

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE MEDICINA

**“SCREENING Y DIAGNOSTICO MOLECULAR DE
TALASEMIA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO**

AUTOR: MARÍA JOSÉ LOAIZA AGUILAR

DIRECTOR: DR. ESTEBAN ADRIÁN REIBÁN ESPINOSA

CUENCA - ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE MEDICINA

**“SCREENING Y DIAGNOSTICO MOLECULAR DE
TALASEMIA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO**

AUTOR: MARÍA JOSÉ LOAIZA AGUILAR

DIRECTOR: DR. ESTEBAN ADRIÁN REIBÁN ESPINOSA

CUENCA - ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD

María José Loaiza Aguilar portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0704850809**. Declaro ser el autor de la obra: **"Screening y Diagnóstico molecular de Talasemia"**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, 24 de Febrero de 2023

F: 
María José Loaiza Aguilar
C.I. **0704850809**

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR

Certifico que el presente trabajo denominado "**SCREENING Y DIAGNOSTICO MOLECULAR DE TALASEMIA**" realizado por **MARÍA JOSÉ LOAIZA AGUILAR** con documento de identidad No. **0704850809**, previo a la obtención del título profesional de Médico, ha sido asesorado, supervisado y desarrollado bajo mi tutoría en todo su proceso, cumpliendo con la reglamentación pertinente que exige la Universidad Católica de Cuenca y los requisitos que determina la investigación científica.

Cuenca, 24 de Febrero de 2023



F:
Dr. ESTEBAN ADRIAN REIBAN ESPINOSA
DIRECTOR / TUTOR

DEDICATORIA

Este presente trabajo va dedicado con todo mi corazón a Dios por sobre todas las cosas y a mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermana quienes nunca me dejaron en este arduo camino y me sostuvieron de su mano en cada paso que di, fomentando en mí deseos de superación y de triunfo, De igual manera a mis abuelitos maternos quienes siempre quisieron verme cumplir mi sueño inculcándome valores y respeto al prójimo, me llena de orgullo poder escribir estas palabras a las personas que más amo y dedicarles todo mi esfuerzo y dedicación hacia esta hermosa carrera que escogí para que formara parte de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento infinito en primer lugar a Dios por haberme convertido en su guerrera y ponerme en el camino obstáculos que pense nunca los superaría pero hoy en día estoy aquí, con la gran convicción y sabiduría de que cuando se quiere se puede, en segundo lugar a mis adorables y amados padres y hermana que son el pilar fundamental para levantar la cabeza todos los días y seguir adelante, quienes inculcaron en mí el amor y el apoyo incondicional, a mi abuelitos maternos que siempre pidieron a la vida ver que yo realizara mi sueño y que estuvieran aun presentes para verme triunfar, los amo con todo mi corazón, tios, tias, primos y como no podría faltar a mi mejor amiga Ma. Emilia Villacis y a toda su familia quienes siempre estuvieron presentes aportando con un granito de arena para cumplir mi sueño, ese que algún día me aferre tanto y hoy se cumple, Ahora con toda la humildad puedo decir lo logré. A todos ustedes, Gracias.

SCREENING Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TALASEMIA. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Resumen

Introducción: La talasemia es una enfermedad hereditaria caracterizada por alteración de los glóbulos rojos, evidenciándose disminución del tiempo de vida, provocando así diferentes grados de anemia. El diagnóstico puede ser realizado mediante pruebas: hemoglobina capilar, frotis de sangre periférica, citogenético, marcadores moleculares, se analizan en conjunto mediante diferentes algoritmos.

Metodología: Se realizó una revisión bibliográfica tipo scoping review para analizar las pruebas de screening y diagnóstico molecular según el tipo y la capacidad de cada una para precisar los diferentes tipos de talasemia empleadas a nivel global, mediante la revisión de artículos principalmente de los últimos cinco años publicados, en inglés y español que validan pruebas diagnósticas.

Resultados: Como pruebas iniciales, el hemograma completo, análisis específicos relacionados con la hemoglobina y pruebas genéticas.

Por otro lado, existen varios algoritmos matemáticos, siendo el más utilizado el índice RBC, máquina de vectores de soporte, índices de glóbulos rojos, fórmula de Matos & Carvalho. La secuenciación combinada de nueva generación (NGS) y gap PCR son métodos eficaces de detección sobre todo de tipo prenatal y para los portadores de talasemia.

Conclusiones: las pruebas para screening y diagnóstico molecular han mejorado en los últimos años, permitiendo identificar el tipo específico de la alteración. De la misma forma existen los algoritmos matemáticos como opciones para diagnóstico oportuno y temprano, sin dejar de lado las pruebas citogenéticas que tienen un papel importante en el resultado final.

Palabras clave: talasemia, screening, diagnóstico, algoritmos matemáticos, pruebas genéticas, hemograma.

2. Abstract

SCREENING AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF THALASSEMIA. BIBLIOGRAPHIC REVIEW

Introduction: Thalassemia is an inherited disease characterized by the alteration of red blood cells, evidencing a decrease in the life span, thus causing different degrees of anemia. The diagnosis can be made by means of tests: capillary hemoglobin, peripheral blood smear, cytogenetic, and molecular markers, which are analyzed together by different algorithms.

Methodology: A literature scoping review was performed to analyze the screening and molecular diagnostic tests according to the type and capacity of each one to determine the different types of thalassemia used globally by reviewing articles mainly from the last five years published in English and Spanish that validate diagnostic tests.

Results: As initial tests, complete blood count, specific hemoglobin-related tests, and genetic tests, on the other hand, there are several mathematical algorithms; the most widely used is the RBC index, support vector machine, red blood cell indices, and Matos & Carvalho formula. Combined next-generation sequencing (NGS) and gap-PCR are effective screening methods, especially for prenatal and for thalassemia carriers.

Conclusions: Tests for screening and molecular diagnosis have improved in recent years, allowing the identification of the specific type of alteration. In the same way, mathematical algorithms exist as options for early and timely diagnosis without neglecting cytogenetic tests that have an important role in the final result.

Keywords: thalassemia, screening, diagnosis, mathematical algorithms, genetic tests, blood count.

1. Índice

1.	Resumen	7
2.	Abstract	8
1.	Índice	9
2.	Introducción	10
3.	Planteamiento del problema	12
4.	Justificación	14
5.	Marco teórico.....	15
5.1	Epidemiología.....	17
7.2	Protocolos de prevención y control de la talasemia	17
5.3	Clasificación.....	18
5.4	Pruebas diagnósticas.....	18
6.	Barreras para la detección primaria de Talasemia	20
7.	Objetivos.	22
7.1	Objetivo General	22
7.2	Objetivos específicos.....	22
8.	Metodología	22
8.1	Tipo de diseño: revisión bibliográfica tipo Scoping Review	22
8.2	Criterios para la inclusión de estudios	23
8.3	Tipos de pruebas diagnósticas que serán analizadas	23
8.4	Criterios para la exclusión de estudios.....	23
8.5	Métodos de búsqueda para la identificación de estudios.....	23
8.6	Selección de estudios	24
8.7	Extracción y síntesis de los datos extraídos	24
9.	Resultados.....	25
	Métodos de Screening	27
9.1	Conteo sanguíneo completo (CBC).....	27
9.2	Prueba de fragilidad osmótica (OFT).....	27
9.3	Análisis de hemoglobina.....	28
9.4	Espectrometría de masas (MS).....	28
9.5	Modelado matemático.....	29
9.6	Análisis de ADN	31
10.	Discusión	35
11.	Conclusiones	41

2. Introducción

La talasemia es un conjunto de síndromes relacionados con la alteración de la hemoglobina y sus cadenas, en forma cuantitativa o cualitativa de transmisión hereditaria. En su presentación clínica algunas formas se caracterizan por anemia hemolítica con prueba de Coombs negativa. (1).

En los casos leves de talasemia generalmente presentan sintomatología inespecífica o leve, en contraste con la talasemia mayor en la cual se presentan síntomas graves según la severidad de la anemia, por lo cual en cuadros específicos puede ser necesario requerimiento transfusional de glóbulos rojos, con un control adecuado de la eliminación del hierro, cuadro que puede complicar múltiples órganos o en ciertos casos llegar a trasplante de células madre hematopoyéticas empleadas usualmente para el tratamiento de los casos severos de talasemia(2,3).

La distribución de esta enfermedad es a nivel mundial(2–4). Su diagnóstico principalmente se realiza con hemograma, estudios de electroforesis, genéticos y moleculares. En los últimos años hay un avance importante en el uso de biomarcadores que pueden ayudar en el diagnóstico, estadificación y pronóstico en los pacientes con β talasemia (5).

En sí la talasemia, es una condición de base genética que provoca una menor vida útil del glóbulo rojo (6). Consecuentemente la clínica es el resultado de una anomalía genética puesto que en general regulan la formación de la hemoglobina (7).

En relación a la herencia principalmente, es un rasgo autosómico recesivo. Se presenta por lo tanto en sujetos homocigotos cuando ambos alelos están mutados. La presencia del rasgo talasémico en la forma heterocigota no conduce a una condición patológica, por lo que a estos sujetos se los considera portadores sanos por lo tanto el cribado de la población heterocigota es

fundamental para mantener bajo control la difusión de la patología talasémica (7–9).

Por otra parte para realizar el diagnóstico es necesario un conteo sanguíneo completo, que es la prueba de detección primaria. Sin embargo, debido a las múltiples causas que pueden provocar la disminución del conteo de glóbulos rojos, el diagnóstico se considera que aun es limitado (1,10,11).

Existen varios tipos de talasemias o en otros términos rasgos de talasemia, estos últimos no tienen la enfermedad como tal pero heredan los genes que causan la misma. (12)

El diagnóstico manual se realiza por especialistas cuya decisión se basa en un índice de valores combinados matemáticamente de las características del glóbulo rojo y todo lo relacionado con su morfología, por lo que para el diagnóstico de las diferentes formas de talasemia se han propuesto pruebas diagnósticas variadas, automatizadas; al inicio se emplearon algunas pruebas de análisis de imágenes, técnicas estadísticas y de agrupamiento (13).

Luego el protocolo cambió a los sistemas expertos basados en reglas como los híbridos de red neuronal que se han probado con éxito en ensayos clínicos. Fundamentalmente estas pruebas buscan diferenciar entre una amplia gama de enfermedades hematológicas, incluida la anemia (14). Los sistemas basados en redes neuronales, una técnica de K-vecinos permite diferenciar entre dos tipos de portadores de genes talasémico y sujetos normales, hay estudios que han demostrado que esta técnica es capaz de diferenciar entre todos los tipos de talasemia. (15).

