulares hacia el dispositivo de medida o la cámara de recuento.



- Cámara de recuento o dispositivo de medida: constituye la parte central o zona sensible del equipo, donde ocurren los fenómenos ópticos, eléctricos o ambos, medidos posteriormente. Algunos equipos poseen solo una cámara de recuento por lo que les lleva el doble de tiempo la lectura.

Circuito Electrónico

- Transductor o detector: son los dispositivos que generan linealmente pulsos eléctricos cuando las células pasan la zona sensible, óptica o eléctrica, del equipo.
- Discriminador: discrimina los pulsos eléctricos generados por los transductores en correspondencia con el tipo celular medido.
- Amplificador: amplifica la señal eléctrica que sale del discriminador para su posterior procesamiento.

Convertidor analógico-digital: convierte las señales eléctricas en digitales.

- PC: procesa las señales digitales y las convierte en datos que serán mostrados en pantalla y que pueden ser impresos.

Circuito neumático

Está constituido por las válvulas y los pistones que ejercen la presión para que se desplacen los fluidos por el circuito hidráulico.

Recuento celular: impedancia, también conocida como principio Coulter, en honor al ingeniero Wallace Henry Coulter quien lo describió en 1956, no sólo revolucionó la hematología sino que inició la era de los auto analizadores hematológicos. El método se basa en la resistencia que presentan las células que no son conductoras eléctricas al paso de la corriente eléctrica cuando atraviesan un pequeño orificio, conocido como “orificio de apertura” que separa dos medios con diferente potencial.

Cada vez que una célula atraviesa el orificio de apertura se presenta un cambio en la resistencia eléctrica que el instrumento interpreta como un pulso que es proporcional al volumen del líquido electrolítico desplazado. Bajo estas circunstancias, el número de pulsos generados indica el número de partículas que pasan a través de la apertura. La amplitud de cada uno de los pulsos es proporcional al volumen de cada una de las partículas. El pulso se amplifica y se compara con los canales internos de tensión de referencia que, únicamente acepta pulsos de una amplitud determinada. Mediante un software se construye un gráfico



conocido como “histograma», obtenido a partir del número y tamaño de los pulsos. La distribución y el tamaño de los mismos permiten identificar las poblaciones celulares y los coeficientes de variación de cada una de ellas.

Para el recuento de glóbulos blancos se utiliza un lisante que destruyen los glóbulos rojos, permea la membrana de los glóbulos blancos, es decir, crean poros en la membrana de los leucocitos produciéndose una difusión lenta del citoplasma del leucocito y quedando la membrana adherida al núcleo (se mide volumen nuclear), estabiliza los glóbulos blancos y acompleja la hemoglobina.

En el histograma de glóbulos blancos se pueden observar las tres poblaciones bien diferenciadas: linfocitos, células medias y granulocitos neutrófilos.

Tecnología para la determinación de hemoglobina: Si bien el método de referencia continúa siendo el de Cianometahemoglobina, al tratarse de una sustancia tóxica, hoy en día los equipos han remplazado los reactivos con cianuro por reactivos libres del mismo. La lectura se realiza entre 525nm y 555nm dependiendo del producto.

5.9.2 Procedimiento para determinación del patrón de hemoglobina en citrato-agar electroforesis

Preparación de reactivos:

Materiales

- Sal di-sódica EDTA
- Cloruro de magnesio
- Ácido cítrico deshidratado
- Hidróxido de sodio deshidratado
- Ácido clorhídrico líquido
- Azul de coomassie
- Azul de bromofenol
- Agua destilada
- Balón de 1000 ml



- Balón de 500ml

Preparación de EDTA 0.01M en 1000 ml

1. Se pesaron 4 g de la sal disódica EDTA
2. Se pesó 0.1g de cloruro de magnesio
3. Se agregó 400 ml de agua destilada para disolver
4. Se aforó hasta 1000 ml

Nota: Para la elaboración del lisante se utilizó una concentración de EDTA a 0.005 M, así que se disolvió 500 ml de EDTA 0.01 M con 500 ml de agua destilada.

Preparación de ácido cítrico 0.01 M EN 1000 ml

1. Se pesó 21g de ácido cítrico deshidratado
2. En un balón de 1000ml se agregó el ácido cítrico y aforo hasta 1000 ml

Preparación de hidróxido sódico 1M PARA 1000ml

1. Se pesó 40g de NaOH Deshidratado
2. En un balón de 1000 ml se agregó el NaOH y aforo hasta 1000 ml

Preparación de ácido clorhídrico 0.1M para 1000 ml

1. En un recipiente se depositó 1000 ml de agua destilada
2. En una campana se midió 8.22 ml de ácido clorhídrico y se agregó a los 1000 ml de agua destilado

Nota: De ser necesario se calienta la solución antes de aforar para disolver adecuadamente sin que queden partículas de la sal.

Preparación de buffer citrato

Solución A: se prepararon 500ml de ácido cítrico + 100 ml de NaOH

Solución B: Ácido clorhídrico



Para la preparación del buffer citrato: Se mezcló 400ml de solución A con 600ml de HCL (solución B)

Preparación de gel para la corrida electroforética.

