

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EL PAPEL DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN LAS HEMOGLOBINOPATÍAS Y
SU SITUACIÓN ACTUAL EN COSTA RICA

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar por el grado y título de Especialista en Hematología

GABRIELA VANESSA SANDÍ CALDERÓN

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

DEDICATORIA

Dedico este logro a mis compañeros de especialidad en Hematología. Durante estos dos años, hemos compartido un vínculo académico y cooperativo que ha enriquecido nuestra formación y ha fortalecido nuestra amistad. Agradezco profundamente todo el apoyo mutuo y los momentos compartidos que han hecho de esta experiencia algo inolvidable. Juntos, hemos superado desafíos y alcanzado metas, y estoy orgullosa de haber recorrido este camino junto a ustedes.

AGRADECIMIENTO

A mis padres, Patricia y Luis, les agradezco la vida, el amor, el apoyo, la fuerza y la motivación que me han brindado a lo largo de todos estos años. Gracias por creer en mí y por estar a mi lado, ayudándome a llegar hasta aquí y lograr el triunfo como microbióloga y ahora como especialista en Hematología. Sin su constante respaldo, este logro no habría sido posible.

A mi pareja, Carlos Luis, por estar siempre presente, animándome, apoyándome y ayudándome incondicionalmente durante estos años juntos. Tu paciencia y comprensión durante la realización de esta especialidad, que culmina con este trabajo bibliográfico, han sido invaluable. Gracias por ser mi compañero en este viaje y por todo tu amor y apoyo.

Agradezco profundamente a mi comité evaluador, María José Suárez, Mariela Solano y Mariela Chacón, por el tiempo y la dedicación que han invertido en guiarme durante la realización de este trabajo. Asimismo, agradezco su orientación, consejos y su compromiso hacia a mi formación académica y profesional.

Este trabajo final de graduación fue aceptado por la Comisión del Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Hematología.



Esp. María José Suarez Sánchez

Profesora tutora



Esp. Mariela Solano Vargas

Lectora



Esp. Mariela Chacón Murillo

Lectora



Gabriela Vanessa Sandí Calderón

Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	ii
HOJA DE APROBACIÓN	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
RESUMEN	v
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
METODOLOGÍA	4
CAPÍTULO 1. TALASEMIAS Y HEMOGLOBINOPATÍAS	5
α -Talasemia.....	7
β -Talasemia.....	9
Variantes de hemoglobina.....	11
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS DE HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS	15
Técnicas analíticas basadas en proteínas	16
Técnicas analíticas basadas en biología molecular.....	21
CAPÍTULO 3. TÉCNICAS UTILIZADAS EN COSTA RICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS.....	34
Técnicas utilizadas en laboratorios del sector público.....	34
Técnicas utilizadas en el sector privado	37
CAPÍTULO 4. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS.....	40
Diagnósticos complejos de hemoglobinopatías y talasemias	41
Detección de parejas portadoras y diagnóstico prenatal.....	43
Tamizaje neonatal	46
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	53

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue analizar las principales técnicas moleculares utilizadas en el diagnóstico de hemoglobinopatías, su disponibilidad e importancia en Costa Rica. Para ello, se llevó a cabo una revisión bibliográfica que describió las técnicas moleculares empleadas a nivel mundial en el diagnóstico de hemoglobinopatías y se identificaron las que actualmente están disponibles en Costa Rica, tanto en los laboratorios del sector público y como en el sector privado.

Las hemoglobinopatías pueden resultar en hallazgos hematológicos anormales y diversos, dependiendo de la mutaciones específicas presentes. El diagnóstico inicial se realiza con técnicas analíticas, como las técnicas electroforéticas, que caracterizan a la hemoglobina. El diagnóstico definitivo utiliza comúnmente técnicas como PCR, secuenciación de Sanger y amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples. Otras técnicas más especializadas son la secuenciación de segunda y tercera generación que se reservan para casos complejos donde los métodos convencionales no son suficientes. Debe tomarse en cuenta las ventajas y limitaciones específicas de cada técnica para escoger la más apropiada en cada caso.

Los laboratorios nacionales presentan diferencias significativas entre los sectores público y privado en cuanto a las técnicas diagnósticas disponibles. En el sector público, se realiza principalmente el tamizaje de estas enfermedades mediante la electroforesis capilar de zona. En contraste, en el sector privado, pocos laboratorios realizan electroforesis *in situ*; algunos la envían a laboratorios externos, tanto nacionales como internacionales. Además, utilizan técnicas con más limitaciones lo que podrían resultar en la no detección de variantes de hemoglobina poco frecuentes.

El diagnóstico molecular de hemoglobinopatías y talasemias es esencial para identificar parejas portadoras y realizar diagnósticos prenatales, lo que facilita un adecuado consejo genético. Estas técnicas permiten determinar con certeza los riesgos de transmitir estas enfermedades, proporcionando a las parejas la información necesaria para tomar decisiones informadas sobre la planificación familiar y reducir la incidencia de hijos gravemente afectados. Además, la implementación de estas técnicas en el tamizaje neonatal es crucial para confirmar casos sospechosos de síndromes drepanocíticos, asegurando una detección temprana y precisa que disminuya significativamente la morbilidad y mortalidad, mejorando con esto la calidad de vida de estos pacientes desde temprana edad.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de técnicas utilizadas para el diagnóstico de desórdenes de hemoglobina.....	32
Tabla 2. Técnicas utilizadas en los principales laboratorios públicos y privados de Costa Rica para el diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias.	38
Tabla 3. Recomendación para el diagnóstico prenatal de hemoglobinopatías y talasemias.	43
Tabla 4. Patrón de resultados del HPLC neonatal y su enfermedad asociada.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Electroferograma representativo del patrón de separación de hemoglobinas utilizando electroforesis capilar.	18
Figura 2. Patrón de reactividad de la hemoglobina S en la prueba rápida de solubilidad con ditionito de sodio.	19
Figura 3. Separación de hemoglobinas HbS, HbD-Punjab y Hb Tak en electroforesis de acetato de celulosa a pH alcalino (A) y HPLC (B).	20
Figura 4. Resultados de un PCR múltiplex de alelo específico para la diferenciación de Hb Tak, Hb D-Punjab y HbS.	22
Figura 5. Patrón de bandas en la prueba de hibridación reversa de ADN de una familia. ..	24
Figura 6. Histogramas de resultados de una corrida de MLPA.	26
Figura 7. Algoritmo para determinar cuándo utilizar técnicas moleculares para diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias a partir de la sospecha clínica del cuadro.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ASO	Oligonucleótidos Específicos del Alelo
CATSA	Análisis Integral de Alelos de Talasemia
CHCM	Hemoglobina Corpuscular Media
CIHATA	Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines
DGP	Diagnóstico genético preimplantacional
DHHNN	División de Hemato-Oncología Especializada del Laboratorio Clínico del Hospital de Niños
Hb Barts	Hemoglobina de Barts
HbA	Hemoglobina A
HbA ₂	Hemoglobina A ₂
HbC	Hemoglobina C
HbCS	Hemoglobina de Constant Spring
HbD	Hemoglobina D
HbE	Hemoglobina E
HbF	Hemoglobina F
HbH	Enfermedad por Hemoglobina H
HbS	Hemoglobina S
HCG	Hospital Calderón Guardia
HCM	Hemoglobina Corpuscular Media
HPFH	Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HSJD	Hospital San Juan de Dios
Lab PNT	Laboratorio del Programa Nacional de Tamizaje Neonatal y Alto Riesgo
LCHCB	Laboratorio Clínico del Hospital Clínica Bíblica
LSJ	Laboratorio San José
MLPA	Amplificación de Sondas Dependiente de Ligandos Múltiples
NGS	Secuenciación de Segunda Generación
ONT	Oxford Nanopore Technologies
PacBio	Pacific Biosciences
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TGS	Secuenciación de Tercera Generación
VCM	Volumen Corpuscular Medio
α -talasemia	Alfa talasemia
β -talasemia	Beta talasemia

INTRODUCCIÓN

Las hemoglobinopatías, desórdenes hereditarios de la molécula de hemoglobina, se encuentran dentro de las enfermedades genéticas más comunes (Harteveld & Higgs, 2010). El material genético que codifica para la globina puede sufrir mutaciones que llevan a una producción anormal de hemoglobina y que causan una variante proteica (hemoglobinopatía), mientras que las variantes que afectan la expresión llevan a una producción reducida de una cadena de globina resultando en talasemia (Achour et al., 2021).

La prevalencia de portadores de hemoglobinopatías es cerca del 5,2% en la población mundial. Sin embargo, dependiendo de la región esa prevalencia puede ser tan alta como un 18.2% en África (Modell & Darlison, 2008). Debido a su alta prevalencia, muchos países han implementado programas de detección de portadores, para ofrecer consejo genético a las parejas en riesgo y con ello reducir el número de nacidos con estas condiciones (Sabath, 2023).

Estos desórdenes pueden resultar en hallazgos hematológicos anormales y diversos, dependiendo de la mutaciones específicas presentes. El diagnóstico inicial se realiza con técnicas analíticas que caracterizan a las proteínas que conforman la hemoglobina como la electroforesis, cromatografías y tinciones especiales. El diagnóstico definitivo utiliza más comúnmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de Sanger. La técnica de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) es utilizada en la clínica para la detección de deleciones. La secuenciación de segunda generación (NGS) no se utiliza todavía ampliamente y tiene limitaciones en la caracterización de desórdenes de la α -globina (Sabath, 2023).

En Costa Rica desde el 2005 a través del programa de tamizaje neonatal se realiza la detección de hemoglobina S mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En el 2012 se comenzó a secuenciar mediante secuenciación de Sanger la región de la hemoglobina S (HbS) y hemoglobina C (HbC) en la muestra de tamizaje neonatal. En el 2015, se comenzó con la secuenciación completa del gen *HBB* y en el 2017 se aumentó la especificidad del análisis al realizar la técnica de MLPA. Estas técnicas han permitido la

detección temprana de hemoglobinopatías S y betatalasemias en la población costarricense (Calderón et al., 2022).

La confirmación diagnóstica por técnicas moleculares es la mejor herramienta en el diagnóstico de estas condiciones, permite detectar la mayor cantidad de casos posibles y brindar consejo genético. Es fundamental que los profesionales en hematología comprendan el fundamento de estas técnicas, los casos en los que se deben aplicar y su disponibilidad en el país. Esto les permitirá orientar a los médicos en situaciones que requieran un análisis más profundo, garantizando así un diagnóstico oportuno que asegure un seguimiento a largo plazo, disminuya las complicaciones asociadas a la enfermedad y prevenga la aparición de nuevos casos (Calderón et al., 2022).

OBJETIVO GENERAL

Analizar las principales técnicas moleculares que se utilizan en el diagnóstico de hemoglobinopatías, su disponibilidad e importancia en Costa Rica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar los aspectos genéticos más relevantes de las talasemias y hemoglobinopatías.
2. Describir los principales métodos diagnósticos utilizados en el diagnóstico de talasemias y variantes del gen *HBB* de la hemoglobina.
3. Identificar las técnicas moleculares diagnósticas de hemoglobinopatías disponibles en Costa Rica.
4. Analizar la importancia del uso de las técnicas moleculares en la confirmación del diagnóstico de hemoglobinopatías.

METODOLOGÍA

Se realizó una revisión bibliográfica en la que se describieron las principales técnicas moleculares que se utilizan en el diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias a nivel mundial y las disponibles en Costa Rica. Se consultaron artículos científicos publicados en su mayoría en revistas indexadas en el periodo del 2013 al 2024.

Las bases de datos consultadas fueron las disponibles en el SIBDI de la Universidad de Costa Rica utilizando el filtro de “Salud” y con las palabras claves en español e inglés: hemoglobinopatía, talasemia, diagnóstico molecular, Costa Rica.

Los centros diagnósticos fueron consultados por medio de un cuestionario electrónico para identificar las técnicas moleculares diagnósticas que se utilizan en Costa Rica en el sector público: División de Hemato-Oncología Especializada del Laboratorio Clínico del Hospital de Niños, el Laboratorio del Programa Nacional de Tamizaje Neonatal y Alto Riesgo, el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines. Se planteó la consulta a los laboratorios privados: el Laboratorio Clínico del Hospital Clínica Bíblica, Laboratorios LABIN y Laboratorio San José.

CAPÍTULO 1. TALASEMIAS Y HEMOGLOBINOPATÍAS

La hemoglobina es la proteína principal responsable del transporte de oxígeno en el cuerpo humano y el principal componente de los glóbulos rojos. En los adultos la Hemoglobina A (HbA) ($\alpha_2\beta_2$) es una proteína tetramérica codificada en dos clústers de genes en dos familias separadas de genes de globina, ubicados en diferentes cromosomas (Harteveld et al., 2022).

El clúster de genes de alfa globina contiene 1 gen embrionario ζ (*HBZ1*) y un par de genes alfa ligados (*HBA1* y *HBA2*) localizados en el cromosoma 16. El clúster de genes de beta globina, localizado en el cromosoma 11, contiene los genes expresados prenatalmente, 1 gen embrionario ϵ (*HBE*), 2 genes embrionario/fetal γ (*HBG1* y *HBG2*), y los expresados posnatalmente, los genes δ (*HBD*) y β (*HBB*) (Harteveld et al., 2022; Musallam et al., 2024).

La expresión de los genes de globinas está regulada de manera específica según la etapa del desarrollo y el tejido, lo que lleva a una expresión de diferentes tipos de hemoglobina. Durante la fase embrionaria, los genes *HBZ1* y *HBE* expresan la Hb de Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), II ($\alpha_2\epsilon_2$) y la Hb de Portland ($\zeta_2\gamma_2$), en las siguientes 6 semanas estos genes dejan de expresarse y la hemoglobina fetal (HbF) es expresada ($\alpha_2\gamma_2$). Cerca del nacimiento ocurre un paso de represión de la expresión del gen γ y se favorece la expresión del gen de β -globina, resultando en un decrecimiento del nivel de HbF hasta el 0.5% y un incremento de la síntesis de HbA ($\alpha_2\beta_2$) hasta aproximadamente un 97-98%, al llegar a los 6 meses postnacimiento. Al mismo tiempo, la expresión del gen *HBD* comienza y se sintetiza hemoglobina A₂ (HbA₂) ($\alpha_2\delta_2$) en un 2-3% (Harteveld et al., 2022).

Las talasemias son enfermedades autosómicas recesivas caracterizadas por desórdenes en la síntesis de hemoglobina causados por defectos moleculares en los genes de las globinas. Estas se encuentran dentro de las enfermedades genéticas más prevalentes en el mundo. Las principales formas de alfa y beta talasemia resultan de una mutación en genes de globina que lleva a un déficit o a cambios cuantitativos en la producción de las cadenas alfa-globina o beta-globina de la hemoglobina del adulto, respectivamente (Musallam et al., 2024).

La clasificación de las variantes a nivel de ADN se hace de acuerdo con la afectación que se tiene en la cadena de globina. Se denomina α -cero (α^0) cuando *HBA1* y *HBA2* fueron eliminados en cis o α -plus (α^+) cuando un gen fue eliminado o no es funcional. β -cero (β^0) y β -plus (β^+), a la falta de expresión total o a la expresión disminuida, respectivamente. Otros rearrreglos genéticos como el gen híbrido δ - β y γ - δ - β -talasemia llevan a la Hb Lepore o a la Persistencia Hereditaria de Hemoglobina Fetal (HPFH) con diferentes niveles de expresión de HbF (Harteveld et al., 2022).

La variante de hemoglobina más común clínicamente es la HbS, que causa el síndrome drepanocítico cuando es homocigota o en combinación con otras variantes de Hb como HbC, HbD, HbE, entre otras, o en combinación con β -talasemia. Existen otras variantes de Hb en los genes α - y β -globina que pueden resultar en un amplio espectro de condiciones clínicas, como eritrocitosis, policitemia y anemias hemolíticas (Harteveld et al., 2022).

Se ha estimado que aproximadamente un 5% a 20% de la población mundial es portadora de una o más mutaciones de α -talasemia y un 1.5% son portadores de una o más mutaciones de β -talasemia (Musallam et al., 2024). Se calcula que cada año suceden alrededor de 500 000 nacimientos de bebés con desórdenes de hemoglobina hereditarios en condiciones sintomáticas, de los cuales la mayoría corresponden a pacientes con síndromes drepanocíticos (300 000 aproximadamente). De lo anterior, se puede deducir que debe haber muchos más nacimientos de portadores asintomáticos o levemente sintomáticos que no se registran en estas estadísticas (Harteveld et al., 2022; Wendt et al., 2023).