Esta revisión bibliográfica analiza las investigaciones actuales sobre los métodos de screening y diagnóstico molecular para la detección de la talasemia.

3. Planteamiento del problema

Debido a que muchas de estas técnicas que buscan un diagnóstico seguro del defecto genético son lentas y costosas, es importante contar con un sistema automatizado de apoyo al diagnóstico que se ocupe principalmente de los datos hemocromocitométricos y de la cuantificación simple de HbA2.

La clasificación de talasemia generalmente se puede formular en un problema de reconocimiento de patrones. En esta revisión bibliográfica se busca sintetizar los procedimientos de screening y diagnóstico molecular empleados en la actualidad, analizar sus costos, su aplicabilidad, su efectividad y seguridad para un diagnóstico certero, según los tipos de talasemia.

La talasemia es una enfermedad que puede pasar desapercibida en los casos leves, pero en los casos graves puede comprometer la vida de los pacientes (9). El diagnóstico y manejo de la talasemia no es fácil de realizar, es necesario una serie de pruebas para identificar el tipo de talasemia (16). El tratamiento tampoco es sencillo, requiere de la aplicación de protocolos que buscan mejorar la condición de la anemia, con transfusiones sanguíneas y en otros casos trasplantes con células madre con el propósito de buscar la curación (17). Todos estos procedimientos y cuidados son costosos, no siempre están disponibles en todas las instituciones de salud, especialmente en países subdesarrollados, y el costo puede limitar su acceso. Por lo tanto, es una enfermedad que compromete y deteriora seriamente la calidad de vida del paciente, de su núcleo familiar y puede ser un problema social si su ocurrencia es alta (18,19).

La talasemia y otras hemoglobinopatías actualmente se consideran problemas globales debido a la alta dispersión por la migración desde áreas nativas como el Mediterráneo, África y Asia, siendo ahora endémica toda Europa, las Américas y Australia (20). En el manejo de los pacientes con talasemia, también es importante el diagnóstico molecular, debido a que el desarrollo de aloanticuerpos hemolíticos y autoanticuerpos eritrocitarios complica la terapia de transfusión en pacientes con talasemia (20). Sin tratamiento la β -talasemia mayor es letal en la

primera década de vida debido a la compleja fisiopatología, que conduce a amplias manifestaciones clínicas (21).

No hay un protocolo único de diagnóstico para talasemia y para la detección de portadores en la población, a nivel mundial el diagnóstico de la talasemia depende de la manera en que están estructurados los programas de detección de portadores de talasemia, los cuales pueden variar dependiendo si estos son obligatorios o voluntarios, la educación, el asesoramiento genético y si la detección se realiza antes del embarazo o antes del parto (22).

Pregunta de investigación: ¿cuáles son las pruebas de screening y diagnóstico molecular según el tipo y la capacidad de cada una para precisar los diferentes tipos de talasemia empleadas a nivel global?

4. Justificación

Una revisión bibliográfica de la talasemia sobre los métodos de screening y diagnóstico es importante para mejorar los protocolos de atención de los pacientes con sospecha de la enfermedad, en quienes se busca además de diagnosticar, identificar el tipo de talasemia para emplear los mejores tratamientos disponibles en la actualidad y adaptarlas a nuestro medio. De la misma manera en relación a la mejora de métodos diagnósticos con el desarrollo de nuevas tecnologías y estrategias de análisis que ayudan para un diagnóstico y tratamiento más certero, en vista de que no hay una prueba única para confirmar la talasemia, es necesario en muchos casos una serie de pruebas las cuales, han evolucionado en los últimos años y que de alguna manera nos ayudara a mejorar los protocolos de atención, especialmente ajustados a la disponibilidad de insumos, tecnología, recursos y profesionales en cada centro de salud en diferentes partes del mundo.

En esta revisión bibliográfica se analiza el diagnóstico según clasificación de la talasemia, una descripción de los laboratorios y requisitos, las diferentes pruebas de laboratorio según sus aplicabilidad, utilidad, costos e indicaciones, según las experiencias de diferentes países, donde es más frecuente esta enfermedad y existe más evidencia, consecuentemente desarrollo de diferentes métodos que contribuirían al adecuado diagnóstico y manejo.

5. Marco teórico

La talasemia es un tipo de hemoglobinopatía hereditaria que da como resultado defectos en la producción de hemoglobina (9,12,13); está presente en diferentes formas, la mejor y más conocida de ellas es la llamada α y β talasemia, dependiendo de si los genes mutados son de la cadena α o β de la hemoglobina respectivamente. Hay diferentes tipos de talasemia- α según su mutación genéticas. En la β -talasemia menor, una copia del gen de la cadena β es defectuosa y, por lo general, los afectados no tienen síntomas, excepto en el embarazo, sobreañadido a su efecto fisiológico (7). En contraste con la talasemia- β mayor que es la forma más severa de talasemia y se caracteriza por la mutación de ambas copias del gen que codifica la cadena β . (12).

El reconocimiento de portador de talasemia α y β se basa en un análisis de primer nivel realizado con datos hemocromocitométricos y un examen de segundo nivel (cuantificación de HbA2, síntesis de cadenas de globina y análisis genético (11,16,22,24).

Las alfa talasemias se caracterizan por un déficit en la producción de las cadenas de globina alfa de la hemoglobina. Se hereda como un trastorno autosómico recesivo con un espectro clínico desde curso asintomático (en el caso de portadores silentes) hasta formas más severas de hemólisis y muerte en el periodo neonatal.

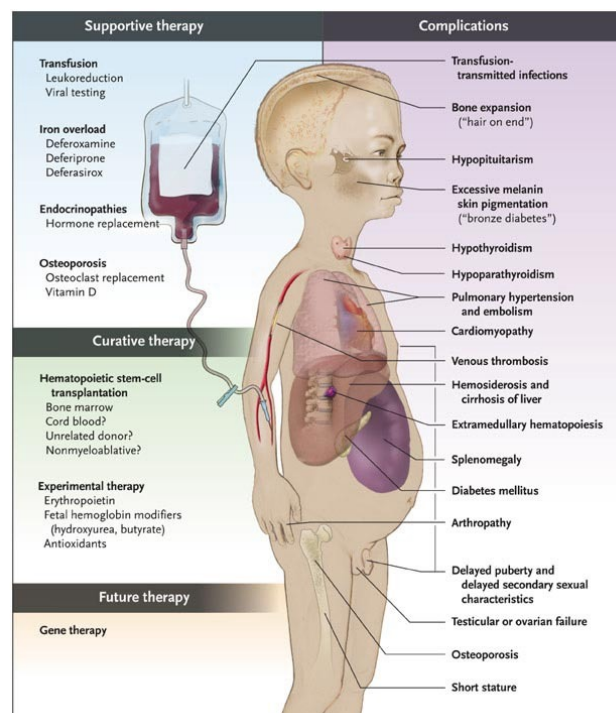
Estos cuadros clínicos se correlacionan con la pérdida de uno hasta cuatro genes de alfa globina (HBA2 y/o HBA1) respectivamente. Las formas mutacionales, menos frecuentes, son en general un poco más severas que las delecionales correspondientes porque el sistema proteolítico debe degradar no sólo las cadenas de beta globina excedentes sino también las de alfa globina anómalas.

Por otro lado si en bien es cierto la β talasemia menor por lo general no presenta sintomatología hay ocasiones en la cual se ve alterada la inmunidad del huésped fisiológicamente o no, como se mencionó anteriormente en el caso del

embarazo o en el caso de algunas enfermedades sistémicas en las que es necesario la suplementación con ácido fólico. (10,11)

Sin embargo, la anemia asociada con la talasemia puede ser grave y se acompaña de eritropoyesis ineficaz, con expansión ósea y hematopoyesis extramedular en el hígado, el bazo y otros sitios, como masas paravertebrales. El tratamiento principal de este trastorno es la terapia transfusional que permite un crecimiento, desarrollo normales y suprime la eritropoyesis ineficaz (12). Debido a la alto requerimiento transfusional que mencionamos anteriormente existe mayor predisposición a sobrecarga de hierro por entrada de Hierro directo a los depósitos en hígado, y al no existir sistema de excreción, posteriormente va a producir daño en diferentes órganos y consecuentemente será necesario realizar quelación del mismo. Por otro lado se ha demostrado que dentro de las causas de muerte en este tipo de pacientes son las infecciones.

En relación al tratamiento la opción terapéutica curativa se encuentra el trasplante de médula ósea y con los nuevos avances a futuro probablemente las terapias génicas así como otros medios moleculares podrían ser factibles (9,10,11).



Manejo de la Talasemia y complicaciones relacionadas con el tratamiento. Tomado del NEJM. (7)

5.1 Epidemiología

Aproximadamente cada año 70.000 infantes nacen con β talasemia a nivel mundial (25). En china la prevalencia general de α -talasemia, β talasemia y α/β -talasemia es del 7.88%, 2.21% y 0.48% respectivamente (4). La talasemia puede ser encontrada en más de 60 países en el mundo, con una población de portadores (heterocigotos) de hasta 150-200 millones de personas o el 4.5% de la población mundial, y al menos 300.000 homocigotos afectados letalmente nacen anualmente (3).

La β talasemia tradicionalmente ha sido más común en ciertas regiones del mundo, como el Mediterráneo, Medio Oriente y el sudeste asiático. Sin embargo, está aumentando en otras partes del mundo incluido Norte de Europa y América del Norte, principalmente debido a la migración (26).

7.2 Protocolos de prevención y control de la talasemia

La prevención y control de la talasemia consiste principalmente en consejo genético, desencadenando la necesidad de cribado obligatorio con la realización de diversos programas que orienten a la población en relación a las consecuencias en caso de no realizarlo(27).

El tamizaje neonatal es una estrategia para ofrecer un diagnóstico temprano para los niños afectados y a su vez para proveer asesoramiento genético a las familias (28). El diagnóstico de talasemia en recién nacidos se puede realizar mediante la separación y medición de las fracciones de hemoglobina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis capilar (EC) o enfoque isoeléctrico (IEF) (29).