1. Se preparó un gel de agarosa o agar al 1.5% en tampón de citrato en un Erlenmeyer.
2. Se pesó 1.2 gr de agarosa y se mezcló con 80 ml de buffer
3. Se mezcló y calentó en microondas agitándose cada 30 segundos hasta que se disolviera y se volviera transparente.
4. Se vertió el gel en un tray de solidificación alcanzando una profundidad entre 0.3 – 0.5 cm de grosor. Luego colocamos el peine para crear los pozos de depósito de muestras a un tercio del largo más próximo al cátodo, y se dejó solidificar aproximadamente 30 min.
5. Una vez que el gel estuvo solido se colocó en la cámara electroforética.
6. Se vertió aproximadamente 100mL del tampón de citrato en cada sección exterior del gel hasta que este quedo completamente sumergido.

Preparación de la muestra del paciente y el control.

1. Se centrifugaron las muestras para separar el plasma del paquete globular.
2. En un eppendorf se colocaron 100 ul del paquete globular y se lavó 2 veces durante 15 segundos en la centrifuga con 50 ul de solución salina.
3. Para preparar un hemolizado de la muestra del paciente, se agregó dos partes de sangre completa a 18 partes de reactivo de hemolizado (EDTA 0.005M) y se mezcló en vortex por 10 segundos y deje reposar por 5min.
4. Se preparó el AS Hemo Control agregando una parte del control a una parte del reactivo de hemolizado y se mezcló en vortex por 10 segundos.

Realización de la corrida electroforética

1. Se limpió la cámara electroforética y rellenamos con buffer citrato
2. Se colocó el gel en la cámara electroforética de manera que quede cubierto por el buffer



3. Se mezcló 5ul de muestra lisado con 2ul de loading y depositamos en los pozos dejando que las muestras se depositaran adecuadamente.
4. Se corrió la Electroforesis durante 2 horas a 45 voltios.

Visualización de las Bandas de Hemoglobina

Se preparó la solución de tinción mientras se realizaba la corrida electroforética de la siguiente manera:

1. Disolvimos 1g de Azul de coomassie en 100mL de una solución de ácido acético 10%, metanol 40% y Agua 50%.
2. Al finalizar la electroforesis, se retiró el gel de la cámara y se colocó en una caja plástica.
3. Vertimos sobre toda la superficie del gel la solución de tinción durante 5 a 10 minutos.
4. Las hemoglobinas presentes en las muestras de los pacientes se identificaron en comparación con el patrón de migración del control de hemo AS.
5. Descoloramos el gel para una mejor visualización de las bandas de hemoglobina empleando una solución de ácido acético 10%, metanol 40% y Agua 50%, y se dejó decolorar sobre un vortex durante 24 horas.

Interpretación de los resultados

Valores de referencia

Al nacer, la mayoría de la hemoglobina en los eritrocitos del individuo normal es hemoglobina fetal, HbF. Algunas de las principales hemoglobinas adultas, HbA, y una pequeña cantidad de HbA2, también están presentes. Al final del primer año de vida y en la edad adulta, la principal presencia de hemoglobina es HbA con hasta un 3,5% de HbA2 y menos del 2% de HbF.

Interpretación de resultados de electroforesis de hemoglobina

La electroforesis en agar con citrato es una prueba de seguimiento necesaria para confirmar las hemoglobinas anormales detectadas en el agar citratado. Las hemoglobinas están



controladas genéticamente, y la presencia de hemoglobinas anormales a menudo se asocia con anormalidades funcionales, físicas y morfológicas en el eritrocito, así como con manifestaciones patológicas, como anemia hemolítica.

Rasgo falciforme

Este es un estado heterocigoto que muestra HbA y HbS y una cantidad normal de HbA₂ en Agar citratado. Los resultados en agar citrato muestran hemoglobinas en las posiciones migratorias (zonas) de HbA y HbS.

Anemia falciforme

Este es un estado homocigoto que muestra casi exclusivamente HbS, aunque también puede estar presente una pequeña cantidad de HbF.

Limitaciones

- Algunas hemoglobinas anormales tienen movilidades electroforéticas similares y deben diferenciarse por otras metodologías, como las pruebas de solubilidad.
- Al ser muestras D-identificadas no se logró obtener más datos sociodemográficos y clínicos de los pacientes.
- No había disponibilidad de acetato de celulosa, por lo que solo se realizó la electroforesis en citrato agar.
- Acceso a controles de diferentes hemoglobinas y marcadores de proteínas.

5.10 Aspectos éticos

El presente estudio se llevó a cabo tomando en cuenta los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, publicados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

5.11 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo empleando tablas con las características, frecuencia, medias, y análisis de varianza (ANOVA) entre fenotipos de hemoglobina y valores de la serie



roja de la población de estudio. También, se realizó un análisis bivariado para evaluar factores de riesgo individuales por medio de Chi cuadrado (X^2). Adicionalmente, se calculó la razón de prevalencia (RP) de las hemoglobinopatías encontradas, todo lo anterior empleando el programa de análisis estadístico de IBM SPSS versión 20, Excel 2013 y graphpad prism 9 para la elaboración de los gráficos.