En regiones endémicas de malaria se observa una alta prevalencia de estas hemoglobinopatías, extendiéndose desde el Mediterráneo, África Subsahariana, India y el sureste de Asia. La evidencia señala un favoritismo por selección natural del estado portador que confiere un efecto protector contra la infección por *Plasmodium falciparum* que se pierde en el no portador. La β -talasemia mayor es considerada un problema de salud en el Mediterráneo y el Medio Oriente, lo que ha llevado a crear programas de tamizaje de portadores para la prevención de nacimientos de niños afectados. Los síndromes de β -talasemia/HbE son más comunes en el Sureste Asiático, así como los síndromes relacionados

a la α^0 -talasemia, mientras que la HbS es más común en África Subsahariana, India y el Medio Oriente (Harteveld et al., 2022; Wendt et al., 2023).

α -Talasemia

Los individuos sanos tienen 4 genes de alfa-globina ($\alpha 2\alpha 1/\alpha 2\alpha 1$) en dos clústers de genes *HBA1* y *HBA2* con secuencias codificantes idénticas. La alfa-talasemia es causada por mutaciones delecionales (-) o no delecionales (α^T) en los genes de la alfa-globina que llevan a su producción defectuosa. Aproximadamente, se han descrito 130 defectos moleculares diferentes que causan alfa-talasemias, principalmente deleciones de fragmentos en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 16 (Ferrão et al., 2017; Musallam et al., 2024; Sabath, 2023).

La deleción o inactivación de uno de los genes de alfa-globina se designa como α^+ -talasemia; α^+ -talasemia heterocigota al darse en un cromosoma 16 ($-\alpha / \alpha$), α^+ -talasemia homocigota cuando ocurre en ambos cromosomas 16 ($-\alpha / -\alpha$). Si la deleción o inactivación ocurre en ambos genes de α -globina del mismo cromosoma 16 se refiere a ella como α^0 -talasemia ($- / - / -\alpha$) (Musallam et al., 2024).

Más de 40 mutaciones de α^0 -talasemia se han descubierto y se han designado según la región donde fue descubierta de primero; las mutaciones delecionales de mayor frecuencia de α^0 -talasemia incluyen la del Sureste de Asia ($- -^{SEA} / -\alpha$), Filipino ($- -^{FIL} / -\alpha$) y Mediterránea ($- -^{MED} / -\alpha$) y producen una condición más severa, mientras que las deleciones de α^+ -talasemia heterocigotas más comunes son las deleciones ($-\alpha^{3.7kb}$ y la $-\alpha^{4.2kb}$) que remueven solamente un gen de α -globina y producen cuadros de anemia microcítica hipocrómica leves (Ferrão et al., 2017; Musallam et al., 2024).

Las mutaciones no delecionales que producen α^+ -talasemia producen variantes estructurales de la α -globina o variantes estructuralmente normales, pero expresadas en menor cantidad. Se han detectado más de 30 variantes estructurales de α -globina, siendo la más común la Hemoglobina de Constant Spring (HbCS) en países del Sureste Asiático. Esta se produce por una mutación en el codón de terminación en el gen *HBA2* que produce la $\alpha 2$ -globina (HBA2:c.427T>C). El producto de esta mutación se traduce en una cadena de α -

globina elongada con 31 residuos de aminoácidos adicionales y por su naturaleza inestable puede no ser detectada por algunos métodos diagnósticos utilizados en algunos laboratorios (Azma et al., 2016; Wee et al., 2009).

La enfermedad por Hemoglobina H (HbH) se puede presentar cuando ocurre una delección en 2 genes de α -globina en un cromosoma 16 y en un gen del cromosoma 16 ocurre una tercera delección, es inactivado o sufre un cambio cualitativo, dejando solamente un gen de α -globina funcional. Los casos que resultan de HbH delecionales suelen cursar con manifestaciones clínicas leves, como anemia moderada y leve esplenomegalia y por lo general no requieren transfusiones sanguíneas (Calderón et al., 2020; Musallam et al., 2024).

Las manifestaciones clínicas y hematológicas en pacientes con un genotipo no delecional son más graves en comparación con aquellos que tienen la enfermedad por HbH delecional y pueden ser notablemente variables. Los pacientes con enfermedad por HbH no delecional, como el producido por la HbCS en estado homocigoto o en concomitancia con otras delecciones, presentan un cuadro clínico de crisis hemolíticas desde las primeras etapas de la vida, son a menudo más dependientes de transfusiones, tienen mayor riesgo de crecimiento deficiente, esplenomegalia, sobrecarga de hierro y cálculos biliares (Calderón et al., 2020; Musallam et al., 2024).

La Hemoglobina de Barts (Hb Barts) o síndrome de *Hydrops fetalis* (o hidropesía fetal) ocurre cuando los 4 genes de α -globina sufren una delección o son inactivados (α^0 -talasemia homocigota) produciendo un cuadro fatal incompatible con la vida en la gran mayoría de los casos (Musallam et al., 2024). Sin embargo, en las últimas tres décadas, gracias a las mejoras en las intervenciones intrauterinas y en los cuidados intensivos perinatales, se ha reportado un número creciente de sobrevivientes a esta condición. El registro internacional cuenta con 69 pacientes, de los cuales 39 han sobrevivido más allá de los 5 años y 18 de ellos ahora tienen más de 10 años. A pesar estos avances, estos pacientes presentan déficits de crecimiento y desarrollo neurológico, además de requerir transfusiones de por vida (Songdej et al., 2017).

La heredabilidad de la α -talasemia es compleja. Cada persona hereda dos genes de α -globina de cada padre. Si a ambos padres les falta uno o más genes, sus hijos estarían en riesgo de ser portadores del rasgo α -talasémico, enfermedad por HbH o Hb Barts. El riesgo depende de cuantos genes presentan la delección o son inactivados, cuál gen de α -globina (*HBA1* o *HBA2*) es el afectado, y si los genes afectados están en uno o ambos cromosomas (Musallam et al., 2024).

El número de genes de α -globina funcionales determina la extensión del desbalance de las cadenas α -globina/no- α -globina, y con ello, la severidad de la α -talasemia. Debido a que dos tercios de la síntesis de α -globina viene del gen *HBA2* ($\alpha 2$), mutaciones que lo afectan están más asociadas a síntesis de α -globina más severamente reducidas. Una producción menor al 70% de lo normal en un feto resulta en un exceso de cadenas de γ -globina que forman tetrámeros (Hb Barts). En el caso de adultos, se produce un exceso de cadenas β formando tetrámeros insolubles (HbH). Tanto la HbH como la Hb Barts se unen al oxígeno con alta afinidad, por lo que el transporte/liberación de oxígeno en tejidos no se da de forma efectiva (Musallam et al., 2024).

β -Talasemia

En el caso de las β -talasemias se han observado todo tipo de variantes patogénicas en el gen de la β -globina que van desde mutaciones puntuales, mutaciones transcripcionales y traduccionales, así como mutaciones en el procesamiento del ARN. Se han descrito más de 350 mutaciones en este gen, la mayoría de las mutaciones puntuales se dan en sitios de importancia funcional de esta globina. Sin embargo, solo el 40% de esas mutaciones producen el 90% o más de las β -talasemias alrededor del mundo (Jaing et al., 2021; Rao et al., 2024).

Las variantes patogénicas más comunes vistas en β -talasemia son las sustituciones de un solo nucleótido y las inserciones/delecciones de oligonucleótido que afectan la expresión del gen *HBB* a través de varios mecanismos. Las mutaciones puntuales afectan la expresión de la β -globina en tres diferentes categorías: mutaciones que llevan a una transcripción defectuosa del gen (a nivel del promotor y la región no traducida 5'UTR), mutaciones que

afectan el procesamiento del ARN mensajero (ARNm) (splice-junction, mutaciones en secuencias consenso, poliadenilación y otras mutaciones en regiones 3'UTR), y mutaciones traducionales que resultan en ARNm anormal (sinsentido, cambio en el marco de lectura, mutaciones en el codón de inicio). Estos defectos representan la mayoría de los alelos de β -talasemia (Jaing et al., 2021).

Las β -talasemias también pueden ser causadas por deleciones, aunque es poco común. Dos deleciones remueven el extremo 3' terminal, pero preservan la integridad del extremo 5'. La deleción del extremo 3' del gen *HBB* es una causa común de la β^0 -talasemia en los indios asiáticos y constituye casi un tercio de las β -talasemias en esta población. La otra deleción remueve una región común del promotor del gen *HBB*. Ambas deleciones están asociadas con una persistencia alta de HbA₂ y un incremento variable de la HbF en heterocigotos. Se han descrito 18 deleciones restringidas al gen *HBB* (Jaing et al., 2021).

Dependiendo del grado de pérdida de expresión la β -talasemia se clasifica en β^0 -talasemia, cuando la proteína del gen *HBB* no se produce, o β^+ -talasemia, cuando se reduce la cantidad de proteína producida. Clínicamente, estos cuadros se solían clasificar de la siguiente manera: el cuadro producido por un alelo afectado, es decir, heterocigotos, se conoce como β -talasemia menor o rasgo β -talasémico. Los heterocigotos compuestos, que presentan dos alelos β^+ o un alelo β^+ y otro β^0 , se conocen como β -talasemia intermedia. Los individuos con dos alelos β^0 presentan β -talasemia mayor. Esta última se manifiesta en aproximadamente la mitad de las mutaciones no delecionales, ya que estas inactivan por completo el gen *HBB* (Jaing et al., 2021; Sabath, 2023).

Más recientemente, la clasificación clínica de las talasemias divide a los pacientes en talasemia dependiente de transfusiones y talasemia no dependiente de transfusiones, según la severidad del fenotipo causado por el desequilibrio de la relación entre las alfa y beta globinas derivado de la amplia gama de variantes en estado homocigoto o heterocigoto compuesto (Cappellini & Motta, 2017).

Los pacientes con talasemias dependientes de transfusiones son los pacientes con β -talasemia mayor, Hemoglobina E/ β -talasemia severa y α -talasemia mayor (Enfermedad por

HbH no delecional y Hb Barts). Los pacientes que no son dependientes de transfusiones, pero pueden requerirlas de forma ocasional son los pacientes con β -talasemia intermedia, Hemoglobina E/ β -talasemia (leve o moderada) y α -talasemia intermedia (Enfermedad por HbH delecional) (Farmakis et al., 2022; Musallam et al., 2013).

Los heterocigotos de β -talasemia tienen un efecto protector de los daños que produce la infección por *Plasmodium falciparum*, parásito causante de la malaria. La selección natural aumentó la frecuencia de estos genes en países y regiones tropicales y sub-tropicales donde la malaria es más prevalente. A pesar de lo anterior, debido a las migraciones poblacionales las β -talasemias también se pueden encontrar con una frecuencia importante en países del norte y este de Europa y norte América, volviéndola una enfermedad global (Jaing et al., 2021).

Variantes de hemoglobina

Anteriormente se mencionó que la variante de hemoglobina más relevante clínicamente es la que produce HbS en el cuadro de los síndromes drepanocíticos. Este ocurre por una mutación puntual, que sustituye el aminoácido 20 de una adenina por una tiamina (c.20 A>T) en el codón 7 del gen *HBB* (p.Glu7Val) (National Library of Medicine, 2024c). De esta sustitución, el ácido glutámico es reemplazado por una valina, lo que lleva a la formación de hemoglobina S. Esta HbS se polimeriza en un estado desoxigenado y se vuelve rígida e insoluble, lo que da lugar a la formación de células en forma de hoz (drepanocitos). El mecanismo patogénico depende de la polimerización de HbS, la cual se dispara en condiciones de hipoxia (Arishi et al., 2021).

La anemia drepanocítica se hereda al tener dos alelos con la mutación β^S/β^S (homocigoto) o en el caso de heredar diferentes tipos de alelos heterocigotos compuestos como drepanocitosis – β -talasemia (HbS β -talasemia), drepanocitosis – enfermedad por hemoglobina C (HbSC) y otras combinaciones. El rasgo drepanocítico se presenta en condición heterocigota (β^A/β^S), donde solo un alelo afectado produce hemoglobina insoluble, y el otro de tipo silvestre produce hemoglobina A (Arishi et al., 2021).

La HbC es la tercera variante de hemoglobina más común a nivel mundial. Esta se encuentra en un 17% a 28% de la población de África del Este y entre un 2% y 3% de los afroamericanos. Esta hemoglobina presenta una mutación en el codón 7 del gen *HBB*, que lleva a un reemplazo del ácido glutámico por una lisina en el aminoácido 19 c.19G>A (p.Glu7Lys) (National Library of Medicine, 2024b). La lisina tiene una carga +1 y el ácido glutámico una carga -1, como resultado de esta sustitución el intercambio neto de cargas es +2, lo que lleva a un efecto estructural diferente en la molécula de hemoglobina, que similar a la HbS, forma polímeros intracelulares, siendo una hemoglobina menos soluble que la HbA dentro de los glóbulos rojos y que se cristaliza en un estado oxigenado. La enfermedad por hemoglobina C se manifiesta en el estado homocigoto (HbCC) y produce un cuadro intermedio en comparación a la drepanocitosis. El estado portador heterocigoto (HbAC) es asintomático (Randolph, 2020).

La HbE tiene una prevalencia del 30% en el sureste asiático y puede llegar hasta un 50% en áreas de Camboya, Laos y Tailandia. Es poco frecuente en afroamericanos y blancos. Esta hemoglobina se produce del intercambio de una lisina por un ácido glutámico en la posición 27 de la β -globina c.79G>A (p.Glu27Lys) (National Library of Medicine, 2024a). Como resultado de esta sustitución se produce un cambio en la carga neta 2+, pero por la posición de la sustitución, no ocurre polimerización de la hemoglobina. Sin embargo, la sustitución del aminoácido inserta un lugar de splicing críptico que lleva a la unión del exón 1 y el intrón 1 causando un splicing alternativo anormal y una disminución de la transcripción del ARNm de la cadena de globina de la HbE. De este modo, la mutación de HbE produce un efecto cualitativo (por la sustitución del aminoácido en la cadena de globina) y un defecto cuantitativo con un fenotipo tipo β -talasemia (por la disminución en la producción de la cadena de globina mutada). La HbE es frecuentemente heredada junto a α -talasemia, β -talasemia y otras variantes de hemoglobinas incluida la HbS. Lo anterior crea un amplio rango de severidades clínicas posibles, siendo la HbE- β -talasemia la más severa (Randolph, 2020).

Otras variantes de hemoglobina menos comunes son la HbO^{Arab}, la HbD y la HbG. La HbO^{Arab} es una variante de β -globina causada por la sustitución de una lisina por ácido

glutámico en la posición 122 c.364G>A (p.Glu122Lys) (National Library of Medicine, 2021). Es un desorden raro encontrado en Kenia, Israel, Egipto y un 0.4% de los afroamericanos. La HbD es un grupo de al menos 16 variantes de la cadena de β -globina y la HbG es un grupo de 6 variantes de la cadena α -globina. La HbD- Punjab y HbD-Los Ángeles son idénticas en donde una glutamina reemplaza a un ácido glutámico en la posición 121 de la β -globina (HBB: c.364G>C). La HbD-Punjab ocurre en un 3% de la población noroeste de India y la HbD-Los Ángeles se ha visto en menos del 2% de los afroamericanos. La HbG-Philadelphia es una variante de α -globina en la que se reemplaza una asparagina por una lisina en la posición 68. Esta última es la variante de HbG más frecuentemente encontrada en afroamericanos y se observa con más frecuencia que las variantes de HbG (Randolph, 2020).

El síndrome heterocigoto compuesto de HbSC es el más común y resulta en un defecto estructural en la molécula de globina en la cual hay una sustitución de diferentes aminoácidos en cada una de las cadenas de β -globina. En la posición 7, en una de las cadenas de β -globina un ácido glutámico es reemplazado por una valina (HbS) y en la otra cadena por una lisina (HbC). La prevalencia de esta condición es de un 25% en África del Este (Randolph, 2020).

El heterocigoto compuesto de HbS con β -talasemia es la causa más común de síndrome drepanocítico en pacientes del Mediterráneo y es el segundo más común luego de la HbSC. Causa usualmente un síndrome clínico semejante a una drepanocitosis moderada, aunque la severidad depende de la producción de la cadena de β -globina del gen afectado por la β -talasemia. Si no se produce β -globina, el curso clínico sería similar a un HbSS (Randolph, 2020).

La coherencia de la α -talasemia es uno de los modificadores genéticos primarios relacionados con la severidad del síndrome drepanocítico. En la población de África Subsahariana se ha estimado que entre un 30-35% de los pacientes con drepanocitosis son también heterocigotos ($\alpha\alpha/\alpha-$) y un 3-5% son homocigotos para la delección ($\alpha-/alpha-$). Está bien establecido que la alfa talasemia en estos pacientes confiere protección contra los accidentes

cerebrovasculares, las complicaciones renales, el priapismo y las úlceras (Brewin et al., 2022).