La talasemia se caracteriza por la formación de γ 4(Hb Bart) tetrámeros al nacer, lo cual es el objetivo principal de detección ideal ampliamente utilizado (30). Las fracciones normales de hemoglobina en un recién nacido no prematuro son: Hb

F = 80%, Hb A=20% (31). La ausencia o niveles muy bajos de hemoglobina A ($\leq 1.5\%$) es casi diagnóstico de β -talasemia mayor o intermedia, con una sensibilidad del 98.5% y una especificidad del 99.9% (32).

Mientras que la fracción HbA₂, el marcador clásico del rasgo de β -talasemia, suele ser indetectable o en un nivel muy bajo al nacer. Por ello en el recién nacido en el tamizaje neonatal se emplea más la detección de Hb A (32).

5.3 Clasificación

Las β -talasemias se clasificaron anteriormente como talasemia mayor, talasemia intermedia y talasemia menor, pero una clasificación más útil es la de talasemia dependiente de transfusiones (TDT) o talasemia no dependiente de transfusiones (TNDT). La decisión de iniciar transfusiones periódicas incluye datos de laboratorio objetivos, así como hallazgos clínicos. Se recomienda la transfusión si el nivel de hemoglobina en estado estacionario es inferior a 7 g/dL. El crecimiento deficiente, el desarrollo de prominencia frontal o hiperplasia maxilar u otros síntomas de anemia y eritropoyesis ineficaz, incluso en ausencia de anemia grave, deben impulsar el inicio de transfusiones (33).

5.4 Pruebas diagnósticas

El diagnóstico de la talasemia requiere una evaluación integral que combine fenotipos de glóbulos rojos, perfiles de hemoglobina y análisis de ADN, mismos que se puede realizar a cualquier edad; sin embargo, la interpretación requiere de rangos específicos para cada edad. Para confirmar el diagnóstico clínico es necesario análisis genético de las mutaciones de globina, además de ser un parámetro para el asesoramiento genético, el cálculo del riesgo genético y las pruebas genéticas prenatales y preimplantacionales (34).

- **Análisis de morfología del glóbulo rojo:** el análisis de imágenes automatizado para clasificar la anemia directamente sobre la base del tamaño de los glóbulos rojos, mediante frotis de sangre periférica. La

clasificación de la anemia y la graduación de la anisocitosis se obtiene independientemente del recuento de glóbulos rojos.

Síndromes talasémicos y hemoglobinopatías talasémicas, son fácilmente sospechables por su microcitosis e hipocromía, sobre todo si están presentes también en familiares consanguíneos, recordando que hay otras causas de microcitosis hipocrómica (ferropenia, anemias sideroblásticas hereditarias) y no hipocrómica (anemias con esquistocitos).

a) La presencia de punteado basófilo y de una Hb A2 mayor de 3.5 % prácticamente certifican el diagnóstico de una β -talasemia heterocigota (talasemia menor) (35).

b) La coexistencia de microcitosis hipocrómica y de una banda anómala en la electroforesis de hemoglobina hará sospechar una hemoglobinopatía talasémica: banda entre Hbs A y A2 (11-15 %) y ascendencia mediterránea orientarán hacia una Hb Lepore (deleccional), banda en posición de Hb A2 (20-25 %) y ascendencia del sudeste asiático sugerirán una Hb E (mutacional). El estudio familiar es fundamental en el diagnóstico diferencial de coherencia de una hemoglobinopatía y de un síndrome talasémico (35).

c) Si los valores eritrocíticos son más bajos (Hb < 9 g/dL) de lo esperable para una talasemia menor corresponderá sospechar una talasemia intermedia(5), eventualmente con presencia de eritroblastos circulantes, por lo que se impone el estudio de ambos padres, uno de los cuales puede ser hematimétricamente normal, por ejemplo, por presencia de una triple a heterocigota (aa/aaa) (35).

d) Los pacientes con talasemia mayor se presentan con anemia muy severa a partir de los 4-6 meses de vida y generalmente se diagnostican antes de los 2 años de edad (35).

e) Una Hb A2 tirando a baja ($< 2\%$) hará pensar en α -talasemia(6), ya sea rasgo α -talasemia, con valores e índices eritrocíticos en el límite inferior normal, o portador de α -talasemia, con valores y sobre todo índices eritrocíticos disminuídos, en grado similar a los de una β -talasemia heterocigota (35).

f) Si los valores eritrocíticos son más bajos (Hb < 9 g/dL) de lo esperable para una α -talasemia leve corresponderá sospechar una enfermedad con Hb H (homotetrámeros β_4), eventualmente con presencia de cuerpos de inclusión (pelotas de golf) en coloraciones supravitales (azul brillante de cresilo), por lo que se impone un estudio de ambos padres, posiblemente uno con rasgo de α -talasemia y el otro portador de α -talasemia (35).

- **Hemoglobina capilar:** consiste en la separación y cuantificación de la hemoglobina. La interpretación de los resultados se basa en determinar la presencia de Hb Bart como diagnóstico de α talasemia. El empleo de múltiples parámetros y reglas de interpretación es necesario para el diagnóstico de β -talasemia. En estos casos se emplean programas de computadora con diversos algoritmos para precisar el diagnóstico (36).
- **Análisis molecular:** se realiza para todos los pacientes en sincronía. Se extrae el ADN genómico de muestras de sangre seca utilizando un extractor automático de ácidos nucleicos. Se busca determinar las tres deleciones comunes de α -talasemia (36).

6. Barreras para la detección primaria de Talasemia

Entre las barreras que se han identificado para la detección primaria de la talasemia en Arabia Saudita son las bodas planificadas 43%, miedo a la desgracia social 21%, presión de la familia 17% y factores religiosos 14%. En Omán las barreras son temor a los resultados positivos 4%, lo cual lo consideran como un insulto. En Irán tiene influencia la carga financiera de las parejas, la

fobia de las enfermedades, el miedo a los resultados positivos, la dificultad de accesibilidad, las variaciones étnicas y los factores sociodemográficos. En Pakistán son importantes factores como la situación económica, la religión y la falta de conciencia (25).

7. Objetivos.

7.1 Objetivo General

Analizar las pruebas de screening y diagnóstico molecular según el tipo y la capacidad de cada una para precisar los diferentes tipos de talasemia empleadas a nivel global.

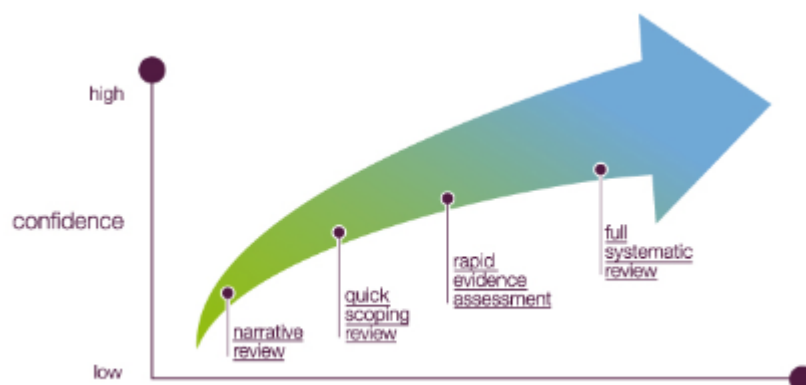
7.2 Objetivos específicos

- 8.2.1 Describir las principales pruebas de screening y diagnóstico molecular según las indicaciones, el método empleado, la eficacia y seguridad.
- 8.2.2 Comparar los diferentes estudios según las experiencias reportadas al momento del diagnóstico con el uso de diferentes protocolos para el diagnóstico de talasemia.

8. Metodología

8.1 Tipo de diseño: revisión bibliográfica tipo Scoping Review

Este tipo de revisiones son más estructuradas que las revisiones narrativas, pero no son tan complejas como una revisión sistemática. Su objetivo es identificar la naturaleza y el alcance de la evidencia de las investigaciones publicadas en los artículos científicos.



8.2 Criterios para la inclusión de estudios

Tipos de participantes: se consideraron estudios con personas de todas las edades, con mayor énfasis en estudios prenatales y natales en los cuáles se hayan analizado protocolos para el diagnóstico de talasemia. Dado que existe una amplia gama de pruebas diagnósticas se revisaron algunos estudios para el análisis histórico de desarrollo de estas pruebas, y se seleccionaron especialmente los estudios de los últimos cinco años para presentar la información actualizada.

8.3 Tipos de pruebas diagnósticas que serán analizadas

Se incluyeron estudios en los cuales se hayan probado la utilidad de análisis de imágenes, hemoglobina capilar y análisis moleculares. Los diseños de estudios que se consideraron fueron estudios transversales para diagnóstico de talasemia y diseños de validación de pruebas diagnósticas, además de observacionales.

8.4 Criterios para la exclusión de estudios

En la revisión bibliográfica no se incluyeron estudios de casos clínicos, estudios cualitativos, o estudios en los cuales no se haya evaluado las pruebas diagnósticas para determinar su validez y utilidad. Se excluyeron también estudios en los cuales no se describen las pruebas diagnósticas empleadas para el diagnóstico de talasemia.

8.5 Métodos de búsqueda para la identificación de estudios

Se buscó estudios publicados relevantes en las principales bases de datos, en idioma español o inglés preferentemente de los últimos 5 años. Las estrategias de búsqueda incluyeron los siguientes términos: talasemia OR thalassaemia AND Diagnostic, OR (thalassaemia AND Tests) OR (thalassaemia AND Screening) OR Molecular AND thalassaemia Tests).

La búsqueda incluyó bases de datos como la Cochrane Central Registered of Controlled Trials (CENTRAL), MEDLINE), PubMed, Embase Ovid, US National of Health Ongoing Trials Register Clinical Trials, SCOPUS, Web of Science, Organización Mundial de la Salud (OMS). También se analizaron trabajos de la American Society of Hematology; the British Society for Haematology Annual Scientific Meeting; the Caribbean Public Health Agency Annual Scientific Meeting (formerly known as the Caribbean Health Research Council Meetings) and the National Sickle Cell Disease Program Annual Meeting.

8.6 Selección de estudios

La selección de los estudios se realizó con el apoyo del director de la tesis quien tienen formación y experiencia en el tema planteado, además del apoyo metodológico del asesor de tesis. También, para la selección de los estudios se solicitó el apoyo de otro médico especialista en el tema. Se obtuvieron los estudios completos potencialmente relevantes y se determinó de forma independiente si cumplen con los criterios de inclusión predefinido de la revisión bibliográfica mediante un formulario elaborado previamente.