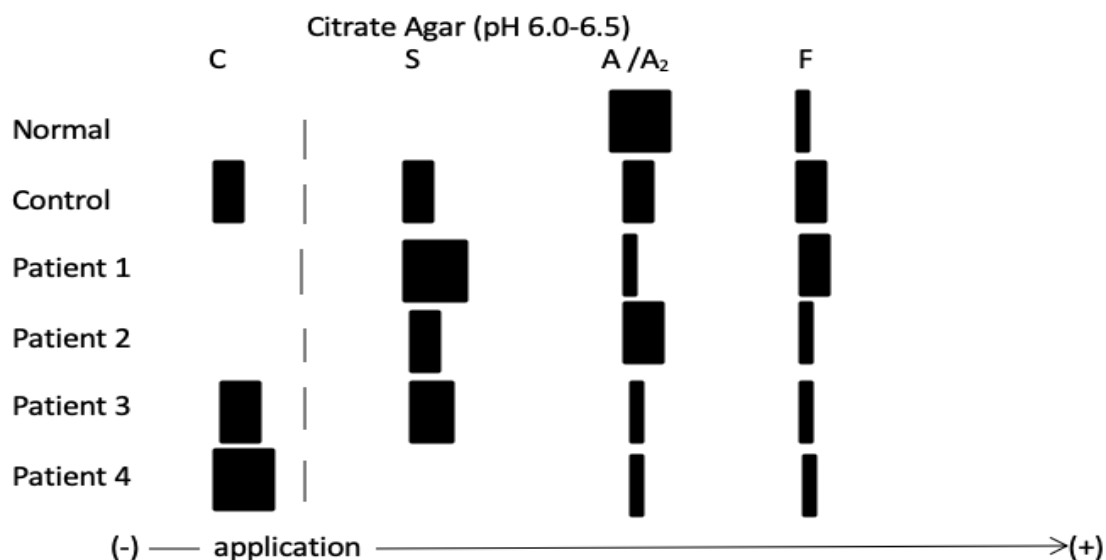


Imagen 1. Patrón de corrida electroforética de diferentes hemoglobinas.



5. RESULTADOS

Se analizaron un total de 100 muestras de sangre provenientes de niños menores de 15 años del municipio de Santa Rosa del Peñón, departamento de León. A partir de la técnica de electroforesis de hemoglobina, se encontró que el 88% posee un fenotipo de hemoglobina homocigoto (HbAA) y el 12% restante heterocigoto (HbAS), del cual el 50% pertenecía al

Variables	HbAA n (%)	HbAS n (%)	P
Edad			
0-7 años	24(82.8)	5(17.2)	0.322
8-15 años	64(88.5)	7(11.5)	
Sexo			
Masculino	43(87.8)	6(12.2)	1.000
Femenino	45(88.2)	6(11.8)	

género Femenino.

Tabla 1. Características demográficas de la población de estudio en base a su fenotipo de hemoglobina.

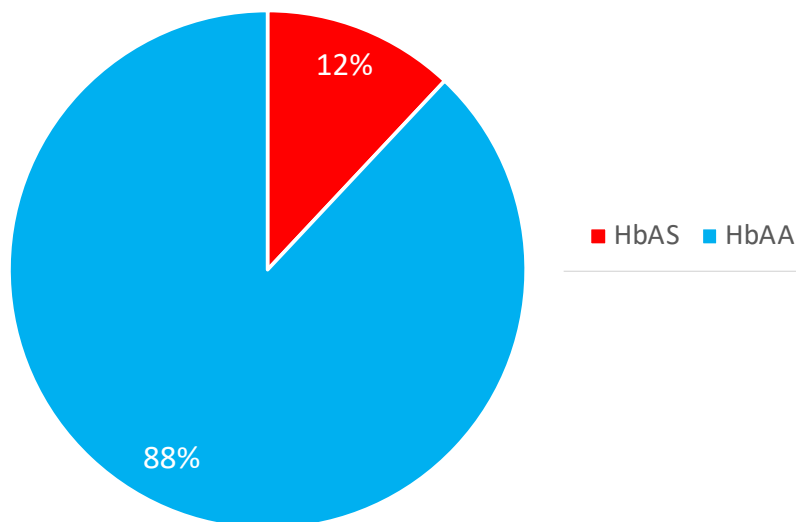


Gráfico 1: Distribución de los fenotipos de hemoglobina encontradas mediante electroforesis en Agar Citrato (n=100)