Los efectos beneficiosos derivan de la concentración reducida de hemoglobina en cada eritrocito, medido por una menor concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), lo que disminuye la tendencia de la HbS de polimerizar, llevando a una mejor deformabilidad de los glóbulos rojos, disminución de la tasa de hemólisis y aumento de los valores de hemoglobina total (Brewin et al., 2022).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS DE HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS

El diagnóstico de las hemoglobinopatías y talasemias se puede dividir en dos grupos de técnicas analíticas. En el primer grupo se encuentran las técnicas analíticas basadas en proteínas como la electroforesis de hemoglobina y la cromatografía líquida de alta eficiencia. En el segundo grupo se ubican las técnicas de diagnóstico molecular como la reacción en cadena de la polimerasa, amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples, secuenciación de Sanger, secuenciación de segunda generación, secuenciación de tercera generación, entre otras que se describen en este capítulo en detalle (Sabath, 2023).

El estudio inicia usualmente con un paciente que presenta anemia. Las pruebas de laboratorio que se deben realizar inicialmente son: hemograma completo, morfología de los glóbulos rojos y recuento de reticulocitos, estudios férricos, incluidas la medición de la saturación de la transferrina y el nivel de ferritina (Musallam et al., 2024).

En cuanto a los parámetros que brindan los analizadores hematológicos automatizados, al haber una menor producción de globina, los glóbulos rojos talasémicos muestran una morfología microcítica e hipocrómica. El volumen corpuscular medio (VCM) que define el tamaño de los eritrocitos y la hemoglobina corpuscular media (HCM) que cuantifica la cantidad de hemoglobina por eritrocito se pueden encontrar disminuidos indicando una morfología eritrocitaria microcítica e hipocrómica. Sin embargo, estos valores por sí solos no pueden usarse para discriminar entre un rasgo talasémico y una deficiencia de hierro o entre una α y β -talasemia (Munkongdee et al., 2020).

Sin embargo, los recuentos de glóbulos rojos son normales o ligeramente elevados en las formas de talasemia comparados con los pacientes deficientes de hierro. El nivel de ferritina sérica es normal o ligeramente aumentado en talasemias y disminuido en anemia por deficiencia de hierro; la saturación de transferrina se encuentra normal o elevada en talasemias y disminuida en deficiencias de hierro (Musallam et al., 2024).

Cuando hay pérdida de uno de los alelos de α -globina, puede resultar en un nivel de VCM y HCM de normal a bajo. La pérdida de un alelo de cada cromosoma resulta en un

VCM de 75-80 fL, con poca o sin anemia. El diagnóstico de α^+ -talasemia muchas veces se realiza por exclusión, pacientes microcíticos sin evidencia de deficiencia de hierro y sin hallazgos electroforéticos anormales. El exceso de cadenas de β -globina de la HbH se puede detectar utilizando una tinción supravital con azul cresil brillante o en algunos casos esta fracción es detectable utilizando una electroforesis de hemoglobina. En el caso de la α^0 -talasemia los individuos típicamente tienen un VCM de 65-70 fL aproximadamente y HbH fácilmente detectable (Sabath, 2023).

En el caso de la β -talasemia menor se presenta usualmente con hemoglobinas en el rango normal o ligeramente disminuida. El recuento de glóbulos rojos se encuentra dentro del rango normal o ligeramente elevado. El VCM menor a 75 fL y el HCM menor de 26 pg. El recuento de reticulocitos se encuentra dentro del intervalo de referencia o ligeramente aumentado. En el frotis de sangre periférica además se puede observar poiquilocitosis dada por codocitos y eliptocitos; e inclusiones como eritrocitos con punteado basófilo (Keohane, 2020).

En las β -talasemia mayores sin tratar, los niveles de hemoglobina pueden llegar a ser tan bajos como 3-4 g/dL. El MCV de 50-70 fL y el frotis de sangre periférica muestra una marcada microcitosis, hipocromía, anisocitosis y poiquilocitosis dada por codocitos, dacriocitos y eliptocitos. También se puede observar basofilia difusa y eritroblastos. Es común observar inclusiones eritrocitarias como cuerpos de Howell-Jolly, cuerpos de Pappenheimer y punteado basófilo (Keohane, 2020).

Técnicas analíticas basadas en proteínas

Electroforesis de hemoglobina

Ante los hallazgos del hemograma, se procede a realizar una electroforesis de hemoglobina. Esta técnica permite la caracterización de las hemoglobinas mediante diferentes metodologías de separación electroforética. Tradicionalmente, la electroforesis utiliza una membrana de acetato de celulosa en un pH alcalino (pH 8.6) como sustrato (Sabath, 2023). En un pH alcalino, al ser la Hb una proteína cargada negativamente se dirige hacia el ánodo (+) en un campo eléctrico. Los diferentes tipos de Hb tienen diferentes cargas

y se separan entre ellas durante la corrida. Esta técnica permite la separación de las hemoglobinas HbA, HbS, HbC, HbF, sin embargo, pueden existir variantes de hemoglobina que no alteran su carga, por lo que no lograrían ser detectadas con esta técnica. Aunado a lo anterior, se debe utilizar una técnica adicional para estimar el porcentaje de cada hemoglobina. Esta técnica ofrece la ventaja de ser simple y rápida. Además, existe una modificación que implica el uso de agar de citrato a un pH 6.2, lo que permite distinguir a la HbS y la HbC de otras variantes que tienen carga y un punto isoeléctrico similares (Cela et al., 2009).

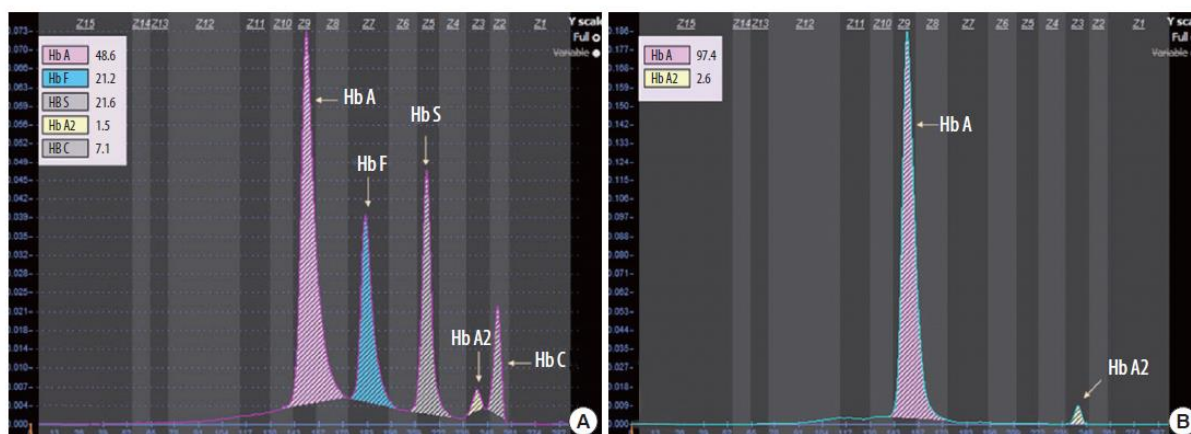
La técnica anterior fue optimizada por una electroforesis con enfoque isoeléctrico, lo que permite la separación de hemoglobinas según su punto isoeléctrico en lugar de por cargas, logrando una resolución de separación mayor. Con esta mejora se logran separar las hemoglobinas normales comunes (HbA, HbF, HbA₂) y algunas variantes comunes como HbS y HbC. También se logra detectar β -talasemia y enfermedad por HbH al observar una HbA₂ y HbH aumentadas, respectivamente. Sin embargo, requiere una evaluación muy cuidadosa y el uso de controles positivos para las variantes, para lograr distinguir entre la HbS y la HbD o HbG y la HbC de la HbE y la HbO^{Arab} (Sabath, 2023).

La electroforesis de hemoglobina capilar de zona es una técnica que separa las hemoglobinas en una solución mediante un flujo electroosmótico, dirigiéndolas del cátodo hacia el ánodo dentro de un capilar de sílica. Esto se logra mediante la aplicación de una corriente eléctrica de alto voltaje (9800 V) en un buffer alcalino. Esto permite la movilidad electroforética de las fracciones de Hb a diferentes velocidades. Para su detección se utiliza un detector fotométrico que mide la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm y grafica un electroferograma (Figura 1). De esta manera se obtiene un electroferograma dividido en 15 zonas (Munkongdee et al., 2020).

La electroforesis capilar de zona es una herramienta capaz de separar las hemoglobinas normales y la detección de la mayor cantidad de variantes de Hb. Es una técnica que permite la automatización completa del proceso, hacer varios análisis simultáneos, una separación rápida, tiene una buena resolución y exactitud en el resultado (Kim et al., 2011). Sin embargo, se debe tener cuidado al hacer identificaciones presuntivas

de variantes de Hb, así como con variantes raras que puedan migrar en una zona similar. Se recomienda, en la identificación de variantes, confirmar por otros métodos para un diagnóstico definitivo (Harteveld et al., 2022).

Figura 1. Electroferograma representativo del patrón de separación de hemoglobinas utilizando electroforesis capilar.



Nota: Se observa el patrón de separación mediante electroforesis capilar del control AFSC (A) y el control normal HbA₂ (B). Tomado de: (Kim et al., 2011)

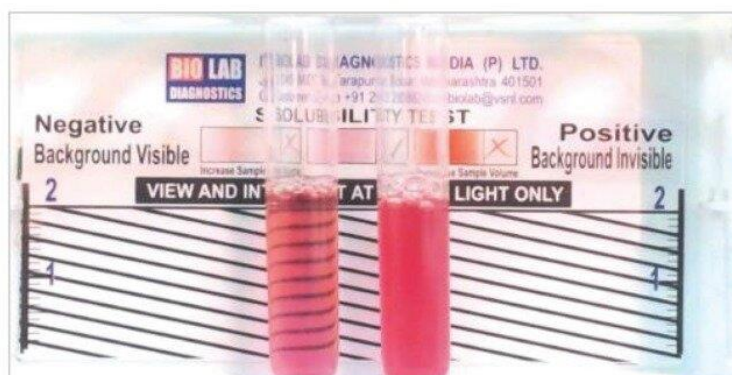
Prueba de solubilidad de la hemoglobina S

La prueba de solubilidad de la hemoglobina S se puede utilizar adicionalmente a la electroforesis para confirmar la presencia de HbS. Esta prueba se basa en la polimerización de la hemoglobina S al reducirla con ditionito de sodio, esto hace que precipite y que la solución se vuelva turbia (Figura 2). Esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad, a pesar de esto, se pueden presentar falsos negativos en pacientes con anemia severa, alfa talasemia y en aquellos donde la fracción de HbS es menor al 10%, o en pacientes con altos niveles de HbF. Se pueden observar falsos positivos en condiciones asociadas a aumentos de la viscosidad del suero (como policitemia, hiperlipidemia, marcada leucocitosis, elevación de proteínas sanguíneas) y con Hbs anormales como C-Harlem, Bart, F Alexandra, entre otras (Sáenz, 2016; Tubman & Field, 2015).

Cuando la prueba de solubilidad es positiva, se recomienda hacer el análisis de la solubilidad diferencial con urea, para verificar si la Hb que dio positivo el análisis presuntivo

es HbS o si se trata de otra Hb rara insoluble. A la solución presuntiva positiva se le añade urea, la cual tiene la capacidad de romper los enlaces formados entre las cadenas de HbS, por lo que se dispersan los sistemas cristalinos causados únicamente por la HbS y vuelve la solución transparente. Es por lo anterior, que este paso adicional en la prueba confiere una especificidad submolecular para la mutación β^S , lo que permite detectar dicha anomalía y de esta forma discriminar las otras hemoglobinas que dan positivo el análisis presuntivo, por lo que es considerada una prueba confirmatoria de HbS (Sáenz, 2016).

Figura 2. Patrón de reactividad de la hemoglobina S en la prueba rápida de solubilidad con ditionito de sodio.



Nota: Tomado de (Mandu et al., 2018).

Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

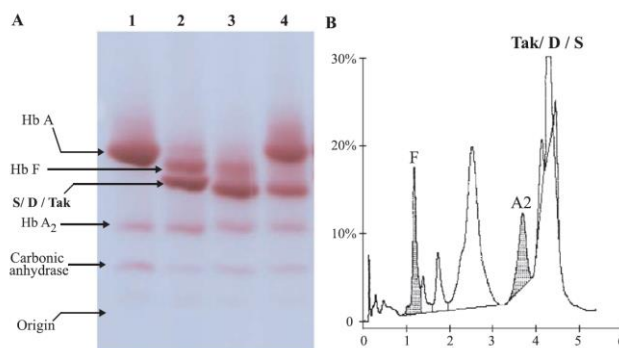
Los sistemas de HPLC separan las diferentes fracciones de hemoglobina mediante una cromatografía de intercambio catiónico. El principio de la técnica es el paso de la muestra (mezcla de hemoglobinas en solución) a una alta presión a través de una columna rellena con partículas esféricas de gel de sílice (fase estacionaria). Se aplica un volumen pequeño de muestra (5 μL) a la columna. Las diferentes hemoglobinas se adsorben en la columna con diferente intensidad basado en sus interacciones iónicas. Luego, la columna es perfundida por un buffer que varía en pH y fuerza iónica (fase móvil). Por lo que las diferentes hemoglobinas se eluyen con tiempos de retención diferentes, pero característicos en respuesta al gradiente de sal que cambia continuamente. La corrida dura aproximadamente

de 5 a 6 minutos y las fracciones son detectadas por un fotómetro que registra los cambios de absorbancia a 415 nm en el sistema (Sharma & Das, 2016).

El HPLC puede separar la HbS y la HbC de hemoglobinas que tienen una migración similar en la electroforesis. Sin embargo, no logra separar la HbE de la HbA₂, que puede ser necesaria para distinguir entre homocigotos de HbE de dobles heterocigotos de HbE/ β^0 -talasemia (Sabath, 2023). Esta técnica es altamente sensible, específica, rápida, pero con la desventaja de que es más costosa (Gupta et al., 2009).

Los sistemas automatizados de HPLC o de electroforesis capilar se consideran sistemas sensibles y precisos como métodos cualitativos y cuantitativos para analizar los diferentes componentes de los glóbulos rojos (Munkongdee et al., 2020). Los métodos electroforéticos clásicos tienen limitaciones a la hora de identificar variantes de Hb con la misma movilidad electroforética (Figura 3), en diagnósticos de portadores de HbS donde hay poca cantidad de HbS y las pruebas de solubilidad dan negativo y en el diagnóstico de heterocigotos compuestos (HbS – β -talasemia, HbS – HbD) (Gupta et al., 2009).

Figura 3. Separación de hemoglobinas HbS, HbD-Punjab y Hb Tak en electroforesis de acetato de celulosa a pH alcalino (A) y HPLC (B).



Nota: En (A) se tiene en la línea 1 individuo normal, 2 individuo Hb Tak homocigoto, 3 individuo Hb D-Punjab homocigoto y 4 individuo HbS heterocigoto. (B) Separación de una mezcla de pacientes con Hb Tak homocigoto, Hb D-Punjab y un sujeto con HbS heterocigoto por HPLC mostrando una coelución de los picos de estas hemoglobinas (Tak/D/S). Tomado de (Sanchaisuriya et al., 2004).

Técnicas analíticas basadas en biología molecular

El diagnóstico molecular juega un rol importante en el diagnóstico y manejo de desórdenes de hemoglobina, principalmente en diagnóstico prenatal y consejo genético. Como se ha detallado en el primer capítulo, los desórdenes de α y β -globina tienen diferencias en anormalidades moleculares, por lo que las técnicas de biología molecular utilizadas para cada caso en su diagnóstico son diferentes (Sabath, 2023).

El advenimiento de la técnica de PCR ha permitido que el tamizaje de mutaciones se vuelva más simple. Muchas de las mutaciones que producen talasemia se deben a mutaciones puntuales. Estas se consideran sustituciones de un par de bases o inserciones y deleciones pequeñas. Entre las técnicas más comunes utilizadas para la detección de mutaciones son la PCR alelo-específica, análisis de hibridación por Dot-Blot reverso, PCR tiempo real y la secuenciación de ADN (Munkongdee et al., 2020).