8.7 Extracción y síntesis de los datos extraídos

Se extrajeron los datos de los estudios incluidos en un formulario de recopilación de datos especialmente diseñado que incluya el título, autor, años, tipo de estudio y resultados principales.

9. Resultados

La talasemia es un grupo heterogéneo de trastornos genéticos consecuencia de una disminución de la síntesis de las cadenas alfa o beta de la hemoglobina (17). La hemoglobina es la proteína transportadora del oxígeno, la misma que esta compuesta por dos proteínas, una alfa y una beta. La alteración en la formación de estas proteínas provoca que los glóbulos rojos no se formen correctamente y no puedan transportar suficiente oxígeno, se manifiesta con una anemia que comienza en la infancia y dura toda la vida (37).

La talasemia es una enfermedad hereditaria, por lo cual uno de los padres debe ser portador de la enfermedad. La causa es una mutación genética o la eliminación de ciertos fragmentos de genes clave. La α talasemia se debe a la eliminación del gen de la globina alfa lo que provoca una producción disminuida o nula de cadenas de globina alfa (38). El gen de la globina alfa tiene 4 alelos y la gravedad de la enfermedad varía de leve a grave según el número de deleciones de los alelos. La deleción de cuatro alelos es la forma más grave en la que no se producen globinas alfa y el exceso de cadenas gamma (presentes en el período fetal) forma tetrámeros; ésta es incompatible con la vida y produce hidropesía fetal. La deleción de un alelo es la forma más leve y en su mayoría es clínicamente silenciosa (39).

La B talasemia resulta de mutaciones puntuales en el gen de la globina beta. Se divide en cuatro categorías según la cigosidad de la mutación del gen beta. Una mutación heterocigótica (beta-plus-talasemia) da como resultado una betatalasemia menor en la que las cadenas beta están subproducidas; las manifestaciones son leves y es generalmente asintomática. La talasemia beta mayor es causada por una mutación homocigótica (talasemia-beta-cero) del gen de la globina beta, lo que resulta en la ausencia total de cadenas beta. Clínicamente se manifiesta con ictericia, retraso del crecimiento, hepatoesplenomegalia, anomalías endócrinas y anemia grave que requiere de transfusiones de sangre de por vida. La condición entre estos dos tipos se llama betatalasemia intermedia con síntomas clínicos de leves a moderados (40–42).

Para el diagnóstico se pueden solicitar las siguientes pruebas: hemograma completo para determinar la cantidad de hemoglobina y los diferentes tipos de células sanguíneas, principalmente los glóbulos rojos. Quienes tienen talasemia producen menos glóbulos rojos sanos y menos hemoglobina que lo normal (trastornos cuantitativos o cualitativos), de la misma forma se pueden identificar en los glóbulos rojos como: menor tamaño o diferentes formas. Los análisis especiales de la hemoglobina son necesarios para evaluar el tipo de hemoglobina en la muestra de sangre. La electroforesis ayuda a determinar la hemoglobina anormal. Los análisis genéticos sirven para determinar el tipo específico de talasemia (43).

Los análisis prenatales se realizan para diagnosticar si un producto tiene talasemia y determinar el grado de la posible severidad de la enfermedad. Estos exámenes incluyen el muestreo de vellosidades coriónica que se realiza entre la semana 11 de la gestación, y la amniocentesis que se puede realizar entre la semana 16 de la gestación en una muestra de líquido amniótico. Entre las bases del diagnóstico está la presencia de microcitos, la misma que no se relaciona con el grado de anemia, el tener antecedentes familiares, el diagnóstico de anemia microcítica de por vida, recuento de eritrocitos normal o elevado, cambios en la forma de los eritrocitos con microcitos, hipocromía, acantosis y dianocitos (44).

Tabla N.1 Pruebas de hemoglobina y algoritmos matemáticos

Referencia	Método	Diseño estudio	País	Año	Resultados principales
Jia et al (45)	Espectrometría	Validación de prueba diagnóstica	China	2018	Se proporcionó las características Raman de los glóbulos rojos en pacientes con β -talasemia mayor se apoya el uso de LTRS como método para la detección de β -talasemia mayor.
Ambayya et al, (46)	$\alpha\beta$ Algoritmo	Validación de prueba diagnóstica	Malasia	2021	Sensibilidad 92%, especificidad 90% para discriminar la talasemia α de la β .
Azma et al, (47)	Studio comparativo	Validación de prueba diagnóstica	Malasia	2018	Los parámetros de glóbulos rojos para los rasgos de talasemia α parecían ser más altos que los rasgos de talasemia β . Las diferencias en los parámetros de glóbulos

					rojos en la detección de primera línea para portadores de talasemia parecen ser útiles en la estrategia para una decisión rentable sobre las pruebas de confirmación adicionales que se deben realizar.
Shine et al, (48)	Studio comparativo	Prueba diagnóstica	EEUU	1977	Método que incluye electroforesis de hemoglobina, volumen corpuscular medio y y determinación de A2. En esta serie, este nuevo método detectó 137 de 138 heterocigotos con un 4,4 % de falsos positivos.
Roth et al, (49)	Método matemático	Prueba diagnóstica	Israel	2017	La fórmula SVM mostró una sensibilidad del 98% y un valor predictivo negativo del 99.7%. Encontramos una fórmula confiable que se puede incorporar a cualquier contador de sangre automático para alertar a los proveedores de salud sobre la posibilidad de que una mujer sea portadora de β -talasemia.
Matos et al, (50)	Desarrollo de un índice	Prueba diagnóstica	Brazil	2016	La fórmula llamada Matos & Carvalho tiene una sensibilidad 99.3%, especificidad 76.7%, eficiencia 95.7%, índice de Youden 0.95 y un área bajo la curva de 0.83. El desempeño de este índice es excelente.

Métodos de Screening

9.1 Conteo sanguíneo completo (CBC)

Esta prueba es quizás el principal método por ser la más utilizada debido a su bajo costo y simplicidad. Se basa en determinar numerosos parámetros de los glóbulos rojos que expliquen la anemia, de los cuales los más utilizados son el volumen corpuscular medio (MVC) y la hemoglobina corpuscular media (MCH).

9.2 Prueba de fragilidad osmótica (OFT)

Es un método para detectar la resistencia de los eritrocitos a la hemólisis hipotónica que se puede utilizar para la detección y el diagnóstico diferencial de la talasemia. Los pacientes con talasemia tienen una fragilidad reducida de la membrana de los eritrocitos debido a anomalías morfológicas, metabólicas y bioquímicas de sus membranas, lo que da como resultado un menor grado de

hemólisis en soluciones hipotónicas que en los eritrocitos normales. Esta prueba se puede realizar mediante métodos cuantitativos y cualitativos.

9.3 Análisis de hemoglobina

El análisis de la hemoglobina es un importante método de detección que estima el tipo de talasemia al detectar la expresión de globina en un paciente. Actualmente, los métodos de análisis de Hb más utilizados en clínica incluyen la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la electroforesis capilar (CE), que incluyen principalmente el enfoque isoeléctrico capilar (CIEF) y la electroforesis de zona capilar (CZE).

Matos et al, (50) propone un nuevo índice para discriminar entre anemia ferropénica y rasgo talasémico sobre todo de utilidad para países subdesarrollados por la simplicidad del método y su bajo costo. Para el estudio se utilizaron datos de hemogramas de 291 pacientes algunos con rasgo talasémico y otros con anemia por deficiencia de hierro respectivamente. La deficiencia de hierro, el rasgo de β talasemia y α talasemia se confirmaron mediante pruebas estándar de oro: ferritina baja para anemia por deficiencia de hierro, $HbA_2 > 3.5\%$ para el rasgo de β talasemia y uso de biología molecular para el rasgo de α talasemia. La nueva fórmula propuesta se denomina Matos & Carvalho que tiene una sensibilidad del 99.3%, especificidad 76.7%, eficiencia 95.7%, índice de Youden 76.0, área bajo la curva 0.95 y coeficiente de Kappa de 0.83. por lo cual concluyen que el desempeño de este índice es excelente.

9.4 Espectrometría de masas (MS)

Esta prueba se basa en que la muestra ingresa a la fuente de iones a través del sistema de inyección que genera una variedad de iones fragmentados con diferentes relaciones masa-carga (m/z) debido a las diferentes propiedades estructurales y ionización, separa los iones según las diferencias en m/z , y obtiene el espectro de masas de iones. Los espectrómetros de masas se pueden utilizar junto con sistemas de separación como cromatografía líquida-

espectrometría de masas (LC-MS), electroforesis capilar-espectrometría de masas.

Jia et al (45), al estudiar las diferencias entre los espectros Raman de los glóbulos rojos (RBC) y entre pacientes con β -talasemia y controles que utilizan el sistema de espectroscopia Raman con pinzas láser (LTRS) observaron que las intensidades de los espectros Raman de los glóbulos rojos de la β -talasemia (mayor y menor) fueron más bajas que las de los controles, especialmente en las bandas 1546, 1603 y 1609 cm^{-1} . Concluyen que las características Raman de los glóbulos rojos en pacientes con talasemia beta mayor se pueden diferenciar y plantean que el uso de LTRS como método para la detección de β -talasemia mayor, la tasa de reconocimiento de la β -talasemia menor debe mejorarse aún más.

Shine et al, (48) comparo los mejores métodos de detección de β talasemia menor utilizando índices de glóbulos rojos. El autor ideó un método que consta de tres partes: 1) electroforesis de hemoglobina, 2) cálculo del producto del cuadrado del volumen corpuscular medio (M.C.V) multiplicado por la hemoglobina corpuscular media (M.C.H) medida en unidades de cien, 3) determinación de A2 en todas las muestras AA con $(\text{M.C.V})^2 \times \text{M.C.H.} < 1530$ y en aquellos con genotipos variantes consistentes con talasemia. En su estudio el autor fue capaz de detectar con este método 137 de 138 heterocigotos con un 4.4% de falsos positivos.

9.5 Modelado matemático

La computación biológica involucra el diseño y desarrollo de técnicas computacionales (51). Es un método para refinar problemas prácticos, abstraerlos en modelos matemáticos, encontrar soluciones a los modelos, verificar la racionalidad de los modelos y luego usar modelos realistas para resolver problemas prácticos. El modelado matemático se usa ampliamente en el análisis de proteínas, la secuenciación contable y el análisis de imágenes biológicas en medicina. El modelo matemático más empleado en la detección de talasemia es el índice RBC (52).