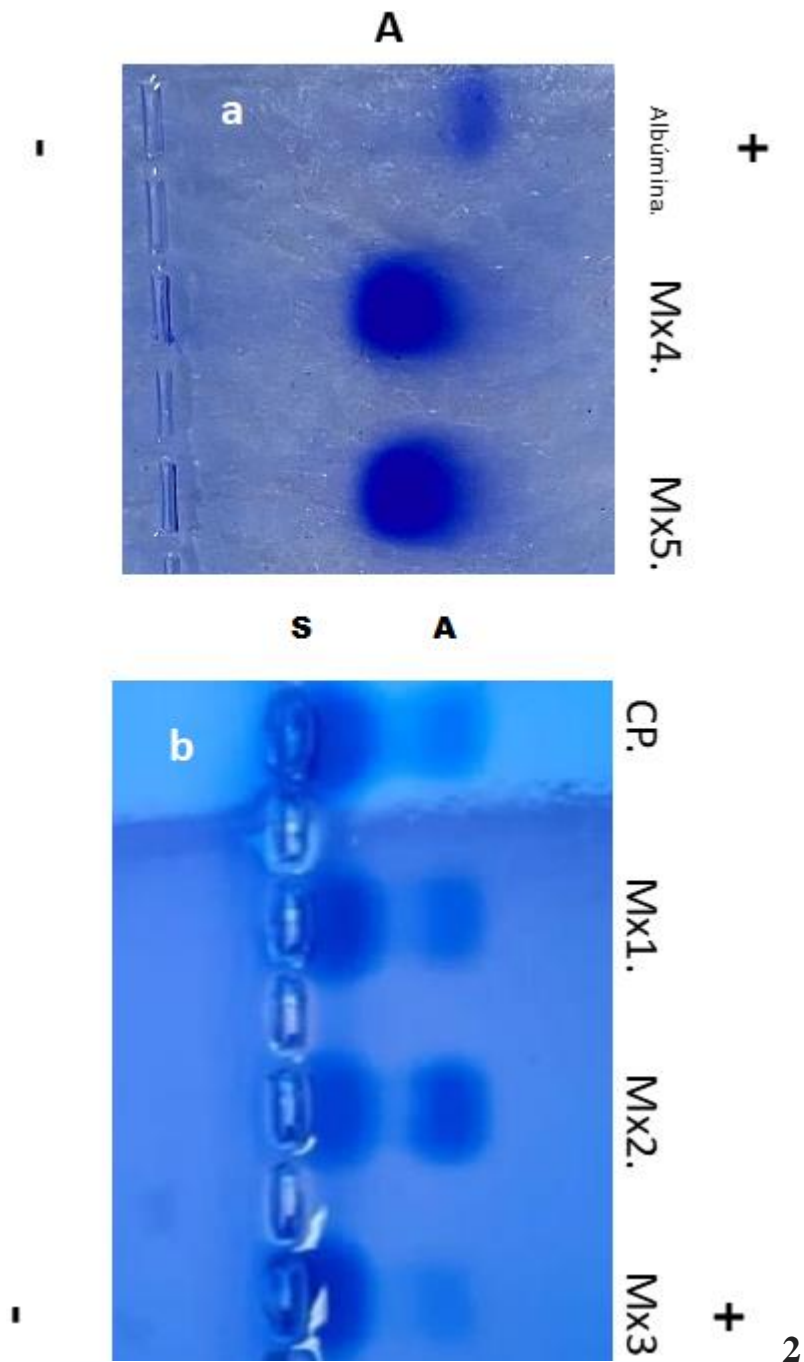


Imagen 2: Caracterización de hemoglobinas por electroforesis en Agar Citrato; a) Fenotipo HbAA, b) Fenotipo HbAS (-: cátodo, +: ánodo, MX: muestra, CP: control patológico.)



Parámetros	HbAA n (%)	HbAS n (%)	P	OR(IC)
Hematológicos patológicos	(N=88)	(N=12)		
Hematocrito	2(2.2)	-	0.598	NA*
Hemoglobina	1(1.1)	-	0.711	NA
MCV*	1(1.1)	1(8.3)	0.095	1.776 (0.443-7.112)
MCH*	27(30.6)	4(33.3)	0.852	1.015 (0.865-1.191)
MCHC*	70(87.5)	10(83.3)	0.758	1.029 (0.870-1.217)

Tabla 2. Probabilidades de disminución en los parámetros hematológicos según fenotipo de hemoglobina.

El conteo de glóbulos rojos no se tomó en cuenta ya que no se encontró alteraciones en los valores

*Na: No aplica

MCV: Volumen Corpuscular Medio

MCH: Hemoglobina Corpuscular Media

MCHC: Concentración De Hemoglobina Corpuscular Media

Comparación de la distribución de parámetros sanguíneos según fenotipo de hemoglobina en la población de estudio.

Los gráficos reflejan la distribución de los conteos de glóbulos rojos (Gráfico 2), hemoglobina (Gráfico 3) y hematocrito (Gráfico 4) comparativa de las medianas en base al fenotipo de hemoglobina encontrada de los pacientes en estudio. En los resultados del estudio reflejados en el gráfico 1 no existe una diferencia significativa (<0.05) entre los valores de pacientes con fenotipos HbAA y HbAS, pero, si hay una tendencia (0.0650) en la distribución de los valores entre fenotipos. Mientras que en los gráficos 2 y 3 no hay una diferencia significativa.

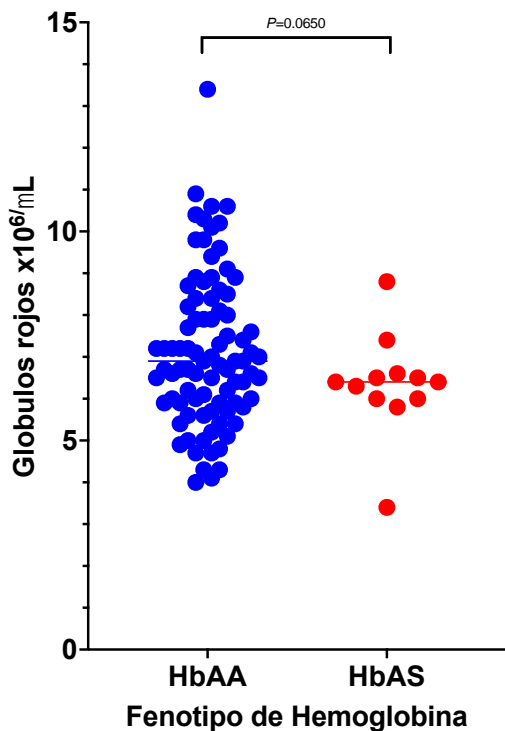


Gráfico 2. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es <0.05 existe diferencia significativa.