PCR alelo específico

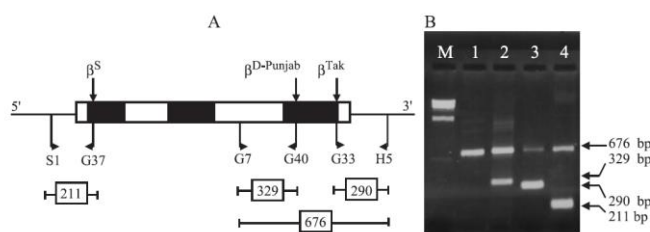
La reacción de PCR es un ensayo molecular que permite la amplificación de un fragmento específico de ADN en una mezcla compleja. Este ensayo requiere de la presencia del ADN molde, primers o cebadores, nucleótidos y la enzima ADN polimerasa. Esta enzima es clave, ya que es la que une los nucleótidos individuales y forma el producto de PCR. Los nucleótidos trifosfato incluyen cuatro bases: adenina, timina, citosina y guanina (dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) que se encuentran en el ADN. Los primers en la reacción definen la especificidad exacta del producto de ADN a ser amplificado. Estos primers son secuencias cortas de ADN complementarias al ADN objetivo. Los primers además funcionan como un punto de extensión para que la ADN polimerasa trabaje (Garibyan & Avashia, 2013).

En esta técnica se emplean dos primers idénticos en secuencia, excepto por la base en el extremo 3'. Uno de los cuales es complementario a la base en el “tipo salvaje” (sin mutación) y el otro primer es complementario a la base tipo mutante. Asimismo, se utiliza un primer común para la otra cadena opuesta. En esta reacción se utiliza la enzima *Taq* polimerasa para llevar a cabo la extensión a partir del ADN plantilla y del primer, los cuales deben de coincidir de forma exacta en el extremo 3'. En un individuo sano, solo se verá el

producto de PCR en la reacción que utiliza el juego de primers de tipo salvaje, mientras que en un heterocigoto tendrá una banda al utilizar los primers de tipo salvaje y otra banda mutante. Finalmente, el individuo homocigoto no tendrá ninguna banda con los primers de tipo salvaje y será positivo únicamente con los primers de la mutación (Munkongdee et al., 2020).

Una variación del PCR convencional descrito anteriormente, es el PCR múltiplex. El principio de esta técnica es el mismo, excepto por el hecho de que en la reacción se adicionan más de un par de primers, de modo que se amplificará simultáneamente más de un fragmento de ADN en una misma reacción. Las principales ventajas de esta modificación son rapidez y flexibilidad en el diseño de los primers y las condiciones de reacción. Algunas de las desventajas son la posibilidad de competencia de los recursos y artefactos resultantes (Edwards & Gibbs, 1994). En la Figura 4 se muestra el resultado de un PCR múltiplex de alelo específico para la detección de las mutaciones específicas que producen la Hb Tak, HbD-Punjab y HbS y los fragmentos generados para cada uno (Sanchaisuriya et al., 2004).

Figura 4. Resultados de un PCR múltiplex de alelo específico para la diferenciación de Hb Tak, Hb D-Punjab y HbS.



Nota: En (A) se muestra la locación y la orientación de los primers utilizados (S1 y G37), (G7 y G40) y (G33 y H5) y produce fragmentos de 211, 329 y 290 pb, correspondientes a HbS, HbD-Punjab y Hb Tak. El fragmento de 676 pb generado de los primers (G7 y H5) es el control interno de la reacción de amplificación. En (B) se muestra el gel de agarosa representativo del análisis de PCR múltiplex. Pozo 1: control normal, pozo 2: portador de HbD- Punjab, pozo 3: portador de Hb Tak, pozo 4: portador de HbS. Tomado de (Sanchaisuriya et al., 2004).

Análisis por Dot-Blot reverso

La posible mutación se puede identificar por hibridación con sondas de ADN conocidas como oligonucleótidos específicos del alelo (ASO, por sus siglas en inglés). El

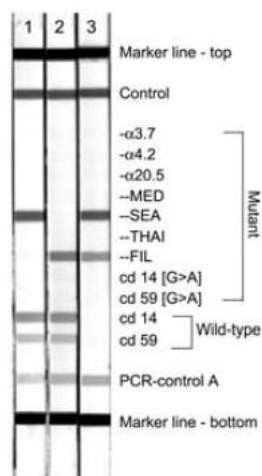
producto de PCR amplificado es inmovilizado en una membrana especial en forma de punto o “dot”. La sonda ASO es complementaria a una secuencia específica de ADN y está marcada con un reportero (biotina u otra enzima). En la técnica cuando la sonda ASO reconoce el producto de PCR específico, ocurre una reacción que puede ser visualizada dependiendo el reportero que utiliza, ya sea colorimétrico o quimioluminiscente (Munkongdee et al., 2020).

En el análisis del dot-blot reverso las sondas contienen un grupo amino en la base terminal en 5' que le permite unirse de forma covalente a una membrana de nylon. Posteriormente, se hibrida con ADN previamente amplificado y marcado con biotina para su detección. Una persona sana, sin mutación dará positivo para el punto de la sonda de tipo salvaje únicamente. Una persona heterocigota dará positivo a los dos puntos, al de tipo salvaje y al de la mutación, mientras que una persona homocigota para la mutación únicamente dará positivo con la sonda mutante (Munkongdee et al., 2020).

Hibridación inversa/reversa

Este análisis molecular consiste en la realización de un PCR múltiplex, que dependiendo del kit comercial que se utilice puede detectar hasta 21 mutaciones/deleciones frecuentes del gen de la α -globina en un solo procedimiento. Se basa en la amplificación completa del *HBA1* y *HBA2*, así como de deleciones sencillas o dobles, deleciones pequeñas, mutaciones puntuales e incluso la triplicación del gen. Seguidamente, se realiza una desnaturalización para dejar el producto amplificado en una cadena sencilla marcado con biotina. Posteriormente, se realiza una hibridación con las sondas específicas complementarias al ADN objetivo que se encuentran unidas a tiras reactivas. La unión de los productos con la tira se hace visible mediante una reacción enzimática que se evidencia con color, formando un patrón de bandas específico en la tira (Figura 5) (Puehringer et al., 2007).

Figura 5. Patrón de bandas en la prueba de hibridación reversa de ADN de una familia.



Notas: En las tiras 1 y 2 se muestran los resultados del ADN parental ($-^{SEA}/\alpha\alpha$ y $-^{FIL}/\alpha\alpha$) y de su bebé con *Hydrops fetalis* ($-^{SEA}/-^{FIL}$) (tira 3). Tomado de (Puehringer et al., 2007).

Gap-PCR

Debido a que la mayoría de las α -talasemias se producen por deleciones, la técnica de gap-PCR es la forma más práctica para definir el genotipo de α -globina de una persona. La amplificación del clúster del gen de la α -globina es más desafiante debido a la considerable homología entre las secuencias de estos genes. En esta técnica se realiza una amplificación del material genético utilizando tres primers que flanquean los puntos de ruptura de deleciones comunes y conocidas para generar productos de PCR de tamaños específicos. Se han descrito múltiples sets de primers que detectan la gran mayoría de deleciones del gen *HBA* (Sabath, 2023; Vijian et al., 2021).

El gap-PCR es un método de tamizaje para las siete deleciones más comunes de α -talasemia ($-^{SEA}$, $-^{FIL}$, $-^{MED}$, $-^{THAI}$, $-\alpha^{3.7kb}$, $-\alpha^{4.2kb}$ y $-\alpha^{20.5kb}$). La principal ventaja de esta técnica es que es una prueba diagnóstica rápida para α^0 y α^+ -talasemia. Sin embargo, es una técnica que requiere trabajo post-PCR y puede no ser adecuada para tamizajes a larga escala, no detecta mutaciones puntuales y no es útil para detectar deleciones para las cuales no hay primers diseñados (Al-Allawi et al., 2010; Sabath, 2023; Vijian et al., 2021).

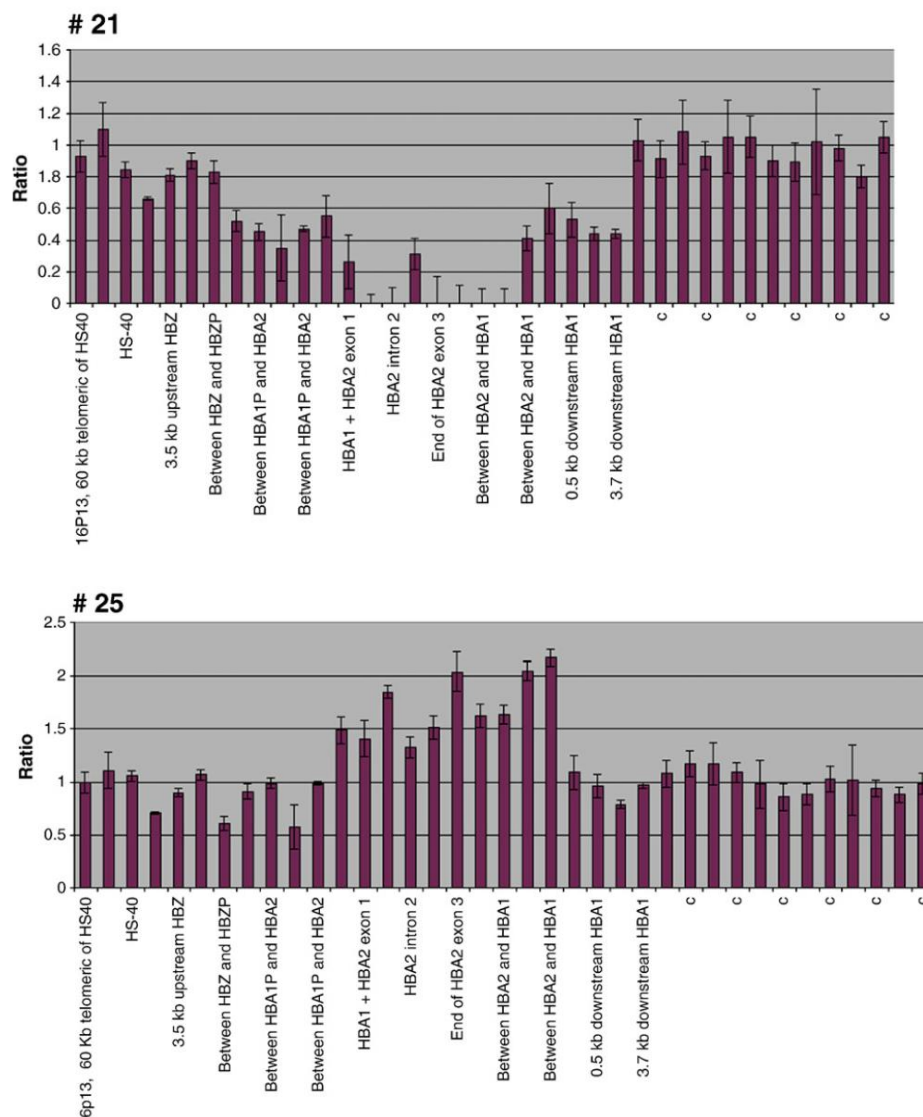
Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA)

La técnica de MLPA es un método de PCR múltiple que permite la detección de una delección o duplicación en una región cromosómica analizada. Se inicia con un paso de desnaturalización de ADN. Seguidamente, el ADN desnaturalizado se mezcla con sondas de oligonucleótidos separados (LPO y RPO) que se hibridan con las secuencias objetivos adyacentes. Luego, las sondas son ligadas durante una reacción de ligación con una ADN ligasa. Únicamente las sondas que fueron ligadas se amplifican durante la reacción de PCR, el número de los productos de las sondas ligadas es proporcional al número de copias de ADN de las secuencias objetivo en la muestra. Para separar los productos de la reacción de amplificación se utiliza una electroforesis capilar y se analizan los fragmentos en un software especializado (Munkongdee et al., 2020; Sabath, 2023).

Este método diagnóstico representa una forma valida y confiable de detectar rearrreglos comunes y raros en el gen de la α -globina, con la ventaja de determinar adicionalmente la dosis genética en individuos con un genotipo o fenotipo que no correlacionan, por ejemplo en el caso de los dobles heterocigotos para alteraciones en α y β -globina o en los casos donde la contribución de una copia extra de un gen de alfa globina confiere un fenotipo más severo en los pacientes con mutaciones heterocigotas en el gen de la β -globina (Colosimo et al., 2011).

Por lo tanto, esta técnica ha demostrado una gran capacidad para resolver casos que no se lograron diagnosticar por técnicas convencionales (Munkongdee et al., 2020). En la Figura 6 se muestran los histogramas de MLPA para un paciente con HbH (#21) y un paciente con talasemia intermedia al que se le detectó un triplicado del alelo $\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}$ y una alteración concomitante heterocigota en el gen de la β -globina (#25) (Colosimo et al., 2011).

Figura 6. Histogramas de resultados de una corrida de MLPA.



Notas: En el histograma #21 se muestra el resultado de un paciente con HbH ($-\alpha^{3.7}/_{-}\text{FIL}$) y en el histograma #25 se muestra el resultado de un paciente con talasemia intermedia ($\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}/\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$). Tomado de (Colosimo et al., 2011).

Métodos de secuenciación

Un momento clave en la historia de la evolución de la biología molecular fue el desarrollo del primer método establecido para la secuenciación de ADN creado por Frederic Sanger y sus colegas en 1977. Previo a este método, Allan Maxam y Walter Gilber publicaron un método de secuenciación de ADN denominado como “método de secuenciación

química”, siendo más complejo y menos escalable que el método de Sanger, por lo que no tuvo el impacto anticipado en la comunidad científica. Estos métodos de secuenciación representan la tecnología de secuenciación de primera generación y fueron los métodos más comunes durante casi tres décadas (Athanasopoulou et al., 2022).

La revolución de la secuenciación masiva en paralelo comenzó en el 2005 con los sistemas de pirosecuenciación y posteriormente se habilitaron nuevas alternativas de secuenciación basada en síntesis en plataformas como Illumina. Estas tecnologías se conocen como secuenciación de nueva generación o secuenciación de segunda generación (NGS). Poco después de la introducción de la NGS, emergieron las tecnologías de secuenciación de tercera generación (TGS) que incluyen la característica distintiva de secuenciación de una sola molécula y secuenciación en tiempo real en las plataformas de Pacific Biosciences (PacBio) y Oxford Nanopore Technologies (ONT) (Athanasopoulou et al., 2022).

Secuenciación directa de ADN

La secuenciación directa de ADN utiliza usualmente el método de Sanger para la detección de mutaciones. Un paso relevante para realizar esta técnica es que se requiere de una sola cadena de ADN para ser utilizada como molde, para lograr esto existen varias técnicas. En una de estas se realiza una reacción de amplificación convencional cuyo producto se somete posteriormente a una segunda reacción, pero en esta ocasión se utiliza un solo primer (forward o reverse); o el producto de la reacción de PCR original puede desnaturalizarse y enfriarse para que las dos cadenas permanezcan separadas, entre otras (Munkongdee et al., 2020).

La reacción de secuenciación requiere del ADN molde, un primer y la incorporación por la ADN polimerasa de un dNTP o un desoxirribonucleótidos trifosfato (ddNTP: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Estos últimos son nucleótidos marcados con fluorescencia y que además se modificaron para no tener los grupos hidroxilo (-OH) en la ribosa que los conforma. De este modo, cuando la ADN polimerasa entra en contacto con el ddNTP, no puede enlazar otros nucleótidos y por lo tanto la cadena que se estaba sintetizando se termina y se libera un fragmento de tamaño específico. Esto sucede con toda la secuencia molde y con cada uno de los ddNTP, de forma que, al ser separados mediante electroforesis capilar,

estos fragmentos van a separarse de acuerdo con su tamaño. Asimismo, se va a detectar la fluorescencia específica del ddNTP terminal, lo que permite la creación de un cromatograma con la secuencia detectada (Crossley et al., 2020; Sanger et al., 1977).

Actualmente por secuenciación de Sanger se generan secuencias de ácidos nucleicos de hasta 800-1000 pares de bases. Las limitaciones más importantes en esta técnica son, la baja calidad de la secuencia en los primeros 15-40 pb debido a la unión del primer, la inhabilidad de distinguir diferencias de un solo par de bases en segmentos más largos, solo se puede estudiar un gen a la vez y se han reportado algunas variantes raras de hemoglobina que no ha logrado detectar. A pesar de estas limitaciones, esta técnica corresponde al estándar de oro de la secuenciación de ADN, por lo que sigue siendo la técnica más común para verificar una secuencia obtenida por otra técnica (Crossley et al., 2020).