Roth et al, (49) también propone un método matemático basado en el algoritmo de la máquina de vectores de soporte (SVM) en la búsqueda de una fórmula confiable que pueda diferenciar entre portadores de talasemia y no portadores, incluidos recuentos normales o recuentos sospechosos de pertenecer a mujeres con deficiencia de hierro. Esta fórmula tiene una sensibilidad >98% y un valor predictivo negativo >99.7%. El algoritmo inicialmente utiliza todos los datos relevantes de los recuentos de glóbulos rojos, incluidos Hgb, Hc, RBC, MCV, MCH, MCHC y RDW. Después de ejecutar toda la base de datos, el algoritmo elige los valores más relevantes y descarta los demás. El corte de la fórmula SVM es "0". Cualquier número negativo se considera portador de β talasemia y cualquier número positivo se considera "no portador".

Ambayya et al, (46) propone un nuevo algoritmo $\alpha\beta$ como una herramienta de evaluación sustituta rápida y económica de la talasemia α y β en la detección de rasgo talasémico en la población en regiones geográficas con una alta carga de estos trastornos hereditarios. Este algoritmo incluye el análisis de los glóbulos rojos (RBC) y los parámetros de las células de reticulocitos (CPD) para el diagnóstico diferencial de talasemia α y β . El nuevo algoritmo $\alpha\beta$ (MN-LMALS-RET \times RDW) – MCH) tiene una sensibilidad del 92% y una especificidad del 90% para discriminar el rasgo α del β de la talasemia.

Azma et al, (47) también demostró la utilidad de este algoritmo para la diferenciación de talasemia α y β en función de parámetros de glóbulos rojos (nivel de Hb, MCH, MCV y nivel de RBC) empleando un analizador LH 750 FBC de Beckman Coulter (EEUU). El estudio incluyó un total de 299 pacientes, de los cuales 160 tenían rasgos de α talasemia y 139 rasgos de β talasemia. Se identificó que los pacientes portadores de α talasemia tienen un nivel más alto de Hb, al igual que MCV y MCH.

Tabla N.2 Pruebas genéticas

Referencia	Método	Diseño estudio	País	Año	Resultados principales
Zhang et al (53)	NGS (TCS) + Gap-PCR vs. TM	Population screenin	China	2019	12.1% de las variantes no fueron detectadas por TM, con 35 parejas en riesgo adicionales identificadas por NGS.
Zhao et al. (54)	NGS (TCS) + Gap-PCR vs. TM	Premarital screening	China	2020	El método NGS combinado detectó siete mutaciones raras adicionales que no fueron detectadas por TM
Tan et al. (55)	NGS (TCS)	Recién nacidos screening	China	2021	El método NGS detectó 65 portadores que TNM no detectó. 3/10 de los bebés con β talasemia mayor identificados por NGS mostraron síntomas clínicos durante la etapa de seguimiento y recibieron intervenciones tempranas
Adekile el al. (56)	NGS (TCS)	Prueba diagnóstica	Kuwait	2021	El método NGS dio una tasa de diagnóstico más alta (29.4%) en comparación con TM (27.7%)
Erich et al. (41)	NGS (TCS)	Diagnóstico prenatal no invasivo	USA	2022	El método NGS mostró un diagnóstico fetal correcto en 9/10 casos con un resultado no concluyente debido a contaminaciones maternas directas.

9.6 Análisis de ADN

En los últimos años la secuenciación de nueva generación (NGS) y la reacción en cadena de la polimerasa combinadas con fusión de alta resolución (PCR-HRM) se han utilizado ampliamente. Los métodos de pruebas genéticas se están utilizando gradualmente para la detección de talasemia para reducir la cantidad de diagnósticos perdidos.

Zhang et al, (53) observó en 15807 muestras recolectadas de residentes de Chenzhou un total de 2973 presuntos portadores de talasemia, los cuales fueron caracterizados adicionalmente mediante secuenciación combinada de próxima generación (NGS) y gap-PCR. Encontraron 1704 sujetos portadores de talasemia con una tasa de prevalencia del 10.78%, incluidos 943 portadores de α talasemia, 708 portadores de β talasemia y 53 portadores compuestos de talasemia α y β . Se caracterizaron 19 variaciones de α talasemia y 21 variaciones de β talasemia. Aproximadamente 2.88% de los portadores de talasemia no se

detectarían en el análisis genético tradicional. La combinación de NGS y gap-PCR es un método de detección de talasemia eficaz.

Zhao et al, (54) en una muestra de 944 parejas antes del embarazo mediante un método hematológico de rutina y una combinación gap-PCR y NGS con el propósito de investigar la utilidad de estas pruebas para la detección de portadores de talasemia en la población China, encontró que la tasa de α y β talasemia fue del 0.4%. También identificaron siete mutaciones nuevas incluidas HBA1: c.412A>G, -50 (G>A), HBB: c.*+129T>A, HBB: c.64G>C, HBB: c.-180G>C, HBB: c.*+5G>A y HBB: c.113A>G. Al comparar el método gap-PCR y NGS combinado, la estrategia de detección de MCV+MCH y HbA2 mostró una sensibilidad más baja del 61.05% y una proporción de diagnósticos perdidos más alta del 38.95% para las mutaciones de talasemia α . La sensibilidad mejoró con la detección de MCV+MCH y HbA2 en comparación con la detección de MCV+MCH para β talasemia (98.51% vs 85.80%). Por lo cual llegan a la conclusión que el método combinado de gap-PCR y NGS es un método rentable para la detección de portadores de talasemia, particularmente para los portadores de la mutación de talasemia α .

Tan et al, (55) en otro estudio realizado en China con 18309 recién nacidos examinados para talasemia, reportan que la tasa de talasemia es del 12.90%; la tasa de talasemia α fue de 8.91% y de β talasemia fue de 3.86%. Se identificaron 22 genotipos de α talasemia y 18 genotipos de β talasemia. Metodológicamente NGS-Gap-PCR es superior a los métodos de detección tradicionales, con 65 casos más detectados por NCF-Gap_PCR. Este método proporciona una poderosa herramienta para las pruebas genéticas neonatales y el diagnóstico clínico de talasemia, especialmente para regiones de alta prevalencia.

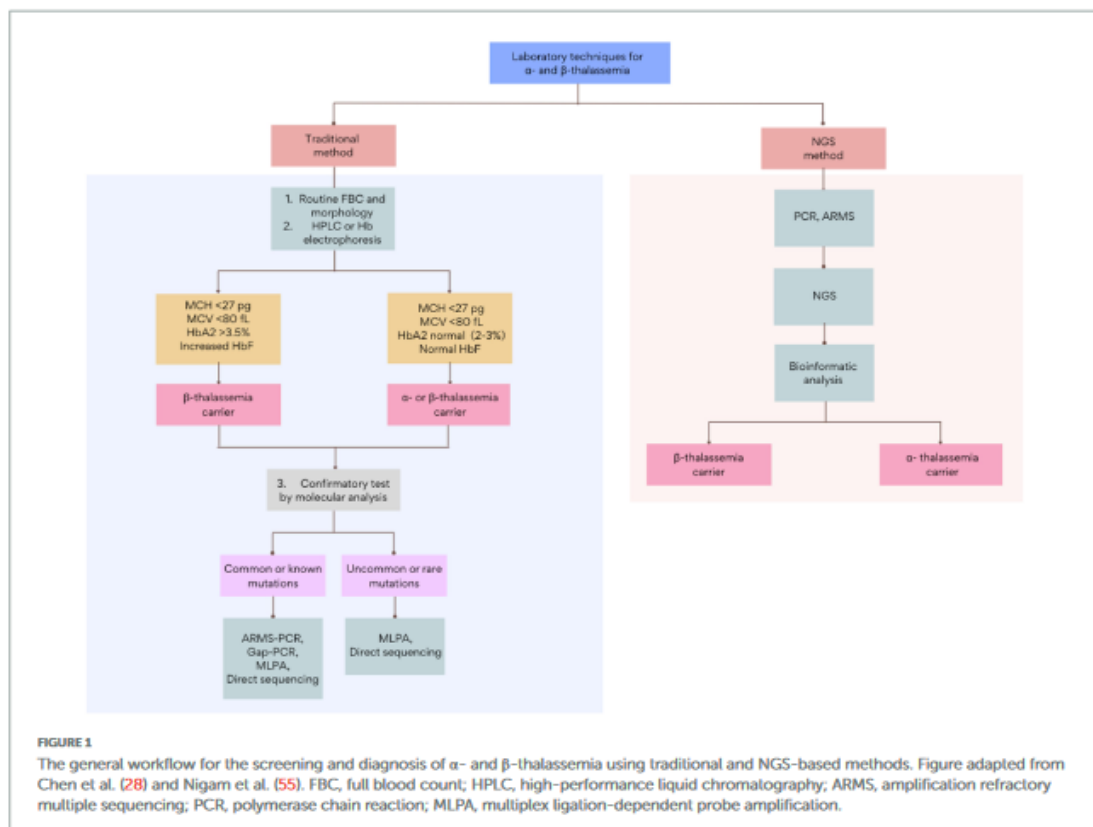
Adekile et al, (56) evaluaron la secuenciación de próxima generación para el diagnóstico de genotipos de HbS e identificación de mutaciones de β talasemia en pacientes con Hbs β talasemia, de 232 pacientes el análisis con HPLC mostró que 27.7% tenían talasemia S β , mientras que después de la evaluación por NGS, se encontró que el 29.4% realmente se ajustaba al diagnóstico. HPLC está lejos de ser un problema en la detección de HbS β -talasemia con tasas

significativas de falsos positivos y negativos. NGS es muy versátil, puede analizar a miles de genes simultáneamente. El genotipo de HbS, la mutación de β -talasemia, el haplotipo y diferentes polimorfismos modificadores se pueden determinar en una sola ejecución. Es muy útil para el diagnóstico personalizado que puede documentar los factores pronósticos, lo que permite un asesoramiento y seguimiento útil desde una temprana edad.