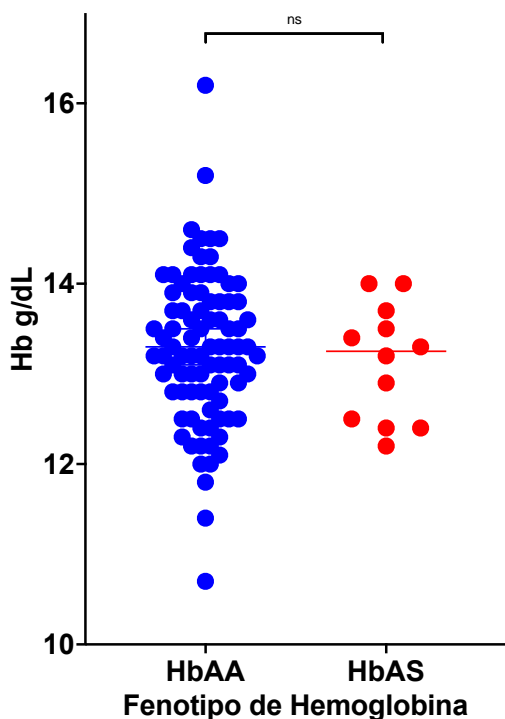
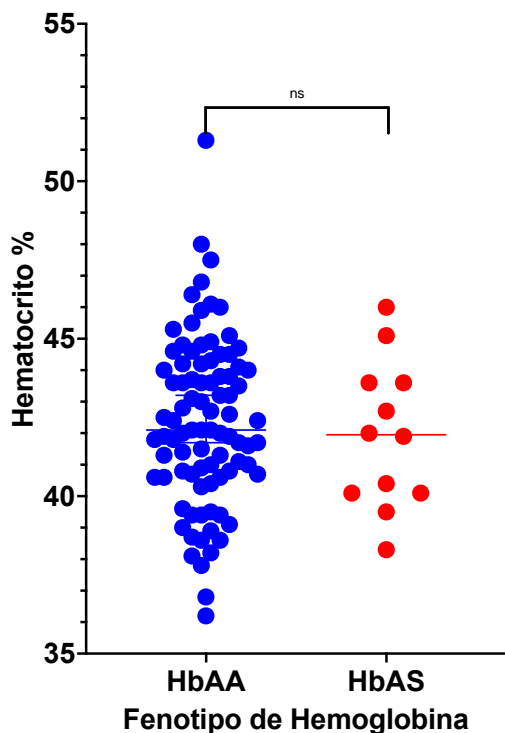


Gráfico 3. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es <0.05 existe diferencia significativa.



Los gráficos reflejan la distribución de los MCH (Gráfico 5), MCV (Gráfico 6) y MCHC (Gráfico 7), comparativa de las medianas en base al fenotipo de hemoglobina encontrada de los pacientes en estudio.

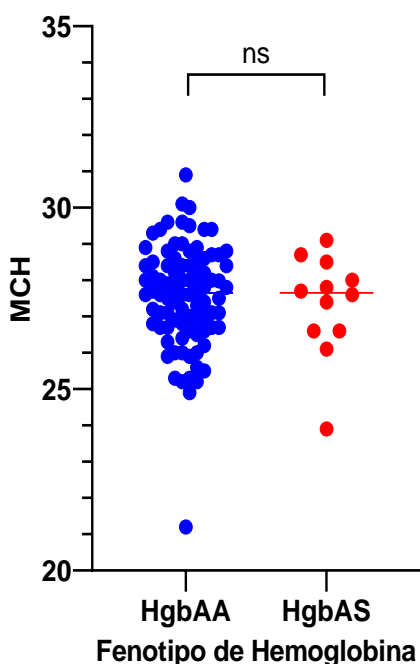


Gráfico 5. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es <0.05 existe diferencia significativa.

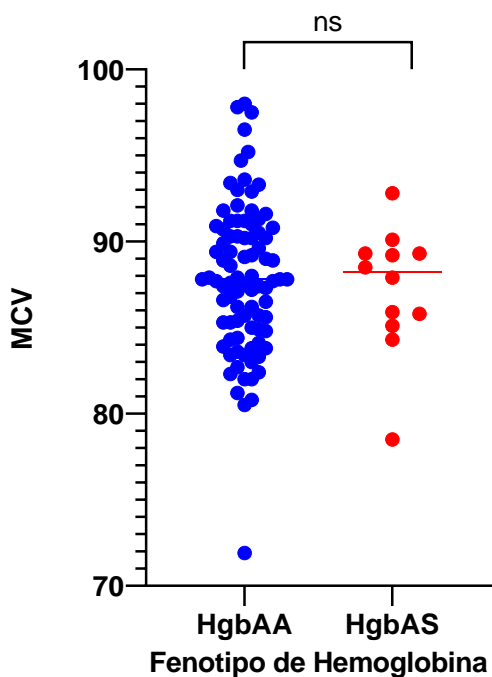


Gráfico 6. Pruebas complementarias de la biometría hemática completa. Se refleja el valor de P (diferencia significativa) calculado mediante análisis de varianza (ANOVA). Si P es <0.05 existe diferencia significativa.



6. DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó en 100 pacientes menores de 15 años provenientes del municipio de Santa Rosa del Peñón, departamento de León, con el fin de caracterizar los fenotipos de hemoglobina en niños del área rural mediante electroforesis citrato-agar, siendo este uno de los primeros esfuerzos que se realiza con personas mestizas del campo, y lográndose detectar el fenotipo homocigoto HbAA en el 88% de los niños y en un 12% el fenotipo heterocigoto HbAS (estos porcentajes fueron semejantes a un estudio realizado por *Castillo y Oliveros* en la ciudad de Cali, Colombia donde obtuvieron un 83.9% de pacientes con fenotipo HbAA y 10.7% mostraron un fenotipo HbAS).⁽²⁷⁾ De igual manera, otro estudio realizado por *Ferguson y Sánchez* en Panamá encontraron resultados similares ya que el 91% de los adolescentes presentaba fenotipo HbAA y el 8% restante HbAS.⁽¹⁴⁾ Así, este trabajo confirma la importancia de la técnica de electroforesis como técnica principal para la fenotipificación de hemoglobina y por consiguiente el diagnóstico temprano de alteraciones en la hemoglobina que puedan afectar la calidad de vida de las personas.

En Nicaragua no hay muchas investigaciones sobre fenotipos de hemoglobina en niños, sin embargo, en 2016 Ortiz y salinas realizaron un estudio en las cabeceras departamentales donde se caracterizó fenotípicamente las hemoglobinas de pacientes que ya tenían un diagnóstico con anemia drepanocítica para confirmar su diagnóstico en un rango de edad de 0 a 52 años, según los resultados obtenidos del estudio el rango de edad donde se encontró mayor porcentaje de fenotipos HbAS y HbSS fue de 0-11 años con un 16.6% y un 25 % respectivamente⁽⁹⁾. Similar a los hallazgos de nuestro estudio en que el rango de edad donde obtuvimos fenotipos HbAS fue de 0-12 años.

La frecuencia del fenotipo HbAS encontrada en nuestro estudio, al igual que otros estudios realizados en Nicaragua, está ligada directamente a la contribución de ancestros que componen hoy en día el fondo genético (69% europeo, 20% africano y 11% nativo americano) de nuestra población mestiza en el pacífico) (28). Así, en contraste con los resultados obtenidos en nuestra investigación *Guevara A., Chico M. y col*, analizaron muestras de sangre de individuos de raza negra pura en provincias de Esmeralda, Ecuador donde obtuvieron un 24% de variantes de hemoglobinas anormales, donde la variante más frecuente fue la HbAS con 84.9%. Cabe resaltar que la hemoglobina S es especialmente



frecuente en personas con antepasados originarios de África, la India y países del Mediterráneo y las constantes migraciones han incrementado la frecuencia del gen en el continente americano. Además, La anemia de células falciformes es la hemoglobinopatía sintomática más común en todo el mundo, con una incidencia mayor en África, y que está ligada fuertemente a la raza.^(15,29,30)

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 contra infecciones palúdicas mortales.^(15,30)

No se observaron diferencia estadística significativa con respecto a los resultados de los parámetros de la biometría hemática completa (conteo de glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina y volúmenes corpusculares) de nuestros pacientes con fenotipo HbAS vs HbAA, probablemente esto se deba a que la condición heterocigoto en ocasiones pasa desapercibida, los individuos generalmente son asintomáticos y presentan una BHC sin anemia y sin alteraciones en los índices hematológicos⁽³¹⁾ como lo podemos observar en los gráficos de nuestro estudio los pacientes con fenotipo HbAS no muestran alteraciones en dichos parámetros, lo cual es soportado por la literatura en la cual se indica que el estado de portador no muestra manifestaciones hematológicas anormales.⁽³⁾ Del mismo modo *Ortiz M, Requenez Y. y Salinas J.*, en su estudio no obtuvieron diferencia estadísticamente significativa para los pacientes portadores de HbAS vs HbAA.

Por otra parte, las complicaciones clínicas generalmente se manifiestan en estado homocigoto siendo la principal la anemia hemolítica crónica que marcan en gran medida el cuadro clínico de la enfermedad y esto se ve reflejado en su hemograma. A diferencia de nuestro estudio *Ortiz M, Requenez Y. y Salinas J.*, encontraron pacientes homocigotos HbSS donde se refleja una diferencia significativa en comparación con los pacientes con fenotipos HbAA y portadores HbAS, debido a que se observan valores disminuidos para hemoglobina, conteo de glóbulos rojos y porcentaje de hematocrito.⁽⁹⁾



7. CONCLUSIONES

1. No se encontró una correlación entre los fenotipos de hemoglobina con los valores de la serie roja y cantidades de hemoglobina en niños menores de 15 años del municipio de Santa Rosa del Peñón. Solamente, una tendencia a la significancia para la distribución y medianas del conteo de glóbulos rojos.
2. La población de estudio estuvo compuesta por niños menores de 15 años mestizos, donde el 51% fueron del sexo femenino.
3. Se Logró caracterizar los fenotipos de hemoglobina mediante electroforesis citrato-agar, encontrando que el 12% de la población de estudio tenía un patrón heterocigoto HbAS.
4. No se encontraron diferencias en los valores patológicos en la serie roja y cantidades de hemoglobina según fenotipos identificados. Aunque, se observa una tendencia no significativa con referente a los VCM.



8. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda aumentar el tamaño de la muestra en estudio.
2. Utilizar otros métodos confirmatorios y complementarios como: electroforesis en acetato de celulosa.
3. Utilizar otros controles de hemoglobina y marcadores para proteínas.
4. Recolectar datos sobre la historia clínica del paciente.



9. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Talasemia y otras hemoglobinopatías. OMS. 2006;5.2.
2. Ríos-Tapia C, Izquierdo-Vega J, Sánchez-Gutiérrez M, Zúñiga-Pérez C. Hemoglobina. Educ y Salud Boletín Científico Inst Ciencias la Salud Univ Autónoma del Estado Hidalgo [Internet]. 2013 Jun 5 [cited 2022 Aug 30];1(2). Available from: <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/ICSA/article/view/710/3773>
3. Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. Hematología Fundamentos y aplicaciones clínicas. Panamericana. 2014.
4. Williams TN, Thein SL. Sickle cell anemia and its phenotypes. Vol. 19, Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2018.
5. Ortiz-Hidalgo C. George H. Whipple. Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1934. La enfermedad de Whipple, la anemia perniciosa y otras contribuciones a la medicina. Gaceta Medica de Mexico. 2002.
6. Pereira FD, Sáenz I. Hemoglobinopatías en niños. Colomb Med. 1996;
7. Clara DL, Beyrías S, Maylin L, Vega V, Teresa D, Boada IS, et al. Principales causas de muerte en adultos con hemoglobinopatías. MEDISAN [Internet]. 2016 [cited 2022 Aug 30];20(2):176–83. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192016000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
8. Anemia (para Adolescentes) - Nemours KidsHealth [Internet]. [cited 2022 Aug 30]. Available from: <https://kidshealth.org/es/teens/anemia.html>
9. Socorro Requenez Y del S| SMJJ| OLM del P| GDMXA| PUATGDMXA| PUAT. 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. UNAN, Managua; 2017.



10. Improving Child Nutrition: The achievable imperative for global progress - UNICEF DATA [Internet]. [cited 2022 Aug 30]. Available from:
<https://data.unicef.org/resources/improving-child-nutrition-the-achievable-imperative-for-global-progress/>
11. Taboada Lugo N, Gómez Rojo M, Algora Hernández AE, Gretsya Arcas E, Noa Machado MD, Herrera Martínez M. Revista de Investigación e Información en Salud. Rev Investig e Inf en Salud [Internet]. [cited 2022 Aug 31];33. Available from:
http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lng=es&nrm=iso&tlng=
12. Stella L, Velandia C, Castillo M, Ana B, Mora I, Yiyola M, et al. CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS DE DONANTES DE SANGRE DE BOGOTÁ, D.C., COLOMBIA (2.600 m). Rev Med. 2007;15.
13. Cossio G, Chávez T, González D, Delgado M. Estudio preliminar de incidencia de hemoglobinopatías, en neonatos tamizados en el Hospital del Niño de Panamá. Agosto-diciembre 2009. Pediatr Panamá [Internet]. 2011 [cited 2022 Aug 30];15–8. Available from: <http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/6brtx>
14. Prevalencia de hemoglobina AS en una población de adolescentes en Panamá [Internet]. [cited 2022 Aug 30]. Available from:
<https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=17112>
15. Barillas Solis CE, Gutiérrez Sánchez AR, Villalobos Calero YV. Estandarización de la técnica de electroferosis de hemoglobina en acetato de celulosa, para el diagnóstico de hemoglobinopatías en el politécnico de la salud, Agosto- Noviembre 2015. 2016;
16. Karna B, Jha SK, Zaabi E Al. Hemoglobin C Disease. StatPearls [Internet]. 2022 Jun 5 [cited 2022 Aug 30]; Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559043/>
17. Palomo I, Pereira. J, Palma J. HEMATOLOGÍA: Fisiopatología y Diagnóstico.



HEMATOLOGÍA: Fisiopatología y Diagnóstico. 2009.

18. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 9a Ed Elsevier. 2015;
19. Sáenz-Renaud G. Hemoglobinas anormales. Acta Med Costarric. 2005;
20. Moisa Martínez MA. Prevalencia de complicaciones no infecciosas en pacientes con anemia de células falciformes que consultaron al Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom durante los años 2008- 2012. 2013;
21. Erramouspe B, Eberle SJE. Técnicas convencionales aplicadas al diagnóstico de las hemoglobinopatías. Acta Bioquim Clin Latinoam. 2017;
22. Cegarra V. Comparación de tres métodos de medición de hemoglobina en cirugía cardiaca. J Chem Inf Model. 2012;
23. Díaz, N. Bárcena, A. Fernández, E. Galván, A. Jorrín N. Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. SAE Tech Pap. 2010;
24. Unam. Técnicas Cromatográficas. Quim Anal Instrum II. 2007;
25. Johnson M. Western Blot Protocol. Mater Methods. 2013;
26. INIDE Instituto Nacional de Información de Desarrollo en cifras. [cited 2022 Oct 2]; Available from: www.inide.gob.ni
27. Castillo M, Oliveros AL. Caracterización de alteraciones en la molécula de hemoglobina en afrodescendientes colombianos. Nova. 2014;12(22).
28. Nuñez C, Baeta M, Sosa C, Casalod Y, Ge J, Budowle B, et al. Reconstructing the population history of Nicaragua by means of mtDNA, Y-chromosome STRs, and autosomal STR markers. Am J Phys Anthropol. 2010;143(4).
29. Guevara A, Chico M, Calvopiña M, Guderian RH. Hemoglobinopatías en comunidades de raza negra de los ríos Cayapas y Onzoles, cantón Eloy Alfaro, provincia de Esmeraldas, Ecuador. Biomédica. 1998;18(2).