La secuenciación de Sanger ha sido el estándar de oro también para la secuenciación de los genes de globina en el diagnóstico molecular de talasemias y variantes de hemoglobina, debido a que el tamaño de los genes es pequeño. En el caso del gen de la α -globina mide 1200 pb y el de la β -globina 1800 pb (Achour et al., 2021).

Esta técnica es útil para detectar mutaciones puntuales en los casos de α -talasemia y β -talasemia no delecional y variantes en el gen *HBB*, sin embargo, esta secuenciación tiene complicaciones con el alto grado de identidad entre los dos genes *HBA*, por lo que su éxito depende de la realización de un PCR previo muy bien diseñado. En el caso de las β -talasemia, como la mayoría son causadas por mutaciones puntuales, esta técnica representa un método práctico de detectar la gran mayoría de mutaciones en un individuo (Sabath, 2023).

Secuenciación de segunda generación (NGS)

La secuenciación de segunda generación es una tecnología capaz de secuenciar ADN y ARN para la detección de mutaciones. La secuenciación masiva en paralelo de la técnica permite obtener secuencias de distintas longitudes de ADN o ARN e incluso el genoma completo en un tiempo relativamente corto. Esta técnica requiere de varios pasos importantes para la secuenciación. Inicia con la fragmentación del ADN, luego se prepara una librería y

se da la secuenciación masiva en paralelo. Finalmente, se realiza el análisis bioinformático y la interpretación de variantes o mutaciones encontradas (Qin, 2019).

La fragmentación del material genético se utiliza para romper el ADN objetivo en muchos pequeños segmentos, usualmente de tamaños entre 100-300 pb. Estos pueden ser obtenidos usando una reacción de PCR con muchos pares de primers, de forma que el ADN se amplifica en pequeños segmentos. Seguidamente, se prepara la librería de ADN en donde los segmentos se modifican de forma tal que tengan un índice específico de la muestra para identificar al paciente al que la muestra corresponde. En este proceso además se adicionan los adaptadores de la secuenciación que permitirán que se añadan los primers a todos los segmentos de ADN y facilitarán la secuenciación masiva en paralelo posteriormente (Qin, 2019).

El proceso de la secuenciación masiva en paralelo se realiza en una matriz de secuenciación dentro del equipo. La librería se carga en la matriz, que dependiendo del equipo puede ser diferente. Por ejemplo, en los equipos de Illumina la matriz es una celda de flujo que contiene secuencias de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores ligados de los fragmentos de ADN. Una vez que se unen los fragmentos comienza el proceso de “amplificación en puente”, por tener ambos extremos de los fragmentos ligados a la matriz. Esto permite obtener cúmulos clonales de los fragmentos de ADN amplificados. Seguidamente, durante las reacciones de síntesis se incorporan nucleótidos modificados patentados, estos corresponden a cada una de las cuatro bases de ADN con una etiqueta fluorescente que se unen de forma reversible, es decir, son nucleótidos que terminan la reacción al unirse, pero luego de la detección, se sueltan para que inicie de nuevo una nueva ronda de síntesis (Qin, 2019; Slatko et al., 2018).

La información de secuencia generada a partir de esta secuenciación masiva en paralelo se analiza utilizando softwares de bioinformática. Este análisis bioinformático comprende los procesos de análisis de los datos crudos, lecturas de alineamiento, identificación y anotación funcional de las variantes. Durante este proceso, la información secuenciada es comparada contra el genoma humano de referencia y se identifica donde hay variantes en las secuencias objetivo. Toda la información de los fragmentos secuenciados se

una para generar una secuencia completa del ADN objetivo. En el proceso de anotación e interpretación a cada variante identificada se le debe analizar su posible significancia clínica (Qin, 2019).

Recientemente, en el tamizaje de talasemias se ha estudiado el uso de NGS como una herramienta de gran escala, principalmente en poblaciones asiáticas. De esta manera, se estudian los genes de globina completos y se cubren además regiones codificantes, así como regiones regulatorias claves y otros genes que se han demostrado son modificadores genéticos como *KLF1*, *BCL11A*, *HBS1L* y *MYB* (Munkongdee et al., 2020).

A pesar de las grandes ventajas que ofrece la técnica, es importante mencionar las dificultades técnicas en la secuenciación de los genes de globina debido al alto grado de homología entre los genes *HBA1* y *HBA2*, y *HBB* y *HBD*. Asimismo, su costo es mucho más elevado que las técnicas moleculares convencionales utilizadas en el tamizaje y diagnóstico de hemoglobinopatías (Achour et al., 2021).

Secuenciación de tercera generación (TGS)

A principios de la década de 2010 se introdujo por Pacific Biosciences (PacBio) una nueva tecnología de secuenciación basada en nanosensores como un método de secuenciación en tiempo real de moléculas únicas (SMRT, por sus siglas en inglés). Esta tecnología aprovecha las propiedades de la síntesis de ADN y permite la identificación de moléculas de ADN de hasta 50 kb o más (Athanasopoulou et al., 2022).

Un cambio importante en esta tecnología de secuenciación en comparación con las técnicas anteriores como NGS, es que durante la síntesis de ADN la polimerasa que antes se desplazaba a lo largo del ADN molde ahora en la secuenciación SMRT está inmovilizada en un pocillo de un chip de silicio espacialmente diseñado (“celda SMRT”), mientras que la molécula de ADN es móvil. Estas reacciones de síntesis se miden en miles de pozos que contienen cámaras microscópicas llamadas guías de onda de modo cero. Estos últimos funcionan como sensores de la incorporación de los dNTPs etiquetados con fosfato, permitiendo la observación óptica continua de luz iluminante que habilita la detección

simultánea y en paralelo de miles de reacciones de secuenciación de moléculas únicas (Athanasopoulou et al., 2022).

Previo a la secuenciación, se realiza un PCR múltiplex largo para generar las secuencias objetivos amplias. Seguidamente, se añade un adaptador circular especial que se une al ADN objetivo en cada extremo de su secuencia. Este adaptador de ADN de doble cadena circular se conoce como el “SMRTbell” y funciona como anclaje para que se les una la polimerasa de ADN y el primer de la reacción de secuenciación. Estos complejos generados se añaden luego a las celdas SMART para llevar a cabo la secuenciación en tiempo real de moléculas únicas que detecta alteraciones en la emisión de luz cuando un nucleótido de ADN es incorporado. Finalmente, los datos de secuenciación se alinean, se remueven los errores y se genera una secuencia consenso entre las lecturas realizadas (Athanasopoulou et al., 2022; Xu et al., 2020).

Liang y colaboradores demostraron en el 2021 que esta tecnología se puede utilizar como una alternativa eficiente, adecuada y costo-efectiva en el diagnóstico de talasemias. A pesar de que las secuencias de los genes *HBA1* y *HBA2* son casi idénticas, fue posible separar fácilmente las variantes asociadas con cada uno de estos genes, así como identificar variantes estructurales raras dentro de la región *HBA1/2*. De forma que consideraron que este método se puede aplicar universalmente en el tamizaje molecular de talasemias en cualquier población, en donde el nivel y los tipos de variantes sean distintos. En este estudio también demostraron que es posible identificar variantes raras exógenas e intrónicas, así como variantes raras en las regiones 5' y 3' no traducidas, que potencialmente otras metodologías de secuenciación no detectan. A este tipo de estudio le llamaron Análisis Integral de Alelos de Talasemia (CATSA, por sus siglas en inglés) (Liang et al., 2021; Xu et al., 2020).

Posteriormente, se hizo una comparación entre el estudio CATSA y la NGS en el tamizaje de portadores de talasemia en la población de Hainan, China. Por una parte, se encontró que existe una alta concordancia en los resultados de la mayoría de los participantes, sin embargo, el método de CATSA sobresalió en la detección de variantes comunes y raras; fue capaz de identificar triplicados y cuadruplicados con precisión del gen de la alfa-globina. Por otra parte, NGS como se ha reportado en otros estudios, tuvo dificultad para distinguir

entre los genes homólogos de *HBA1* y *HBA2*, así como *HBB* y *HBD*, mientras que CATSA fue exitoso. Por lo que se concluye que CATSA es un método más integral, confiable, eficiente e incluso económico para la detección de portadores de talasemia en comparación con NGS (Huang et al., 2023).

En la Tabla 1 se resumen las principales técnicas diagnósticas basadas en proteínas y en diagnóstico molecular en cuanto a sus principales aplicaciones, ventajas y limitaciones.

Tabla 1. Comparación de técnicas utilizadas para el diagnóstico de desórdenes de hemoglobina.

	Técnicas	Aplicaciones	Ventajas	Limitaciones
Basadas en proteínas	Electroforesis en gel de acetato	Tamizaje de β -talasemia y algunas hemoglobinopatías	Económico Buena resolución	Algunas variantes son difíciles de diferenciar de la HbS (HbD o HbG) o de la HbC (HbE o HbO ^{Arab}). No detecta la mayoría de los casos de α -talasemia.
	HPLC	Tamizaje de β -talasemia y algunas hemoglobinopatías y detección de HbH	Rápido. Buena resolución. Útil para usarse como tamizaje inicial de variantes de Hb. Logra separar la HbS y la HbC de otras con migración similar.	Coelución de HbE, HbG y Hb Lepore con la HbA ₂ . Costoso. No siempre disponible. No detecta la mayoría de los casos de α -talasemia.
	Electroforesis capilar de zona	Diagnóstico de β -talasemia y algunas hemoglobinopatías, detección de variantes raras de Hb y HbH.	Capaz de separar Hbs normales y detectar la mayor cantidad de variantes de Hb. Rápido. Buena resolución. Totalmente automatizado.	No detecta la mayoría de los casos de α -talasemia.
	PCR alelo específico	Mutaciones puntuales de β -talasemia, α -	Rápido. Económico. Bueno para	No detecta deleciones.

Técnicas	Aplicaciones	Ventajas	Limitaciones	
Basadas en biología molecular	talasemia y hemoglobinopatías.	mutaciones puntuales conocidas. Puede ser múltiplex.		
	Gap-PCR	Especialmente en α -talasemia Deleciones conocidas.	Rápido. Puede ser múltiplex. Tamizaje de deleciones comunes.	No detecta mutaciones puntuales y no detecta deleciones sin primers específicos.
	MLPA	Especialmente en α -talasemia Deleciones o duplicaciones conocidas y no conocidas.	Cubre regiones cromosómicas amplias para análisis de deleciones o duplicaciones donde no se conoce el punto de corte.	Baja resolución. No detecta mutaciones puntuales ni deleciones pequeñas.
	Secuenciación directa por Sanger	Caracterizar variantes en los genes de alfa y beta globina.	Confirmar diagnóstico.	Laborioso. No es útil para detectar deleciones. Solo se analiza un gen a la vez.
	NGS	Detección de mutaciones y deleciones en todos los genes de globina en paralelo.	Alta sensibilidad Se pueden estudiar otros genes del clúster de β -globina al mismo tiempo.	Sujeto a problemas en secuencias repetitivas, particularmente en genes de α -globina, costoso.
	TGS	Detección de mutaciones y deleciones en todos los genes de globina en tiempo real.	Alta sensibilidad. Más económico que NGS. No tiene problemas con secuencias homólogas.	Poco disponible. Personal altamente capacitado. Porcentaje de error mayor que NGS.

Nota: HPLC cromatografía líquida de alta eficiencia, MLPA amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples, NGS secuenciación de segunda generación, TGS secuenciación de tercera generación

Elaboración propia con datos de Achour et al. (2021); Sabath (2023); Xu et al. (2020); Huang et al. (2023).

CAPÍTULO 3. TÉCNICAS UTILIZADAS EN COSTA RICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS

En Costa Rica existen diversos laboratorios del sector público y del privado donde se realiza el diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias. Sin embargo, las técnicas disponibles en cada uno de ellos son diferentes. En muchas ocasiones algunos análisis se centralizan en los laboratorios que realizan pruebas más especializadas, como las de diagnóstico molecular.

En el sector público de Costa Rica, los principales actores en el diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias son: el Laboratorio del Programa Nacional de Tamizaje Neonatal y Alto Riesgo (Lab PNT) (M. Solano, comunicación personal, 19 de mayo de 2024 y M. Abarca, comunicación personal, 27 de junio de 2024)), la División de Hemato-Oncología Especializada del Laboratorio Clínico del Hospital de Niños (DHHNN) (W. Cartín, comunicación personal, 17 de mayo de 2024) y el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA) de la Universidad de Costa Rica. Si bien los laboratorios de Hospital San Juan de Dios (HSJD) y el Hospital Calderón Guardia (HCG) también hacen pruebas diagnósticas para hemoglobinopatías, estos no hacen estudios moleculares, únicamente electroforesis de hemoglobina (M. Suarez, comunicación personal, 10 de mayo de 2024).

En el sector privado de Costa Rica la situación es diferente. Los laboratorios clínicos privados con mayor número de sucursales y oferta de pruebas de laboratorio al público son: Laboratorio LABIN (K. Ulate, comunicación personal, 20 de mayo de 2024), Laboratorio San José (LSJ) (M. Vargas, comunicación personal, 20 de mayo de 2024) y el Laboratorio Clínico del Hospital Clínica Bíblica (LCHCB) (O. Badilla, comunicación personal, 10 de mayo de 2024).

Técnicas utilizadas en laboratorios del sector público

El Lab PNT utiliza de rutina en su Programa de Tamizaje Nacional un equipo de HPLC de intercambio catiónico llamado VARIANT nbs System de BIO-RAD. Este es

especial para el tamizaje de recién nacidos y tiene la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para su uso en muestras de sangre secas como las que se utilizan de rutina en el tamizaje neonatal. Además, permite la detección de hemoglobinas (F, A, S, D, C, E) y el procesamiento de muestras es completamente automatizado, con una capacidad de procesar hasta 1128 muestras por corrida (BIO RAD Laboratories, 2017).

El Lab PNT utiliza muestras de sangre seca recolectadas mediante un corte en el talón realizado con una lanceta neonatal idealmente en el tercer día de vida del recién nacido. Se obtienen cuatro gotas de sangre que se absorben en un papel de filtro y se envían estando secas al laboratorio lo más rápido posible para su análisis (Programa Nacional de Tamizaje Neonatal, 2014). Esta metodología es adecuada para programas de detección a gran escala, como el del Programa de Tamizaje Neonatal, que procesa alrededor de 200-300 muestras por día. Sin embargo, este tipo de muestras presentan desventajas, como la degradación con el tiempo, y los cromatogramas de los HPLC generalmente presentan un elevado ruido de base junto con algunos picos de degradación en ciertos casos (Angastiniotis et al., 2013).

El Lab PNT utiliza además técnicas de diagnóstico molecular cuando en el HPLC se detecta una variante de hemoglobina, principalmente cuando se trata de la HbS, para confirmar si se trata de un paciente homocigoto o doble heterocigoto. En estos casos, además se realizan estudios de HPLC a los padres del menor afectado y de requerirse completar el estudio confirman los resultados mediante secuenciación de Sanger o MLPA del gen *HBB*.

En el caso del estudio que se les realiza a los padres al detectar una hemoglobinopatía por parte del Lab PNT, si el HPLC no es concluyente, se envía la muestra para ser procesada mediante electroforesis capilar de zona al DHHNN y de esta manera complementar. Los tiempos de respuesta de estos estudios duran en promedio 30 días, con excepción de los casos que se señalan como emergencias.

La DHHNN realiza alrededor de 25 pruebas de electroforesis de hemoglobina capilar por semana en el equipo MiniCap Flex Piercing de Sebia, mismo equipo utilizado por los laboratorios de los HSJD y HCG y el CIHATA. Este equipo tiene un rendimiento de corrida

de 7 muestras por hora y además tiene la ventaja de que es completamente automatizado y cuenta con un menú de pruebas adicional como lo son: análisis de electroforesis de proteínas, inmunotipado del suero y HbA1c (hemoglobina glicada) (Sebia, 2023).

Estos instrumentos de electroforesis capilar permiten la separación de alta resolución de las variantes más comunes de hemoglobina (HbS, HbC, HbD y HbE) y cuantifica de manera precisa la HbA₂ y HbF. Además, se comprobó que esta técnica es altamente reproducible (Riou et al., 2018). El resultado se visualiza junto a un perfil de 15 zonas electroforéticas (Figura 1) y el software incluye una biblioteca de más de 500 variantes (Sebia, 2023).

La DHHNN cuenta además con técnicas de diagnóstico molecular de hemoglobinopatías, tanto para alfa talasemias como para variantes del gen *HBB*. Separan los análisis en primera línea (PCR e hibridación reversa) y en los casos donde aplique utilizan otra prueba de segunda línea (MLPA). De igual forma si para el estudio aplica y se requiere realizar secuenciación de Sanger, refieren la muestra al Lab PNT. Los resultados que se procesan en la DHHNN se reportan aproximadamente 15 días después de realizado el montaje de la prueba.