Erlich et al, (41) encontró que las asignaciones de genotipos fetales clínicos pronosticados fueron correctas en 9 de 10 bibliotecas de plasma con mutaciones puntuales maternas, con 1 resultado no concluyente. Para 2 plasmas adicionales con deleciones, el genotipo fetal más probable fue correcto. El haplotipo de β globina determinado a partir de SNP vinculados, cuando estaba disponible, se usó para inferir el genotipo fetal en el sitio de mutación. De lo cual, concluyen que NGS de captura de sonda demuestra el potencial de NITP para las β -hemoglobinopatías.

Husna et al, (57) analizó 173 muestras sanguíneas de portadores de talasemia con el propósito de analizar las características moleculares de estas deleciones comunes de α talasemia y su parámetro hematológico. Para determinar el genotipo utilizó la reacción en cadena de la polimerasa multiplex gap y se comparó sus parámetros hematológicos. El sitio límite de cada deleción se determinó analizando las secuencias de ADN. Se confirmó que 17 (9.8%) de los voluntarios tenían el rasgo α talasemia. De estos se identificaron cuatro genotipos: - α 3.7/ α α (58.8%), - α 4.2/ α α (5.9%), - α 3.7/- α 4.2 (5.9%) y -SEA/ α α (29.4%). Los puntos de corte 5 y 3 de la eliminación de SEA se ubicaron en nt165396 y nt184700 del cromosoma 16, respectivamente. Las regiones de punto de ruptura de la deleción de 3.7 kb tenían una longitud de 176 pb, mientras que para la deleción de 4.2 kb tenían una longitud de 321 pb. La comparación hematológica entre normales y aquellos con genotipo rasgo α talasemia indicó una diferencia significativa en el volumen corpuscular medio (MCV) y la hemoglobina corpuscular media (HCH). En cuanto a la identificación del número de genes defectuosos, el parámetro MCH fue más fiable.

Yamsri et al, (58) en un estudio retrospectivo con 1592 parejas en riesgo de tener fetos con Hb E-beta(0)-talasemia, de 2011 a 2019, para el diagnóstico de α talasemia realizaron pruebas gap-PCR o un ensayo de PCR multiplex para la detección simultáneas de mutaciones Hb E y alfa (0) talasemia. De 415 fetos afectados, los genes beta (0)-talasemia más comunes fueron los codones 41/42(-TTCT) (199/415;48%) y el codón 17 (AT) (115/415;27.7%). Las α talasemia se encontró en un 5.1% de fetos. Los fenotipos hematológicos de los padres indicaron que era imposible diferenciar un portador puro de talasemia beta de un heterocigoto de talasemia beta doble talasemia alfa a menos que se realizara un análisis de ADN. Por el contrario, un nivel reducido de Hb E en el portador de Hb E (<25%) es un marcador valioso para predecir la doble heterocigosis para Hb E/alfa-talasemia. Por lo cual concluyen que que existe una alta prevalencia de coherencia de α -talasemia en fetos con enfermedad Hb E-beta-talasemia.



Tomado de (59)

10. Discusión

La talasemia y los trastornos variantes de la hemoglobina ocurren ampliamente en todo el mundo, con una estimación de que el 7% de la población mundial es portadora, según un informe de la Organización Mundial de la Salud. Cerca de 3000.000 a 500.000 niños fueron diagnosticados con trastornos significativos de la hemoglobina y aproximadamente el 80% de ellos nacieron en países en desarrollo (60). Los individuos con mutaciones homocigotas y heterocigotas dobles se asocian con fenotipo de talasemia mayor o intermedia, alta morbilidad y mortalidad, mientras que los individuos con mutaciones heterocigotas son portadores sin presentar morbilidad intensa (61).

La talasemia α se caracteriza por la deficiencia o ausencia de la síntesis de la cadena de globina α debido a la delección de uno o más genes de globina α ubicados en el cromosoma 16. (39) la gravedad de la α talasemia se caracteriza por el número de delecciones de genes, donde las delecciones de un solo gen dan como resultados portadores silenciosos de α talasemia, dos delecciones de genes resultan en un rasgo de α talasemia menor, tres delecciones de genes resultan en hemoglobina H (HbH) y las delecciones de cuatro genes dan como resultado la hemoglobina de Bart, que generalmente resulta en hidropesía fetal grave con una tasa de mortalidad muy alta (62). La β talasemia es causada por la reducción o ausencia de la síntesis de la cadena de β globulina debido a mutaciones en el gen de la β globulina en el cromosoma 11 (63). La β talasemia se clasifica como rasgo de β talasemia mayor según los defectos genéticos y la gravedad de la disminución en la producción de cadenas de globina β (64).

Es importante también recordar que hay una forma de talasemia beta intermedia dentro del grupo de talasemias beta la cual causa anemia de moderada a grave, esta es la segunda forma más grave después de la talasemia beta mayor. Su causa también es genética, los síntomas incluyen anemia, cansancio, debilidad, piel pálida, crecimiento lento o retraso en el crecimiento, agrandamiento del bazo y huesos débiles. Entre las opciones de tratamiento de esta forma están las transfusiones de sangre, medicamentos, suplementos, cirugías y trasplante de médula ósea (65).

Los enfoques de diagnóstico varían según la población objetivo y el objetivo de la prueba. Los métodos actuales que se basan en los patrones de Hb, se utilizan para la detección de primera línea, mientras que las pruebas moleculares son necesarias para la conformación de los resultados y para el diagnóstico genético prenatal y preimplantacional (66).

El análisis de hemoglobina es un método importante para detectar la talasemia e inferir el tipo de talasemia siendo HPLC, CZE y CIEF los métodos más utilizados. Sin embargo, debido a que el análisis de hemoglobina lleva mucho tiempo y tiene requisitos más altos para el equipo y la tecnología de detección en comparación con los necesarios para el CBC se usa a menudo para evaluar a los pacientes con una fórmula confiable que puede diferenciar entre portadores de talasemia y no portadores, incluidos recuentos normales o recuentos sospechosos de pertenecer a mujeres con deficiencia de hierro.

De las fórmulas más reconocidas está la de Shine et al, (48) que consta de tres partes: la electroforesis de hemoglobina, cálculo del producto del cuadrado del volumen corpuscular medio (M.C.V) multiplicado por la hemoglobina corpuscular media (M.C.H) medida en unidades de cien y la determinación de A2 en todas las muestras AA con $(M.C.V)^2 \times M.C.H. < 1530$ y en aquellos con variantes consistentes con talasemia y el método matemático basado en la máquina de vectores de soporte (SVM) de Roth et al (49), que tienen una sensibilidad $>98\%$ y un valor predictivo negativo $>99.77\%$.

Sin embargo, algunos de los mejores índices discriminativos usan parámetros en las fórmulas que solo se miden en contadores modernos y no siempre están disponibles. Por ello el desarrollo de un índice con buena precisión diagnóstica basado únicamente en parámetros derivados del hemograma obtenido mediante contadores simples sería útil en la rutina clínica, y también siendo de utilidad el índice de Matos & Carvalho cuyo desempeño es excelente, con la ventaja de depender únicamente de la concentración media de hemoglobina corpuscular y del recuento de glóbulos rojos obtenidos de contadores automáticos simples de gran valor en países subdesarrollados y en vías de desarrollo (50).

Las técnicas de separación de hemoglobina son los métodos de laboratorio más utilizados en los programas de pruebas de detección y confirmación de recién nacidos para las hemoglobinopatías. Sin embargo, tales pruebas basadas en proteínas no pueden detectar con precisión varias hemoglobinopatías en recién nacidos, especialmente cuando están involucradas mutaciones de β -talasemia. En este caso las pruebas genéticas son de gran utilidad para un diagnóstico correcto y oportuno en el contexto de la detección de hemoglobinopatías en recién nacidos (67) .

La identificación preliminar de los portadores de talasemia se lleva a cabo mediante un programa de detección con análisis de hemograma completo (FBC), con prueba de referencia para analizar los índices de glóbulos rojos, seguido de un examen morfológico de frotis de sangre periférica y la confirmación posterior mediante cromatografía líquida de alta resolución (HLPC), electroforesis de hemoglobina (HB) y pruebas de genética molecular (51,54,55,57).

Cada una de las pruebas de confirmación mencionadas tiene su limitación y requiere una combinación de algunas pruebas para el diagnóstico diferencial de las talasemias α y β . Por ejemplo, la HPLC no es suficiente para detectar discretamente variantes, ya que no es lo suficientemente sensible y específica para la detección de α talasemia, especialmente en presencia de hemoglobina Constant Spring (α talasemia sin delección) (70).

La electroforesis de Hb tampoco puede usarse como la única técnica para distinguir la talasemia α y β . La electroforesis de hemoglobina con rasgo de β -talasemia generalmente muestra hemoglobina adulta (HbA) reducida o ausente, niveles elevados de hemoglobina A2 (HbA2) y hemoglobina fetal aumentada (HbF) (70). Sin embargo, una concentración normal de HbA2 no descarta el rasgo de β -talasemia, especialmente si existe una deficiencia de hierro o δ talasemia concurrentes, que pueden reducir los niveles de HbA2 al rango normal. Por lo tanto, se requieren una combinación de métodos para confirmar el diagnóstico.

Con la llegada de los analizadores de conteo sanguíneo completo (FBC) de nueva generación, se están explorando parámetros avanzados como los datos de población celular (CPD), que miden las características de las células en función de múltiples dispersiones de luz, para comprender mejor las utilidades de diagnóstico de estos parámetros. Los parámetros CPD brindan información sobre el volumen (V), la conductividad (C) y los ángulos de dispersión de la luz (ALL, LALS, LMALS, UMALS y MALS) para los reticulocitos que son importantes en la evaluación de la eficiencia de producción de glóbulos rojos a nivel de la médula ósea y la detección de trastornos de la hemoglobina como la talasemia (71).

El diagnóstico molecular o basado en pruebas genéticas para la talasemia se aplica principalmente para la confirmación de los resultados de la detección, para la aclaración de casos complicados y para el diagnóstico prenatal. Se recomienda que todos los resultados positivos de la detección se confirmen mediante análisis de ADN y que los resultados se interpreten en conjunto, incluida la evaluación de hematología y antecedentes familiares (31,72). Se han descrito más de 650 mutaciones de talasemia incluidas en la base de datos IthaGenes, de las cuales alrededor de 390 corresponden a β talasemia y el resto a α talasemia (73). La información sobre el origen étnico del paciente facilita la selección de las mejores estrategias diagnósticas. La determinación del genotipo es esencial para predecir la gravedad clínica (40) .