Identificación de fenotipos de hemoglobina prevalentes en niños menores de 15 años del municipio de Santa Rosa del Peñón y su relación con los valores de la BHC



30. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD 59ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD A59/9 Punto 11.4 del orden del día provisional 24 de abril de 2006 Anemia falciforme Informe de la Secretaría PREVALENCIA DE LA ANEMIA FALCIFORME.
31. Velázquez-Gómez M, Ruiz-Pérez J, Culebro-Cruz EP. COVID-19 y drepanocitosis. Rev Mex Patol Clínica y Med Lab. 2020;67(3).



10. ANEXOS

MUESTRA	SEXO	EDAD	FENOTIPO DE HB
1	Femenino	10	HbAA
2	Masculino	6	HbAA
3	Femenino	10	HbAA
4	Masculino	8	HbAA
5	Femenino	11	HbAA
6	Femenino	10	HbAA
7	Masculino	12	HbAA
8	Femenino	9	HbAA
9	Femenino	11	HbAA
10	Femenino	11	HbAA
11	Femenino	10	HbAA
12	Masculino	5	HbAA
13	Femenino	12	HbAA
14	Masculino	10	HbAA
15	Femenino	9	HbAA
16	Femenino	8	HbAA
17	Masculino	9	HbAA
18	Masculino	11	HbAA
19	Masculino	7	HbAA
20	Masculino	12	HbAA
21	Femenino	12	HbAA
22	Masculino	7	HbAS
23	Masculino	5	HbAS
24	Masculino	6	HbAA
25	Femenino	8	HbAA
26	Masculino	8	HbAA
27	Masculino	8	HbAA
28	Masculino	12	HbAA
29	Masculino	10	HbAA
30	Masculino	10	HbAA
31	Femenino	4	HbAA
32	Masculino	8	HbAA
33	Femenino	12	HbAA
34	Femenino	7	HbAA
35	Femenino	8	HbAS
36	Masculino	9	HbAA
37	Masculino	11	HbAA
38	Masculino	5	HbAA
39	Femenino	11	HbAA
40	Masculino	8	HbAA
41	Femenino	8	HbAA



Identificación de fenotipos de hemoglobina prevalentes en niños menores de 15 años del municipio de Santa Rosa del Peñón y su relación con los valores de la BHC



42	Femenino	6	HbAA
43	Masculino	8	HbAA
44	Femenino	9	HbAA
45	Femenino	4	HbAA
46	Masculino	10	HbAS
47	Femenino	10	HbAA
48	Femenino	13	HbAA
49	Femenino	12	HbAA
50	Masculino	9	HbAA
51	Masculino	7	HbAA
52	Masculino	12	HbAA
53	Masculino	11	HbAA
54	Masculino	9	HbAA
55	Masculino	8	HbAS
56	Femenino	8	HbAA
57	Masculino	6	HbAA
58	Masculino	10	HbAA
59	Femenino	4	HbAA
60	Femenino	7	HbAA
61	Femenino	4	HbAA
62	Femenino	6	HbAA
63	Femenino	11	HbAA
64	Masculino	9	HbAA
65	Femenino	11	HbAA
66	Femenino	5	HbAA
67	Femenino	5	HbAA
68	Masculino	5	HbAA
69	Femenino	6	HbAA
70	Masculino	7	HbAA
71	Femenino	10	HbAA
72	Femenino	8	HbAA
73	Masculino	8	HbAA
74	Masculino	5	HbAA
75	Masculino	5	HbAA
76	Femenino	11	HbAA
77	Masculino	11	HbAA
78	Masculino	10	HbAA
79	Masculino	10	HbAA
80	Masculino	10	HbAA
81	Femenino	11	HbAA
82	Masculino	9	HbAA
83	Masculino	12	HbAA
84	Femenino	11	HbAA
85	Femenino	6	HbAA
86	Femenino	6	HbAS
87	Femenino	11	HbAA



Identificación de fenotipos de hemoglobina prevalentes en niños menores de 15 años del municipio de Santa Rosa del Peñón y su relación con los valores de la BHC



88	Femenino	9	HbAA
89	Masculino	6	HbAA
90	Masculino	9	HbAA
91	Femenino	7	HbAS
92	Masculino	9	HbAS
93	Femenino	5	HbAS
94	Femenino	9	HbAA
95	Femenino	8	HbAS
96	Femenino	8	HbAS
97	Masculino	11	HbAS
98	Femenino	10	HbAA
99	Masculino	8	HbAA
100	Femenino	9	HbAA

Anexo 1. Resultados de electroforesis.