El CIHATA realiza electroforesis de hemoglobina con el equipo MiniCap Flex Piercing de Sebia. Procesa alrededor de 5 a 10 electroforesis por semana y a diferencia de los laboratorios públicos mencionados anteriormente, este centro ofrece el servicio al público general, laboratorios de la Caja Costarricense del Seguro Social y a laboratorios privados.

En el CIHATA se realiza diagnóstico molecular de alfa talasemias, comenzando el estudio con un Gap-PCR, y en caso de ser necesario se realiza una secuenciación de Sanger de los genes *HBA1* y *HBA2*; si se requiere se realiza un MLPA. Para las variantes del *HBB* se utiliza la secuenciación de Sanger del gen completo o MLPA según sea necesario. Los resultados pueden tardar aproximadamente entre 7-21 días para reportarse.

Técnicas utilizadas en el sector privado

En el sector privado la situación es muy diferente en comparación con el sector público. De los laboratorios consultados únicamente el Laboratorio San José y el Laboratorio Clínico del Hospital Clínica Bíblica cuentan con un equipo para realizar electroforesis de hemoglobina, utilizando en el caso del LCHCB un equipo Hydrasys 2 Systems de Sebia que realiza una electroforesis de hemoglobina alcalina (pH 8.5) en un gel de agarosa preempacado. Este es un equipo semiautomatizado que detecta las principales hemoglobinas normales y variantes: HbA, HbA₂, HbS, HbC, HbE, HbD. Los resultados los presenta en forma de electroferogramas que, al complementarse con el uso de densitometría, cuantifica las fracciones de manera relativa (Sebia, 2012).

En el LCHCB se procesan alrededor de 4 muestras semanales de electroforesis de hemoglobina de pacientes que acuden a este centro médico o muestras que llegan de otros laboratorios de referencia privados. Este laboratorio realiza hibridación reversa de ADN de ViennaLab para el diagnóstico de alfa talasemia. Sin embargo, ha sido una prueba muy poco solicitada por los médicos.

El LSJ realiza electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa utilizando un equipo no especificado. Reciben aproximadamente de una a dos muestras por semana, tanto propias como de otros laboratorios de referencia. Aunque no realizan pruebas de diagnóstico molecular, cuando les solicitan estas pruebas, principalmente para la detección de deleciones del gen *HBA*, remiten los estudios al CIHATA.

El Laboratorio LABIN no realiza pruebas de electroforesis de hemoglobina ni de diagnóstico molecular, reciben en promedio menos de una muestra a la semana. Cuando reciben una muestra para electroforesis de hemoglobina la refieren al Laboratorio Quest Diagnostics en los Estados Unidos. En este laboratorio para la evaluación de hemoglobinopatías y talasemias realizan los recuentos e índices de la fórmula roja del hemograma y una electroforesis de hemoglobina capilar y de ser necesario un HPLC (Quest Diagnostics, 2019).

La Tabla 2 presenta un resumen de las técnicas diagnósticas disponibles en los laboratorios mencionados anteriormente, evidenciando la gran diferencia entre ambos sectores en cuanto a las técnicas disponibles. En el sector público, solo se realiza tamizaje mediante electroforesis capilar en diversos laboratorios. En contraste, en el sector privado, pocos laboratorios realizan electroforesis *in situ*; algunos la envían a laboratorios externos, tanto nacionales como internacionales. Utilizan principalmente electroforesis en acetato o gel de agarosa, lo cual, debido a las limitaciones de estas técnicas, podría resultar en la no detección de algunas variantes poco frecuentes de hemoglobina.

Tabla 2. Técnicas utilizadas en los principales laboratorios públicos y privados de Costa Rica para el diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias.

Laboratorio		Técnicas basadas en proteínas	Técnicas basadas en biología molecular	
Sector	Nombre	Electroforesis de Hb	Gen <i>HBA</i>	Gen <i>HBB</i>
Público	LAB PNT	HPLC	Secuenciación de Sanger MLPA	Secuenciación Sanger MLPA
	DHHNN	Capilar	Hibridación reversa MLPA	Hibridación reversa
	CIHATA	Capilar	Gap PCR Secuenciación Sanger <i>HBA1</i> y <i>HBA2</i> MLPA	Secuenciación Sanger MLPA
	HSJD/HCG	Capilar	Refiere	Refiere
	LABIN	Refiere	Refiere	Refiere
Privado	LSJ	Acetato de celulosa	Refiere	Refiere
	LCHCB	Gel de agarosa	Hibridación reversa	Refiere

Notas: Elaboración propia con datos de entrevistas. Laboratorio del Programa Nacional de Tamizaje Neonatal y Alto Riesgo (LAB PNT), División de Hemato-Oncología Especializada del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional de Niños (DHHNN), Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA),

Hospital San Juan de Dios (HSJD) y el Hospital Calderón Guardia (HCG), Laboratorio San José (LSJ), Laboratorio Clínico del Hospital Clínica Bíblica (LCHCB).

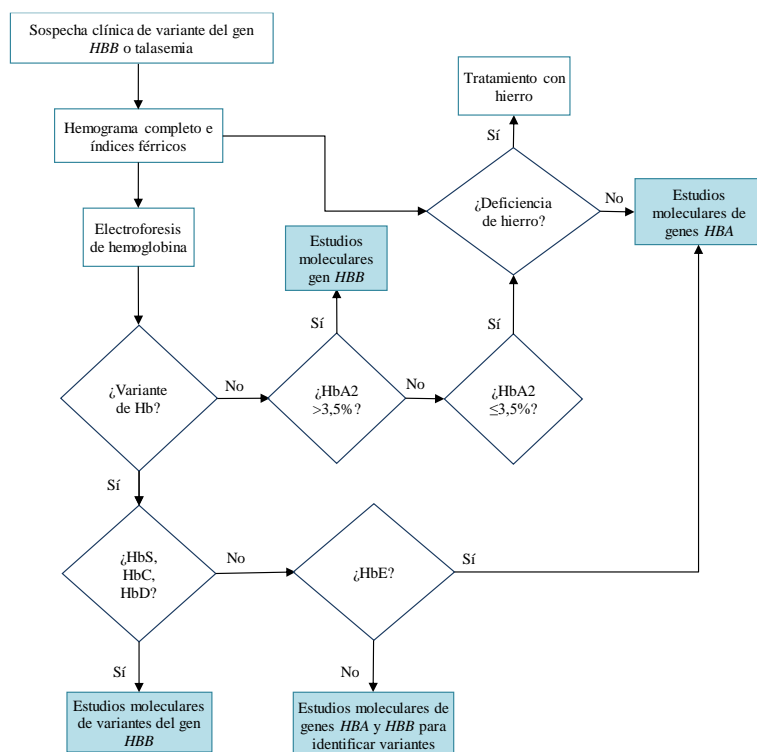
Destaca el LCHCB, que además de realizar electroforesis de hemoglobina semanalmente, cuenta con la técnica de hibridación reversa de ADN de ViennaLab. Además, dispone de un secuenciador de Sanger y un equipo de NGS de Illumina. En caso de que se necesite secuenciar el gen *HBB* o realizar una secuenciación masiva, estas plataformas están disponibles y se podrían eventualmente validar para estos análisis.

Aunque el sector de laboratorios privados ofrece algunas ventajas sobre el sector público, como tiempos de respuesta más rápidos para realizar pruebas, dispone de muy pocas técnicas de diagnóstico molecular. Además, parece que los laboratorios privados no han recibido suficientes solicitudes médicas para incorporar estas técnicas en su rutina especializada.

CAPÍTULO 4. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS

Las pruebas de diagnóstico molecular en el abordaje diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias se recomiendan en diversos escenarios generales (Figura 7. Algoritmo para determinar cuándo utilizar técnicas moleculares para diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias a partir de la sospecha clínica del cuadro.). Sin embargo, existen múltiples casos que deben analizarse individualmente para recomendar el uso o no de pruebas de diagnóstico molecular. En este capítulo se abordan los principales pilares del uso del diagnóstico molecular: diagnósticos complejos de hemoglobinopatías y talasemias, detección de parejas portadoras y diagnóstico prenatal y el tamizaje neonatal.

Figura 7. Algoritmo para determinar cuándo utilizar técnicas moleculares para diagnóstico de hemoglobinopatías y talasemias a partir de la sospecha clínica del cuadro.



Nota: elaboración propia con datos de Sabath (2023). Este algoritmo no aplica para tamizaje neonatal. Ante una variante de hemoglobina se recomienda revisar el porcentaje y correlacionar con la clínica del paciente.

Diagnósticos complejos de hemoglobinopatías y talasemias

En pacientes con glóbulos rojos microcíticos a quienes se les ha descartado una deficiencia de hierro y presentan un patrón normal o una HbA₂ disminuida en la electroforesis de hemoglobina, debe sospecharse de una α -talasemia. Tanto para el diagnóstico de α -talasemia delecional como no delecional, las técnicas electroforéticas se quedan cortas, en algunos casos se puede detectar la presencia de HbH, Hb Barts o HbCS, pero al ser inestables no siempre aparecen y no permiten identificar portadores heterocigotos, razón por la cual el diagnóstico de las alfa talasemias solo puede ser confirmado por análisis moleculares (Calderón et al., 2020; Sabath, 2023).

Si bien las deleciones del locus de la β -globina son poco comunes, estas pueden incluir el gen *HBB*, los genes *HBB* y *HBD*, o todo el *locus*. En los casos donde el gen *HBD* está delecionado, no se observa el aumento diagnóstico de HbA₂, lo que dificulta el diagnóstico de β -talasemia. La mayoría de estas deleciones *HBB-HBD* también están asociadas con aumentos de HbF. Por lo tanto, las técnicas de diagnóstico molecular son la única manera de caracterizar de forma definitiva la β -talasemia delecional (Sabath, 2023).

En el pasado se consideraba el valor de HbA₂ diagnóstico para rasgo de β -talasemia como $>4\%$. Sin embargo, diferentes estudios han reportado portadores de β -talasemia con niveles limítrofes de HbA₂; con valores que se encuentran entre el límite superior del rango normal y el límite inferior de los portadores típicos de β -talasemia. Incluso, a raíz de esto algunos laboratorios han cambiado el punto de corte de la HbA₂ para diagnosticar el rasgo de β -talasemia a $\geq 3.5\%$ y en algunos casos a partir de $\geq 3.3\%$ (Colaco & Nadkarni, 2021).

Los niveles de HbA₂ pueden estar disminuidos en portadores de β -talasemia debido a la coherencia de mutaciones en la α -globina o δ -globina, mutaciones en el gen *KLF1*, la triplicación de los genes de α -globina, ciertas variantes del gen de β -globina y a la coexistencia de β -talasemia con deficiencia de hierro. Estos casos son muy importantes de tomar en cuenta, ya que muchas veces permanecen sin diagnóstico, siendo identificados retrospectivamente, tras el nacimiento de hijos afectados (Colaco & Nadkarni, 2021).

Otro grupo de pacientes que requieren estudios adicionales de diagnóstico molecular son los pacientes que obtienen resultados ambiguos en los estudios electroforéticos de hemoglobina o en donde el fenotipo clínico del paciente no concuerda con los resultados obtenidos en las pruebas electroforéticas. En estos casos únicamente por diagnóstico molecular se puede confirmar la presencia de un doble heterocigoto o una variante rara (Sabath, 2017).

Un ejemplo de un caso donde se requirió de estudios moleculares, porque la clínica del paciente no concordó con el diagnóstico electroforético previo se presentó en una paciente de 13 años, vecina de Limón, con una madre portadora de $\delta\beta$ -talasemia. Previamente a la paciente el estudio electroforético arrojó una HbA en 23.5%, HbF en 75% y HbA₂ en 1.5%. Clínicamente, la paciente mantuvo requerimientos transfusionales como los de un paciente con un síndrome talasémico de β -talasemia mayor. Es por lo anterior que se decide realizarle estudios electroforéticos al padre, donde se documentó un fenotipo de portador heterocigoto de β -talasemia (Protti et al., 2023).

Se procede a efectuar estudios moleculares a la niña, dados por un estudio de secuenciación por Sanger y MLPA para buscar mutaciones y deleciones en los genes que codifican para la cadena de β -globina. Se detectó en un alelo una mutación en la región 11p15.4 en el exón 3 del gen *HBD* hasta la región corriente abajo del gen *HBB*, reportada como $\delta\beta^0$ siciliana; en el otro alelo se detectó la variante c.118C>T, mutación en el codón 39 y en estado hemicigoto, la cual produce un codón de terminación prematuro y se asocia a β^0 -talasemia (Protti et al., 2023).

Un caso como el anterior evidencia la importancia de los estudios familiares en el correcto diagnóstico. Asimismo, cuando las deleciones se combinan con mutaciones de β -talasemia, dan como resultado fenotipos clínicos muy diversos, desde condiciones asintomáticas hasta cuadros de β -talasemia mayor. En estos casos, la sobreposición de los parámetros hematológicos y la variada expresión de HbA₂ y HbF vuelven necesario la utilización de estudios moleculares para la distinción de las deleciones y mutaciones clínicamente relevantes (Protti et al., 2023).

Detección de parejas portadoras y diagnóstico prenatal

Los pacientes con variantes de hemoglobina que pueden ser identificadas de manera definitiva mediante el análisis de hemoglobina no necesariamente necesitan pruebas moleculares. Las pruebas moleculares prenatales pueden estar indicadas para el asesoramiento genético o prenatal a parejas en riesgo de tener hijos con trastornos graves de la hemoglobina como una posible hidropesía fetal (Sabath, 2023).

A las parejas que requieren asesoramiento genético se les debe ofrecer pruebas de diagnóstico molecular cuando se sospecha que ambos futuros padres son portadores de una α -talasemia, una β -talasemia u otros escenarios clínicos como los mencionados en la Tabla 3 (Langlois et al., 2008).

Tabla 3. Recomendación para el diagnóstico prenatal de hemoglobinopatías y talasemias.

Escenario clínico	Pruebas requeridas
Ambos miembros de la pareja son portadores de β -talasemia	Análisis de ADN del gen de la β -globina
Un miembro es portador de β -talasemia y el otro es portador de una variante de hemoglobina (ej. HbS, HbE)	
Ambos miembros de la pareja son portadores de HbS	
Un miembro es portador de HbS y el otro es portador de HbC o HbD	
Un miembro es portador de β -talasemia y el otro es portador de α -talasemia	Análisis de ADN del locus de la α -globina
Ambos miembros son portadores de α -talasemia	
Ambos miembros tienen un MCV bajo o HCM bajo, con estudios de hierro normal y electroforesis de hemoglobina/HPLC normal	

Nota: adaptado de (Langlois et al., 2008).

A las parejas en riesgo se les puede ofrecer una opción reproductiva para evitar el nacimiento de niños afectados, o un acompañamiento en la preparación del nacimiento de un niño gravemente afectado. La asesoría genética es importante para que estas parejas conozcan las diferentes opciones disponibles de acuerdo con la legislación vigente en cada país. Actualmente, en países donde está disponible, la opción que se elige más comúnmente es el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) (Traeger-Synodinos et al., 2015).

Cuando las mujeres embarazadas como sus parejas son portadoras de α^0 -talasemia, tienen un 25% de probabilidad de concebir un hijo con el síndrome de hidropesía fetal por

Hb Barts. Un feto con este síndrome muere en el útero durante el tercer trimestre de gestación o poco después de su nacimiento. Además, estos embarazos se consideran de alto riesgo y enfrentan complicaciones graves, como la preeclampsia y hemorragia postparto, junto con la carga psicológica y emocional de llevar a término un feto no viable (Lai et al., 2018).

Tanto el diagnóstico prenatal convencional como el DGP implican la caracterización previa de variantes en los padres y el análisis posterior del ADN fetal o del embrión. Por lo tanto, los servicios genéticos para el estudio de hemoglobinopatías requieren una estrecha colaboración entre varias especialidades, principalmente hematología, asesoramiento genético, diagnóstico molecular y medicina fetal (Traeger-Synodinos et al., 2015).

El objetivo del diagnóstico prenatal es brindar un resultado preciso lo más temprano posible durante el embarazo. Por lo que se requiere de la identificación previa de las mutaciones causantes de la enfermedad en los padres y de una muestra segura y oportuna del material fetal. La identificación de las mutaciones en el ADN aislado del trofoblasto se puede realizar con un muestreo de las vellosidades coriónicas desde las 11 semanas de embarazo o del líquido amniótico utilizando amniocentesis a partir de las 15 semanas de embarazo (Vrettou et al., 2018).