Hoy en día muchos laboratorios clínicos y de investigación utilizan ampliamente las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) para identificar enfermedades. La aplicación de NGS en la talasemia es limitada y ha surgido recientemente debido a las demandas actuales en la búsqueda de herramientas alternativas de detección de ADN que sean más eficientes, versátiles y rentables. Hasta ahora ha sido una tecnología innovadora que ofrece enormes mejoras como herramienta de diagnóstico para la talasemia en términos de mayor rendimiento, precisión y adaptabilidad. No se puede pasar por alto la superioridad de la NGS para detectar variantes raras, resolver problemas hematológicos complejos y proporcionar alternativas no invasivas al diagnóstico neonatal (59).

En la actualidad se disponen de varios métodos para el análisis de Hb y el diagnóstico molecular de la talasemia, los métodos iniciales utilizados para el análisis de la hemoglobina como la electroforesis en acetato de celulosa (CAE) y el enfoque isoeléctrico (IEF) han sido reemplazados gradualmente por sistemas automatizados, como HLPC y la electroforesis capilar (CE). Además de los métodos de primera línea se recomienda que los laboratorios estén equipados con un segundo método para confirmar los resultados de la identificación de variantes de Hb (72). La elección del método molecular debe hacerse en función del espectro de mutación de la población en particular. Los métodos multiplex relativamente menos costosos generalmente se eligen la primera línea de detección de mutaciones (por ejemplo, sistemas de mutación refractaria de amplificación (ARMS), hibridación de transferencia de puntos inversos, PCR de brecha, seguido de investigaciones más completas, que incluye la secuenciación de Sanger para mutaciones puntuales y la sonda de ligadura múltiple (MLPA) para deleciones. Estos dos últimos métodos son capaces de revelar mutaciones desconocidas (72). La identificación del genotipo es fundamental en las parejas antes del diagnóstico genético prenatal o preimplantacional (76).

No se requiere un análisis molecular para confirmar el diagnóstico de portador β , pero es necesario confirmar el estado de portador de α -talasemia. El diagnóstico molecular es fundamental para predecir casos graves dependientes de transfusiones y no dependientes de transfusiones de intermedios a leves. El análisis de ADN en vellosidades coriónicas es el enfoque para el diagnóstico prenatal y los métodos son los mismos que se utilizan para la detección de mutaciones, de acuerdo con las instalaciones y la experiencia del laboratorio (68).

De igual manera, la diferenciación entre talasemia mayor y talasemia intermedia en la presentación no se caracteriza de manera uniforme, por lo que es necesario desarrollar un criterio absoluto (77). El diagnóstico prenatal preciso y oportuno de la talasemia es la piedra angular del éxito del control de la talasemia (78).

La falta de antecedentes familiares con enfermedades genéticas se ha identificado como una barrera clave que afecta la aceptación de las pruebas de detección y las respuestas al riesgo genético (79). Se han desarrollado algunos inmunotest recubiertos con mAb que se pueden almacenar a temperatura ambiente durante al menos 20 semanas que tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 82% para la detección de portadores de (SEA) α -talasemia-1 (80).

La combinación de estas pruebas múltiples es bastante costosa y requieren experiencia para realizar diagnósticos precisos y confiables, ya que existen superposiciones sustanciales entre estos trastornos (70). Se han sugerido numerosas combinaciones de índices de glóbulos rojos para distinguir diferentes tipos de talasemia, ya que esto permitiría la optimización de costos, ya que solo los pacientes que requieren más investigaciones se someten a pruebas costosas de electroforesis de hemoglobina y genéticas molecular.

La detección de talasemia menor es más rentable que el tratamiento de pacientes con talasemia mayor y el beneficio neto generado por la detección en lugar del tratamiento puede utilizarse para expandir el programa de detección. Se deben prevenir nuevos casos de la enfermedad asignando nuevos fondos y ampliando los programas de detección y cribado. Dado que los matrimonios de parejas con talasemia menor en generaciones posteriores pueden disminuir la incidencia de talasemia menor, esta política puede excluirse del programa de detección en ciudades donde las parejas se someten a todas las pruebas complementarias (23). La detección es más rentable que el tratamiento, pero el costo de las pruebas complementarias para las parejas es muy alto, lo que puede hacer que el procedimiento de detección falle y aumente la incidencia de talasemia (23).

11. Conclusiones

La implementación de un algoritmo, como el tipo $\alpha\beta$ en el laboratorio es de especial importancia para abaratar los costos, debido a que permite seleccionar adecuadamente un alto porcentaje de personas sospechosas que necesiten de pruebas posteriores como la electroforesis o pruebas genéticas que son altamente costosas y no siempre están disponibles en todos los sistemas de salud, especialmente en países subdesarrollados. Este algoritmo esta especialmente indicado en países con alta prevalencia de trastornos relacionados con la talasemia por ser sencillo y no requerir de análisis o experiencia sofisticados.

Debido a que las talasemias son de herencia autosómica dominante es fundamental el consejo genético, sobre todo en las personas que tienen un alto riesgo de padecerlas ya sea que vivan en zonas de elevada prevalencia o el grado de endogamia sea alto. El diagnóstico es fundamental, incluso de las formas asintomáticas o con muy poca expresividad clínica, para poder hacer un adecuado screening relacionado con genética y prevenir el desarrollo de una forma mayor en la descendencia.

Aunque las pruebas genéticas son utilizadas con relativa frecuencia, varios métodos de detección convencionales como un hemograma completo, un frotis de sangre periférica importante para la morfología, una prueba de fragilidad osmótica y un análisis de hemoglobina siguen siendo el primer paso y son esenciales para la identificación clínica de los pacientes con talasemia. La detección temprana, oportuna y precisa es importante para un cuidado adecuado y un tratamiento oportuno que mejore la calidad de vida del paciente con talasemia.

Bibliografía

1. Masala GL, Golosio B, Cutzu R, Pola R. A two-layered classifier based on the radial basis function for the screening of thalassaemia. *Comput Biol Med.* noviembre de 2013;43(11):1724-31.
2. Mustafa I, Firdous N, Shebl FM, Shi Z, Saeed M, Zahir Z, et al. Genetic epidemiology of beta-thalassemia in the Maldives: 23 years of a beta-thalassemia screening program. *Gene.* mayo de 2020;741:144544.
3. Angastiniotis M, Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 30 de junio de 1998;850:251-69.
4. Lai K, Huang G, Su L, He Y. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys. *Sci Rep.* 19 de abril de 2017;7(1):920.
5. Vlachou M, Kamperidis V, Giannakoulas G, Karamitsos T, Vlachaki E, Karvounis H. Biochemical and imaging markers in patients with thalassaemia. *Hellenic J Cardiol.* enero de 2021;62(1):4-12.
6. Chapin J, Cohen AR, Neufeld EJ, Vichinsky E, Giardina PJ, Boudreaux J, et al. An update on the US adult thalassaemia population: a report from the CDC thalassaemia treatment centres. *Br J Haematol.* 2022;196(2):380-9.
7. Rund D, Rachmilewitz E. β -Thalassemia. *N Engl J Med.* 15 de septiembre de 2005;353(11):1135-46.
8. Barrett AN, Saminathan R, Choolani M. Thalassaemia screening and confirmation of carriers in parents. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* febrero de 2017;39:27-40.
9. Leung TN, Lau TK, Chung TK. Thalassaemia screening in pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* abril de 2005;17(2):129-34.
10. Sirichotiyakul S, Maneerat J, Sa-nguansermsri T, Dhananjayanonda P, Tongsong T. Sensitivity and specificity of mean corpuscular volume testing for screening for alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia traits. *J Obstet Gynaecol Res.* junio de 2005;31(3):198-201.
11. Tayapiwatana C, Kuntaruk S, Tatu T, Chiampanichayakul S, Munkongdee T, Winichagoon P, et al. Simple method for screening of α -thalassaemia 1 carriers. *Int J Hematol.* junio de 2009;89(5):559-67.
12. Lund PamelaR, Barnes RD. AUTOMATED CLASSIFICATION OF ANAEMIA USING IMAGE ANALYSIS. *The Lancet.* 2 de septiembre de 1972;300(7775):463-4.
13. Engle RL, Flehinger BJ, Allen S, Friedman R, Lipkin M, Davis BJ, et al. HEME: a computer aid to diagnosis of hematologic disease. *Bull N Y Acad Med.* junio de 1976;52(5):584-600.

14. Lanzola G, Stefanelli M, Barosi G, Magnani L. NEOANEMIA: A knowledge-based system emulating diagnostic reasoning. *Comput Biomed Res.* 1 de diciembre de 1990;23(6):560-82.
15. Amendolia SR, Brunetti A, Carta P, Cossu G, Ganadu ML, Golosio B, et al. A real-time classification system of thalassaemic pathologies based on artificial neural networks. *Med Decis Mak Int J Soc Med Decis Mak.* febrero de 2002;22(1):18-26.
16. Advances in screening of thalassaemia - ScienceDirect [Internet]. [citado 27 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898122012529>
17. Kattamis A, Kwiatkowski JL, Aydinok Y. Thalassaemia. *The Lancet.* 18 de junio de 2022;399(10343):2310-24.
18. Riquier M. The ethics of genetic screening for beta thalassaemia in Vietnam. *Dev World Bioeth.* marzo de 2022;22(1):44-52.
19. Moafi A, Vallian R, Vallian S, Rahgozar S, Torfenajad M, Moafi H. The pros and cons of the fourth revision of thalassaemia screening programme in Iran. *J Med Screen.* marzo de 2017;24(1):1-5.
20. Obeidi N, Mankhian AR, Hatami G, Emami H. Antibody Screening in Patients With Thalassaemia Major. *Lab Med.* octubre de 2011;42(10):618-21.
21. Grech L, Borg K, Borg J. Novel therapies in β -thalassaemia. *Br J Clin Pharmacol.* 2022;88(6):2509-24.
22. Cousens NE, Gaff CL, Metcalfe SA, Delatycki MB. Carrier screening for Beta-thalassaemia: a review of international practice. *Eur J Hum Genet.* octubre de 2010;18(10):1077-83.
23. Esmailzadeh F, Ahmadi B, Vahedi S, Barzegari S, Rajabi A. Major Thalassaemia, Screening or Treatment: An Economic Evaluation Study in Iran. *Int J Health Policy Manag.* 3 de febrero de 2021;1.
24. Hartwell S, Srisawang B, Kongtawelert P, Christian G, Grudpan K. Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassaemia. *Talanta.* 15 de marzo de 2005;65(5):1149-61.
25. Barriers to Premarital Thalassaemia Screening in Asia-Web of Science Core Collection [Internet]. [citado 27 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000683039400013>
26. Kattamis A, Forni GL, Aydinok Y, Viprakasit V. Changing patterns in the epidemiology of β -thalassaemia. *Eur J Haematol.* 2020;105(6):692-703.
27. Alswaidi FM, O'Brien SJ. Premarital screening programmes for haemoglobinopathies, HIV and hepatitis viruses: review and factors affecting their success. *J Med Screen.* 1 de marzo de 2009;16(1):22-8.