Las técnicas utilizadas para identificar las mutaciones genéticas en los genes de la globina en el ADN fetal son las mismas que se utilizan en el estudio de los portadores, aunque se requieren de procedimientos de laboratorio aún más rigurosos. Para garantizar la precisión, se recomienda como buena práctica que el genotipo de la muestra fetal se confirme por duplicado y que este material genético se analice junto con las muestras de ADN parental y con controles adecuados. Además, es importante excluir cualquier contaminación con ADN materno (Vrettou et al., 2018).

Si bien el diagnóstico prenatal convencional es un procedimiento bien establecido y preciso, presenta algunas desventajas importantes. Estas incluyen la necesidad de una muestra invasiva del material fetal, que conlleva a un riesgo del 1-2% de pérdida del embarazo, y la posible necesidad de interrumpir los embarazos afectados, lo cual está asociado a implicaciones éticas y sociales ampliamente debatidas (Vrettou et al., 2018).

El diagnóstico genético preimplantacional implica la caracterización del estado genético de hasta unas pocas células de ovocitos, cigotos o embriones creados *in vitro* mediante la tecnología de reproducción asistida. Los embriones identificados como no afectados por el trastorno genético podrán ser transferidos al útero para iniciar un embarazo. Aunque de esta manera se evita la terminación del embarazo, presenta algunas desventajas importantes. La pareja debe someterse al proceso de reproducción asistida incluso si son fértiles, la iniciación del embarazo tras la transferencia del embrión no está garantizada, y en muchos países, la pareja debe asumir el alto costo del procedimiento (Vrettou et al., 2018).

El descubrimiento del ADN fetal circulante en la madre permitió el desarrollo de lo que son ahora las pruebas prenatales no invasivas. Esta técnica se utiliza para el diagnóstico de enfermedades monogénicas recesivas. Es dependiente en gran medida de conocer los genotipos parentales correctos. Sin embargo, el método de definición del genotipo en estas pruebas actualmente requiere estudios familiares, y el genotipado molecular es sumamente complicado debido a su alto costo, largo tiempo de respuesta y complejidad del análisis de resultados (Chen et al., 2021).

Las pruebas prenatales no invasivas de muestras de sangre materna actualmente permiten la detección temprana de las mutaciones de β -talasemia heredada de manera paterna. La ausencia de la mutación paterna implica que el feto heredó el alelo normal de β -globina paterno y, por lo tanto, no fue afectado por la enfermedad de β -talasemia. En estos casos se reduce hasta la mitad la necesidad de realizar procedimientos invasivos para confirmar posibles diagnósticos. Sin embargo, la detección de alelos heredados de la madre mediante estas pruebas es todo un desafío. Actualmente, existen varios métodos para detectar alelos heredados de manera paterna, mientras que solo hay unos pocos informes sobre los métodos para detectar alelos heredados de la madre, como la dosificación relativa de mutaciones o la dosificación relativa de haplotipos utilizando secuenciación de segunda generación y PCR digital basado en gotas (Suwannakhon et al., 2023).

La identificación y la caracterización de las parejas en riesgo requiere la colaboración de expertos médicos y del laboratorio de hematología. Además, estas parejas deben recibir asesoramiento genético integral en cada etapa del proceso y según el procedimiento

seleccionado, comprendiendo las ventajas y limitaciones de cada opción. Todos estos procedimientos se deben aplicar de acuerdo con la legislación local y las prácticas aceptadas según la sociedad, religión y ética (Vrettou et al., 2018).

En Costa Rica cuando en el LAB PNT se reporta el resultado de una hemoglobinopatía o talasemia, se estudia a la familia y se les brinda consejo genético por parte de los médicos para que los familiares evalúen el riesgo de tener más hijos. Por el momento, desde la parte pública no se realizan pruebas prenatales ni preimplantacional para el abordaje de estos trastornos genéticos.

Tamizaje neonatal

El tamizaje neonatal es una estrategia de salud pública que se realiza en recién nacidos para identificar desórdenes potencialmente serios antes de que se presenten los síntomas o lo suficientemente temprano para garantizar una intervención terapéutica que reduzca la morbilidad y mejore la calidad de vida. Mejorar la atención desde el nacimiento para reducir la morbilidad en niños menores de 5 años es uno de los objetivos recientes de la Organización Mundial de la Salud, la cual busca asegurar que cada niño en el mundo “sobreviva y prospere para alcanzar su máximo potencial” (Giugliani et al., 2022; World Health Organization, 2020).

En los países de América Latina existen diversos programas de tamizaje neonatal con diferencias notables en términos de acceso, tecnologías y alcance. Costa Rica destaca como uno de los primeros países de la región en establecer un programa nacional de tamizaje en 1990. Para el 2018, Costa Rica ha logrado una cobertura del 97.7% de la población y actualmente cuenta con el programa con el panel que tamiza para la mayor cantidad de enfermedades, abarcando un total de 29 (Borrajo, 2021; Giugliani et al., 2022; Programa Nacional de Tamizaje Neonatal, 2014).

Dentro de los paneles de enfermedades tamizadas en los programas de tamizaje neonatal se tienen las enfermedades producidas por defectos en el metabolismo, defectos endocrinos, hemoglobinopatías y desórdenes genéticos (Programa Nacional de Tamizaje

Neonatal, 2014). Los países de Latinoamérica que realizan tamizaje de hemoglobinopatías son únicamente Costa Rica, Uruguay, Brasil y Panamá (Borrajo, 2021)

En Costa Rica se realiza la detección de hemoglobina S desde el 2005 a través del programa de tamizaje neonatal. Con el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas, este proceso ha experimentado varios cambios. Inicialmente, la detección se realizaba únicamente a través de HPLC. En el 2012, se comenzó a secuenciar la región de la hemoglobina S y C mediante secuenciación de Sanger. En el 2015, se avanzó con la secuenciación completa del gen *HBB* y finalmente para el 2017 se incorporó la técnica de MLPA, lo que permitió incrementar la especificidad del análisis (Calderón et al., 2022).

El objetivo de la detección neonatal de los síndromes drepanocíticos es prevenir las complicaciones de esta enfermedad desde la primera infancia. Dado que en niños con esta condición pueden ocurrir eventos potencialmente mortales desde los tres meses de edad, un diagnóstico temprano es crucial para establecer medidas preventivas. Aunque otras hemoglobinopatías y talasemias no se benefician de la misma manera con su diagnóstico temprano, su identificación sigue siendo importante para las familias, ya que proporciona conocimientos reproductivos y facilita la toma de decisiones informadas (Frömmel, 2018).

Los métodos de laboratorio utilizados en estos programas para detectar tanto los estados de enfermedad como los de portador deben ser muy sensibles y altamente específicos. Deben prevenir daños, evitando tanto la omisión de pacientes como la identificación errónea de los mismos. Las consecuencias psicosociales y logísticas para las familias derivadas del diagnóstico, el riesgo de tratamientos médicos innecesarios o diagnósticos retrasados por resultados falsos negativos, así como el daño psicosocial por resultados falsos positivos y la incertidumbre del diagnóstico clínico, deben minimizarse y ser superados por los beneficios (Frömmel, 2018).

La mayoría de los programas de tamizaje neonatal que tamizan para hemoglobinopatías utilizan principalmente la técnica de HPLC para la detección de variantes de hemoglobina, seguida de algún otro método complementario como electroforesis capilar. La técnica de HPLC se prefiere en el tamizaje neonatal por sus ventajas: está completamente

automatizado, permite la detección y cuantificación de variantes y tiene una gran capacidad para procesar un gran volumen de muestras en poco tiempo (Hoppe, 2013).

Aunque estos métodos basados en la determinación de proteínas de la hemoglobina son fundamentales para el diagnóstico de hemoglobinopatías, pueden ser inadecuados en el contexto de la detección neonatal de algunas variantes del gen *HBB* producidas por mutaciones específicas que no permiten diferenciar entre HbSS y HbS/HPFH únicamente con estas técnicas. Sin estudios parentales, la diferenciación clínica de HbSS de HbS/HPFH puede tardar varios años en realizarse correctamente, dada la prolongada disminución postnatal en la concentración de HbF en niños con drepanocitosis (Hoppe, 2013).

La confirmación de los casos sospechosos de HbSS mediante biología molecular en la detección neonatal debe ser lo más precisa y exacta posible para permitir la pronta iniciación de la profilaxis con penicilina y la remisión a un centro especializado para una atención integral continua. Esto ha demostrado reducir la morbilidad y la mortalidad (Hoppe, 2013).

En los resultados del tamizaje neonatal, los bebés que pueden tener un síndrome drepanocítico tendrán presencia de HbF y HbS en ausencia de HbA (Patrón FS) o HbF y HbS con otra variante de hemoglobina (ejemplo, Patrón FSC); o HbF, HbS y HbA, en donde la cantidad de HbS es mayor que la de HbA (HbS/ β^+ talasemia). Cuando la HbA es inferior al 1.5%, debe considerarse como un artefacto. Algunos casos pueden requerir pruebas moleculares para confirmar la presencia de una mutación subyacente. Los resultados esperados por sistemas de HPLC para muestras de tamizaje neonatal con sospecha de síndrome drepanocítico se muestran en la Tabla 4 (National Health Service, 2021). En él se puede observar como el patrón FS puede estar asociado a diferentes enfermedades, lo que evidencia la necesidad de realizar pruebas de diagnóstico molecular para su correcto diagnóstico.

Tabla 4. Patrón de resultados del HPLC neonatal y su enfermedad asociada.

Patrón de HPLC del neonato	Enfermedad
FS	HbSS
FS	HbS/ β^0 talasemia
FS	HbS/ $\delta\beta$ talasemia
FS	HbS/Lepore
FS	HbS/HPFH
FSA or FS	HbS/ β^+ talasemia
FSC	HbSC
FSD	HbS/D ^{Punjab}
FSE	HbS/E
FSO ^{Arab}	HbS/O ^{Arab}

Nota: adaptado de (National Health Service, 2021).

En el pasado, solía emplearse el enfoque de “observar y esperar” para distinguir entre HbSS de HbS/HPFH, midiendo de forma constante la HbF y los recuentos sanguíneos. En niños con síndromes drepanocíticos, la disminución postnatal de la concentración de HbF puede tardar de 5 a 6 años en completarse, lo que resulta en un inicio limitado y demorado de la terapia modificadora de la enfermedad. Actualmente, con la implementación de técnicas moleculares neonatales, se facilita la distinción entre estos dos tipos de pacientes, permitiendo un inicio temprano de la terapia modificadora, como la hidroxiurea, para prevenir y revertir la disminución temprana de HbF, en lugar de esperar a que su nivel disminuya. Para los niños con HbS/HPFH el tratamiento con hidroxiurea no está indicado y los expone a riesgos, gastos, monitoreos e inconvenientes innecesarios (Shook et al., 2021).

Las pruebas de diagnóstico molecular no son estrictamente necesarias para determinar si un bebé tiene HbS/HPFH si se pueden realizar los estudios a los padres. Sin embargo, puede suceder que no estén disponibles ambos padres o que no estén dispuestos a someterse a las pruebas. Además, el tiempo requerido para realizar estos estudios puede ser mayor del necesario, retrasando así el inicio del tratamiento con hidroxiurea (Shook et al., 2021).

En Costa Rica, cuando el Programa Nacional de Tamizaje detecta una posible muestra positiva para una hemoglobinopatía o talasemia, no se realiza un diagnóstico definitivo, solo indica que el neonato es sospechoso de presentar la enfermedad. Todos los resultados anormales deben confirmarse con una segunda muestra del neonato y de sus padres. Estas segundas muestras se toman igual que la primera, utilizando el papel filtro de las boletas exclusivas de tamizaje neonatal. En el caso de los padres o hermanos mayores de 1 año se puede tomar la muestra de los dedos pulgares y deben de identificarse correctamente (Caja Costarricense del Seguro Social, 2013).

La única forma de prevenir la drepanocitosis y sus síndromes es mediante el consejo genético. Una vez que en el Programa de Tamizaje se confirma un diagnóstico se coordina con los médicos para que sean ellos los que lo brinden. Este tiene un gran impacto en la vida de las personas. Tiene implicaciones educativas al aportar conocimiento acerca de la drepanocitosis y presenta implicaciones preventivas al colaborar en la toma de decisiones de los futuros padres de familia respecto al nacimiento de hijos con drepanocitosis, reduciendo con esto su incidencia (Caja Costarricense del Seguro Social, 2013).

CONCLUSIONES

El manejo adecuado de los pacientes con sospecha de hemoglobinopatía o talasemia requiere un profundo conocimiento sobre la etiología genética de estas enfermedades. Este conocimiento permite analizar el contexto específico de cada caso clínico, facilitando la toma de decisiones informadas sobre la utilización de las técnicas diagnósticas más adecuadas. Una correcta selección de estas técnicas no solo mejora la precisión del diagnóstico, sino que también optimiza los recursos, el tratamiento y el seguimiento de los pacientes, garantizando una atención médica oportuna y personalizada.

Las técnicas diagnósticas basadas en la caracterización de las proteínas son cruciales, ya que permiten procesar un alto número de muestras de forma automatizada con equipos especializados para este fin. Sin embargo, estas técnicas presentan limitaciones importantes. Para mitigar esta situación, especialmente en la confirmación de diagnósticos complejos que no pueden resolverse con métodos convencionales, se realiza la combinación de técnicas que asegura una mayor fiabilidad en el diagnóstico de estas enfermedades, mejorando así la calidad de la atención médica ofrecida a estos pacientes.

Costa Rica cuenta con una considerable capacidad tecnológica y recurso humano calificado para realizar diagnósticos complejos de hemoglobinopatías y talasemias. Los laboratorios del sector público disponen de una amplia variedad de técnicas diagnósticas para estas enfermedades. Desafortunadamente, en el sector privado su disponibilidad actualmente es limitada, lo que podría resultar en casos que no se diagnostiquen adecuadamente.

El diagnóstico molecular de hemoglobinopatías y talasemias es fundamental para la detección de parejas portadoras y el diagnóstico prenatal, facilitando un adecuado consejo genético. Estas técnicas permiten identificar con certeza los riesgos de transmitir estas enfermedades, brindándoles la oportunidad de recibir una atención integral que les permita tomar decisiones informadas sobre la planificación familiar. Garantizar que tengan acceso a esta información es esencial para reducir la incidencia de hijos gravemente afectados por estas enfermedades.

La implementación de técnicas de biología molecular en el tamizaje neonatal es vital para la confirmación de casos sospechosos de síndromes drepanocíticos, garantizando su detección temprana y oportuna que brinde una reducción significativa de la morbilidad y mortalidad, mejorando así la calidad de vida de estos pacientes desde temprana edad. Aunque el Programa de Tamizaje Neonatal de Costa Rica ha realizado un trabajo importante en esta materia, se recomienda ampliar el programa mediante la incorporación de técnicas moleculares para la detección de alfa talasemias en la población con mayor riesgo de padecerla. Esto asegurará un diagnóstico adecuado y permitirá ofrecer el tratamiento y el consejo genético necesario.

REFERENCIAS

- Achour, A., Koopmann, T. T., Baas, F., & Hartevelde, C. L. (2021). The Evolving Role of Next-Generation Sequencing in Screening and Diagnosis of Hemoglobinopathies. En *Frontiers in Physiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.686689>
- Angastiniotis, M., Eleftheriou, A., & Galanello, R. (2013). Newborn screening for haemoglobinopathies. En *Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders* (2nd ed., Vol. 1). Principles.
- Arishi, W. A., Al-hadrami, H. A., & Zourob, M. (2021). Techniques for the detection of sickle cell disease: A review. En *Micromachines* (Vol. 12, Número 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/mi12050519>
- Athanasopoulou, K., Boti, M. A., Adamopoulos, P. G., Skourou, P. C., & Scorilas, A. (2022). Third-generation sequencing: The spearhead towards the radical transformation of modern genomics. *Life*, *12*(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/life12010030>
- Azma, R., Alauddin, H., Azma, R.-Z., M-Gaus, K., A-Aziz, S., Ithnin, A., Razak, N.-F., Sardi, N.-H., Mohd-Yusoff, M., A-Latiff, Z., Alias, H., Ismail, E., Koh-Xuan-Rong, D., & Othman, A. (2016). Detection of Homozygous Haemoglobin Constant Spring by Capillary Electrophoresis Method. En *ARC Journal of Hematology* (Vol. 1, Número 1). <https://www.researchgate.net/publication/358457774>
- BIO RAD Laboratories. (2017). *Newborn Screening VARIANT™ nbs Newborn Screening System Confidence in newborn screening with the ease of HPLC*.
- Borrajó, G. J. C. (2021). Newborn screening in Latin America: A brief overview of the state of the art. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, *187*(3), 322–328. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31899>
- Brewin, J. N., Nardo-Marino, A., Stuart-Smith, S., El Hoss, S., Hanneman, A., Strouboulis, J., Menzel, S., Gibson, J. S., & Rees, D. C. (2022). The pleiotropic effects of α -thalassemia on HbSS and HbSC sickle cell disease: Reduced erythrocyte cation co-

transport activity, serum erythropoietin, and transfusion burden, do not translate into increased survival. *American Journal of Hematology*, 97(10), 1275–1285. <https://doi.org/10.1002/ajh.26652>

Caja Costarricense del Seguro Social. (2013). *Manual técnico: atención integral a personas con drepanocitosis*.

Calderón, M., Cubillo, I., Cartín, W., & Valverde, K. (2022). Caracterización clínica y epidemiológica de población pediátrica costarricense con alfa-talasemia. *Acta Médica Costarricense*, 64(4), 1–11. <https://doi.org/10.51481/amc.v64i4.1260>

Calderón, M., Porras, A., Granados, P., & Cartín, W. (2020). Enfermedad por hemoglobina H: primer caso de dobles heterocigotos hemoglobina Constant Spring / Sudeste Asiático en Costa Rica (Hemoglobin H disease: first case of double heterozygous hemoglobin Constant Spring / Southeast Asian in Costa Rica). *Acta Médica Costarricense*, 62(1), 38–42.

Cappellini, M. D., & Motta, I. (2017). New therapeutic targets in transfusion-dependent and-independent thalassemia. *Hematology*, 1, 278–283.

Cela, E., Beléndez, C., & Galarón, P. (2009). Interpretación de la electroforesis de hemoglobina. En *Anales de Pediatría Continuada* (Vol. 7, Número 3, pp. 152–155). [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71119-9](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71119-9)

Chen, C., Li, R., Sun, J., Zhu, Y., Jiang, L., Li, J., Fu, F., Wan, J., Guo, F., An, X., Wang, Y., Fan, L., Sun, Y., Guo, X., Zhao, S., Wang, W., Zeng, F., Yang, Y., Ni, P., ... Liao, C. (2021). Noninvasive prenatal testing of α -thalassemia and β -thalassemia through population-based parental haplotyping. *Genome Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00836-8>

Colaco, S., & Nadkarni, A. (2021). Borderline HbA2 levels: Dilemma in diagnosis of beta-thalassemia carriers. En *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 788). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108387>

- Colosimo, A., Gatta, V., Guida, V., Leodori, E., Foglietta, E., Rinaldi, S., Cappabianca, M. P., Amato, A., Stuppia, L., & Dallapiccola, B. (2011). Application of MLPA assay to characterize unsolved α -globin gene rearrangements. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 46(2), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2010.11.006>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- Edwards, M. C., & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: Advantages, Development, and Applications ADVANTAGES OF MULTIPLEX PCR. *PCR Methods Appl.*, S65–S75. <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.s65>.
- Farmakis, D., Porter, J., Taher, A., Cappellini, M. D., Angastiniotis, M., Eleftheriou, A., Alassaf, A., Angastiniotis, M., Angelucci, E., Aydinok, Y., Bou-Fakhredin Rayan, R., Brunetta, L., Cappellini, M. D., Constantinou, G., Daar, S., De Sanctis, V., Dusheiko, G., Elbard, R., Eleftheriou, A., ... Yardumian, A. (2022). 2021 Thalassaemia International Federation Guidelines for the Management of Transfusion-dependent Thalassemia. *HemaSphere*, 6(8). <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000732>
- Ferrão, J., Silva, M., Gonçalves, L., Gomes, S., Loureiro, P., Coelho, A., Miranda, A., Seuanes, F., Reis, A. B., Pina, F., Maia, R., Kjöllnerström, P., Monteiro, E., Lacerda, J. F., Lavinha, J., Gonçalves, J., & Faustino, P. (2017). Widening the spectrum of deletions and molecular mechanisms underlying alpha-thalassemia. *Annals of Hematology*, 96(11), 1921–1929. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3090-y>
- Frömmel, C. (2018). Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies: A short review on classical laboratory methods — Isoelectric focusing, HPLC, and capillary electrophoresis. En *International Journal of Neonatal Screening* (Vol. 4, Número 4). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/ijns4040039>

- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Giugliani, R., Castillo Taucher, S., Hafez, S., Oliveira, J. B., Rico-Restrepo, M., Rozenfeld, P., Zarante, I., & Gonzaga-Jauregui, C. (2022). Opportunities and challenges for newborn screening and early diagnosis of rare diseases in Latin America. En *Frontiers in Genetics* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1053559>
- Gupta, P., Kumar, H., Kumar, S., & Jaiprakash, M. (2009). Cation Exchange High Performance Liquid Chromatography for Diagnosis of Haemoglobinopathies. *Medical Journal Armed Forces India*, 65(1), 33–37. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(09\)80051-8](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(09)80051-8)
- Harteveld, C. L., Achour, A., Arkesteijn, S. J. G., ter Huurne, J., Verschuren, M., Bhagwandien-Bisoen, S., Schaap, R., Vijfhuizen, L., el Idrissi, H., & Koopmann, T. T. (2022). The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. En *International Journal of Laboratory Hematology* (Vol. 44, Número S1, pp. 28–36). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13885>
- Harteveld, C. L., & Higgs, D. R. (2010). α -thalassaemia. En *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 5, Número 13). <http://www.orphandis.com/content/5/1/13>
- Hoppe, C. C. (2013). Prenatal and newborn screening for hemoglobinopathies. En *International Journal of Laboratory Hematology* (Vol. 35, Número 3, pp. 297–305). <https://doi.org/10.1111/ijlh.12076>
- Huang, R., Liu, Y., Xu, J., Lin, D., Mao, A., Yang, L., Zhong, G., Wang, H., Xu, R., Chen, ; Yiwei, & Zhou, Q. (2023). Back-to-Back Comparison of Third-Generation Sequencing and Next-Generation Sequencing in Carrier Screening of Thalassemia. *Arch Pathol Lab Med*. <https://doi.org/10.5858/arpa.2022-0168>
- Jaing, T. H., Chang, T. Y., Chen, S. H., Lin, C. W., Wen, Y. C., & Chiu, C. C. (2021). Molecular genetics of β -thalassemia: A narrative review. En *Medicine (United States)*

- (Vol. 100, Número 45, p. E27522). Lippincott Williams and Wilkins.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000027522>
- Keohane, Elaine. (2020). Thalassemias. En *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications* (Sexta, pp. 454–474).
- Kim, J. E., Kim, B. R., Woo, K. S., Kim, J. M., Park, J. I., & Han, J. Y. (2011). Comparison of capillary electrophoresis with cellulose acetate electrophoresis for the screening of hemoglobinopathies. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 31(4), 238–243.
<https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.4.238>
- Lai, K., Li, S., Lin, W., Yang, D., Chen, W., Li, M., Pang, L., & Chen, P. (2018). Invasive prenatal diagnosis of α -thalassemia to control Hb Bart's hydrops fetalis syndrome: 15 years of experience. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 298(2), 307–311.
<https://doi.org/10.1007/s00404-018-4807-4>
- Langlois, S., Ford, J. C., Chitayat, D., Désilets, V. A., Farrell, S. A., Geraghty, M., Nelson, T., Nikkel, S. M., Shugar, A., Skidmore, D., Allen, V. M., Audibert, F., Blight, C., Gagnon, A., Johnson, J. A., Douglas Wilson, R., & Wyatt, P. (2008). Carrier Screening for Thalassemia and Hemoglobinopathies in Canada. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 30(10), 950–959. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)32975-9](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(16)32975-9)
- Liang, Q., Gu, W., Chen, P., Li, Y., Liu, Y., Tian, M., Zhou, Q., Qi, H., Zhang, Y., He, J., Li, Q., Tang, L., Tang, J., Teng, Y., Zhou, Y., Huang, S., Lu, Z., Xu, M., Hou, W., ... Wu, L. (2021). A More Universal Approach to Comprehensive Analysis of Thalassemia Alleles (CATSA). *Journal of Molecular Diagnostics*, 23(9), 1195–1204.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.06.008>
- Mandu, K., Tusuubira, S. K., Mwambi, B., Webbo, F., Atuhairwe, C., & Taremwa, I. M. (2018). To test or not: Occurrence of sickle cell trait and assessment of the awareness toward its screening among patients attending magale health center IV, Namisindwa District, Eastern Uganda. *Journal of Blood Medicine*, 9, 219–225.
<https://doi.org/10.2147/JBM.S177203>

- Modell, B., & Darlison, M. (2008). Public health reviews Global epidemiology of haemoglobin disorders. En *Bulletin of the World Health Organization* (Vol. 86, Número 6). www.chime.
- Munkongdee, T., Chen, P., Winichagoon, P., Fucharoen, S., & Paiboonsukwong, K. (2020). Update in Laboratory Diagnosis of Thalassemia. En *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00074>
- Musallam, K. M., Cappellini, M. D., Coates, T. D., Kuo, K. H. M., Al-Samkari, H., Sheth, S., Viprakasit, V., & Taher, A. T. (2024). Alpha-thalassemia: A practical overview. *Blood Reviews*, 101165. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2023.101165>
- Musallam, K. M., Rivella, S., Vichinsky, E., & Rachmilewitz, E. A. (2013). Non-transfusion-dependent thalassemias. En *Haematologica* (Vol. 98, Número 6, pp. 833–844). <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.066845>
- National Health Service. (2021, noviembre 24). *SCT screening: handbook for newborn laboratories*. NHS England. <https://www.gov.uk/government/publications/sct-screening-handbook-for-newborn-laboratories/interpretation-of-results>
- National Library of Medicine. (2021, septiembre 26). *NM_000518.4(HBB):c.364G>A (p.Glu122Lys) AND HEMOGLOBIN O (ARAB)*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000016524.5/>
- National Library of Medicine. (2024a, marzo). *NM_000518.5(HBB):c.79G>A (p.Glu27Lys)*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/15161/>
- National Library of Medicine. (2024b, abril). *NM_000518.4(HBB):c.19G>A (p.Glu7Lys)*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/15126/>
- National Library of Medicine. (2024c, abril). *NM_000518.5(HBB):c.20A>T (p.Glu7Val) AND Hb SS disease*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000016574/>

- Programa Nacional de Tamizaje Neonatal. (2014). *Enfermedades detectadas*. Programa Nacional de Tamizaje Neonatal Costa Rica.
- Protti, T., Calderón, M., Solano, M., & Cartín, W. (2023). La doble heterocigosis por la mutación común en el codón 39 (C>T) (β^0) y la deleción siciliana ($\delta\beta^0$) 13.4 kb causa una beta-talasemia transfusión dependiente en dos pacientes costarricenses. *Acta Médica Costarricense*, 64(3), 1–5. <https://doi.org/10.51481/amc.v64i3.1243>
- Puehringer, H., Najmabadi, H., Law, H. Y., Krugluger, W., Viprakasit, V., Pissard, S., Baysal, E., Taher, A., Farra, C., Al-Ali, A., Al-Ateeq, S., & Oberkanins, C. (2007). Validation of a reverse-hybridization StripAssay for the simultaneous analysis of common α -thalassemia point mutations and deletions. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(5), 605–610. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.125>
- Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*, 16(1), 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
- Quest Diagnostics. (2019). *Hemoglobinopathy Evaluation*.
- Randolph, T. R. (2020). Hemoglobinopathies (Structural Defects in Hemoglobin). En *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications* (Sexta, pp. 394–423). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-53045-3.00033-7>
- Rao, E., Kumar Chandraker, S., Misha Singh, M., & Kumar, R. (2024). Global distribution of β -thalassemia mutations: An update. En *Gene* (Vol. 896). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.148022>
- Riou, J., Szuberski, J., Godart, C., Wajcman, H., Oliveira, J. L., Hoyer, J. D., & Bardakdjian-Michau, J. (2018). Precision of CAPILLARYS 2 for the detection of hemoglobin variants based on their migration positions. *American Journal of Clinical Pathology*, 149(2), 172–180. <https://doi.org/10.1093/AJCP/AQX148>
- Sabath, D. E. (2017). Molecular diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies: An ACLPS critical review. En *American Journal of Clinical Pathology* (Vol. 148, Número 1, pp. 6–15). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/AJCP/AQX047>

- Sabath, D. E. (2023). The role of molecular diagnostic testing for hemoglobinopathies and thalassemias. En *International Journal of Laboratory Hematology* (Vol. 45, Número S2, pp. 71–78). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/ijlh.14089>
- Sáenz, G. (2016). *Hematología Analítica* (Sexta, Vol. 2). EDNASSS-CCSS.
- Sanchaisuriya, K., Chunpanich, S., Fucharoen, G., & Fucharoen, S. (2004). Multiplex allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-Punjab and Hb Tak. *Clinica Chimica Acta*, 343(1–2), 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.12.029>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Biochemistry*, 74(12), 5463–5467.
- Sebia. (2012). *HYDRAGEL 7 HEMOGLOBIN(E) HYDRAGEL 15 HEMOGLOBIN(E)*.
- Sebia. (2023, marzo 23). *MiniCap Flex-Piercing*. <https://www.sebia.com/es/instruments/minicap-flex-piercing/>
- Sharma, P., & Das, R. (2016). Cation-exchange high-performance liquid chromatography for variant hemoglobins and HbF/A2: What must hematopathologists know about methodology? *World Journal of Methodology*, 6(1), 20. <https://doi.org/10.5662/wjm.v6.i1.20>
- Shook, L. M., Haygood, D., & Quinn, C. T. (2021). Clinical Utility of the Addition of Molecular Genetic Testing to Newborn Screening for Sickle Cell Anemia. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.734305>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Songdej, D., Babbs, C., & Higgs, D. R. (2017). An international registry of survivors with Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. En *Blood* (Vol. 129, Número 10, pp. 1251–1259). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-697110>

- Suwannakhon, N., Hemvuthiphan, J., Pangeson, T., Mahingsa, K., Pingyod, A., Bumrungrakdee, W., & Sanguansermisri, T. (2023). Non-invasive prenatal screening & diagnosis of β -thalassaemia in an affected foetus. *Indian Journal of Medical Research*, *157*(5), 447–452. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_3226_20
- Traeger-Synodinos, J., Harteveld, C. L., Old, J. M., Petrou, M., Galanello, R., Giordano, P., Angastioniotis, M., De La Salle, B., Henderson, S., & May, A. (2015). EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *European Journal of Human Genetics*, *23*(4), 426–437. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.131>
- Tubman, N., & Field, J. J. (2015). Sickle solubility test to screen for sickle cell trait: what's the harm? Learning Objective. *Hematology*, 433–435. <http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2015/1/433/1250906/bep00115000433.pdf>
- Vijian, D., Wan Ab Rahman, W. S., Ponnuraj, K. T., Zulkafli, Z., & Mohd Noor, N. H. (2021). Molecular detection of alpha thalassaemia: A review of prevalent techniques. *Medeniyet Medical Journal*, *36*(3), 257–269. <https://doi.org/10.5222/MMJ.2021.14603>
- Vrettou, C., Kakourou, G., Mamas, T., & Traeger-Synodinos, J. (2018). Prenatal and preimplantation diagnosis of hemoglobinopathies. En *International Journal of Laboratory Hematology* (Vol. 40, pp. 74–82). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12823>
- Wee, Y.-C., Tan, K.-L., Chua, K.-H., George, E., Mary, J.-A., & Tan, A. (2009). Molecular characterisation of Haemoglobin Constant Spring and Haemoglobin Quong Sze with a Combine-Amplification Refractory Mutation System. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, *16*(3), 21–28. www.mjms.usm.my
- Wendt, A. S., Brintrup, J., Waid, J. L., Kader, A., Lambrecht, N. J., & Gabrysch, S. (2023). Thalassaemia and hemoglobinopathy prevalence in a community-based sample in Sylhet, Bangladesh. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02821-3>

World Health Organization. (2020). *Congenital disorders*. World Health Organization.
https://www.who.int/health-topics/congenital-anomalies#tab=tab_2

Xu, L., Mao, A., Liu, H., Gui, B., Choy, K. W., Huang, H., Yu, Q., Zhang, X., Chen, M., Lin, N., Chen, L., Han, J., Wang, Y., Zhang, M., Li, X., He, D., Lin, Y., Zhang, J., Cram, D. S., & Cao, H. (2020). Long-Molecule Sequencing: A New Approach for Identification of Clinically Significant DNA Variants in α -Thalassemia and β -Thalassemia Carriers. *Journal of Molecular Diagnostics*, 22(8), 1087–1095.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.05.004>