28. Goonasekera HW, Paththinige CS, Dissanayake VHW. Population Screening for Hemoglobinopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 31 de agosto de 2018;19:355-80.
29. Alkindi S, Al Zadjali S, Al Madhani A, Daar S, Al Haddabi H, Al Abri Q, et al. Forecasting hemoglobinopathy burden through neonatal screening in Omani neonates. *Hemoglobin.* enero de 2010;34(2):135-44.
30. Tang HS, Zhou JY, Xie XM, Li DZ. Newborn screening for α -thalassaemia by a capillary electrophoresis method. *J Med Screen.* septiembre de 2012;19(3):159; author reply 159-160.
31. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol.* abril de 2010;149(1):35-49.
32. Daniel Y, Henthorn J. Reliability of the current newborn screening action value for beta thalassaemia disease detection in England: A prospective study. *J Med Screen.* junio de 2019;26(2):67-70.
33. Khandros E, Kwiatkowski JL. Beta Thalassaemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* junio de 2019;33(3):339-53.
34. Viprakasit V, Ekwattanakit S. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassaemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* abril de 2018;32(2):193-211.
35. Chiappe G. Anemias hemolíticas. Revisión de algoritmos diagnósticos de anemias hemolíticas no autoinmunes en nuestro país. *HEMATOLOGÍA.* 2015;19(1):20-4.
36. Zou J, Huang S, Xi H, Huang C, Zou L, Qiu L, et al. Application of an optimized interpretation model in capillary hemoglobin electrophoresis for newborn thalassaemia screening. *Int J Lab Hematol.* febrero de 2022;44(1):223-8.
37. Mettananda S, Higgs DR. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassaemia. *Hematol Clin.* 1 de abril de 2018;32(2):177-91.
38. Farashi S, Harteveld CL. Molecular basis of α -thalassaemia. *Blood Cells Mol Dis.* 1 de mayo de 2018;70:43-53.
39. Higgs DR. The molecular basis of α -thalassaemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 de enero de 2013;3(1):a011718.
40. Asadov C, Abdulalimov E, Mammadova T, Gafarova S, Guliyeva Y, Aliyeva G. Genotype – Phenotype Correlations of β -Thalassaemia Mutations in Azerbaijani population. *Turk J Hematol [Internet].* 2017 [citado 8 de diciembre de 2022]; Disponible en: http://www.journalagent.com/z4/download_fulltext.asp?pdire=tjh&plng=eng&un=TJH-20092
41. Erlich HA, López-Peña C, Carlberg KT, Shih S, Bali G, Yamaguchi KD, et al. Noninvasive Prenatal Test for β -Thalassaemia and Sickle Cell Disease Using

- Probe Capture Enrichment and Next-Generation Sequencing of DNA in Maternal Plasma. *J Appl Lab Med.* 2 de marzo de 2022;7(2):515-31.
42. Cao A, Cristina Rosatelli M, Galanello R. Control of β -thalassaemia by Carrier Screening, Genetic Counselling and Prenatal Diagnosis: The Sardinian Experience. En: *Ciba Foundation Symposium 197 - Variation in the Human Genome* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; [citado 4 de diciembre de 2022]. p. 137-55. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470514887.ch8>
 43. Lee JS, Cho SI, Park SS, Seong MW. Molecular basis and diagnosis of thalassaemia. *Blood Res.* 30 de abril de 2021;56(S1):39-43.
 44. Ropero P, González FA, Hernández A, Sánchez H, Cela E, Villegas A. Diagnóstico prenatal de hemoglobinopatías y talasemias. *Med Clínica.* 24 de enero de 2009;132(2):53-6.
 45. Jia W, Chen P, Chen W, Li Y. Raman characterizations of red blood cells with β -thalassaemia using laser tweezers Raman spectroscopy. *Medicine (Baltimore).* septiembre de 2018;97(39):e12611.
 46. Ambayya A, Sahibon S, Yang TW, Zhang QY, Hassan R, Sathar J. A Novel Algorithm Using Cell Population Data (VCS Parameters) as a Screening Discriminant between Alpha and Beta Thalassaemia Traits. *Diagnostics.* noviembre de 2021;11(11):2163.
 47. Azma Rz, Hafiza A, Azlin I, Norunaluwar J, Maizatul-Husna Ma, Skk J, et al. A Comparative Study of Red Blood Cell Parameters of Alpha and Beta Thalassaemia Patients Diagnosed in University Hospital in a Cheras, Malaysia. *ARC J Hematol.* 2018;3(1):23-7.
 48. Shine I, Lal S. A STRATEGY TO DETECT β -THALASSAEMIA MINOR. *The Lancet.* 26 de marzo de 1977;309(8013):692-4.
 49. Roth IL, Lachover B, Koren G, Levin C, Zalman L, Koren A. Detection of β -thalassaemia carriers by red cell parameters obtained from automatic counters using mathematical formulas. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2018;10(1).
 50. Matos JF, Dusse LMS, Borges KBG, de Castro RLV, Coura-Vital W, Carvalho MDG. A new index to discriminate between iron deficiency anemia and thalassaemia trait. *Rev Bras Hematol E Hemoter.* 2016;38(3):214-9.
 51. Chelly Dagdia Z, Avdeyev P, Bayzid MS. Biological computation and computational biology: survey, challenges, and discussion. *Artif Intell Rev.* 2021;54(6):4169-235.
 52. Gao J, Liu W. Advances in screening of thalassaemia. *Clin Chim Acta.* 1 de septiembre de 2022;534:176-84.
 53. Zhang H, Li C, Li J, Hou S, Chen D, Yan H, et al. Next-generation sequencing improves molecular epidemiological characterization of thalassaemia in Chenzhou Region, P.R. China. *J Clin Lab Anal.* mayo de 2019;33(4):e22845.

54. Zhao J, Li J, Lai Q, Yu Y. Combined use of gap-PCR and next-generation sequencing improves thalassaemia carrier screening among premarital adults in China. *J Clin Pathol.* agosto de 2020;73(8):488-92.
55. Tan M, Bai Y, Zhang X, Sun J, Huang C, Tian R, et al. Early genetic screening uncovered a high prevalence of thalassaemia among 18 309 neonates in Guizhou, China. *Clin Genet.* mayo de 2021;99(5):704-12.
56. Adekile A, Jeradi NA, Fernandez M, Al-Khaldi R. The Diagnosis of HbS Genotypes and Identification of β -Thalassaemia Mutations in Patients with Hbs β -Thalassaemia Using Next Generation Sequencing. *Blood.* 5 de noviembre de 2020;136:38.
57. Husna N, Handayani NSN. Molecular and Haematological Characteristics of alpha-Thalassaemia Deletions in Yogyakarta Special Region, Indonesia. *Rep Biochem Mol Biol.* 2021;10(3):346-53.
58. Yamsri S, Prommetta S, Srivorakun H, Taweenan W, Sanchaisuriya K, Chaibunruang A, et al. alpha(0)-thalassaemia in affected fetuses with hemoglobin E-beta(0)-thalassaemia disease in a high-risk population in Thailand. *Am J Transl Res.* 2022;14(2):1315-23.
59. Suhaimi SA, Zulkipli IN, Ghani H, Abdul-Hamid MRW. Applications of next generation sequencing in the screening and diagnosis of thalassaemia: A mini-review. *Front Pediatr.* 29 de septiembre de 2022;10:1015769.
60. WHO/TIF Meeting on the Management of Haemoglobin Disorders (2007: Nicosia C, Organization WH, Federation TI. Management of haemoglobin disorders: report of a joint WHO-TIF meeting, Nicosia, Cyprus, 16-18 November 2007 [Internet]. World Health Organization; 2008 [citado 7 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43969>
61. Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 de septiembre de 2012;2(9):a011692.
62. Rosnah B, Rosline H, Zaidah AW, Noor Haslina MN, Marini R, Shafini MY, et al. Detection of common deletional alpha-thalassaemia spectrum by molecular technique in kelantan, northeastern malaysia. *ISRN Hematol.* 2012;2012:462969.
63. Galanello R, Origa R. Beta-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis.* 21 de mayo de 2010;5:11.
64. George E, Ann TJAM. Genotype-phenotype diversity of beta-thalassaemia in Malaysia: treatment options and emerging therapies. *Med J Malaysia.* diciembre de 2010;65(4):256-60.
65. Thuret I, Pondarré C. Talasemias en el niño. *EMC - Pediatría.* 1 de marzo de 2014;49(1):1-8.

66. Aliyeva G, Asadov C, Mammadova T, Gafarova S, Abdulalimov E. Thalassaemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. *Clin Chem Lab Med.* febrero de 2019;57(2):165-74.
67. Shook LM, Haygood D, Quinn CT. Clinical Utility of Confirmatory Genetic Testing to Differentiate Sickle Cell Trait from Sickle- β -Thalassaemia by Newborn Screening. *Int J Neonatal Screen.* 31 de enero de 2020;6(1):7.
68. Brancaloni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassaemia. *Int J Lab Hematol.* 2016;38:32-40.
69. Shafei N, Hakhamaneshi MS, Houshmand M, Gerayeshnejad S, Fathi F, Sharifzadeh S. Diagnostic Value of Non-Invasive Prenatal Screening of beta-thalassaemia by Cell Free Fetal DNA and Fetal NRBC. *Curr Mol Med.* 2019;19(2):105-11.
70. Sabath DE. Molecular Diagnosis of Thalassaemias and Hemoglobinopathies: An ACLPS Critical Review. *Am J Clin Pathol.* 1 de julio de 2017;148(1):6-15.
71. Tan BT, Nava AJ, George TI. Evaluation of the Beckman Coulter UniCel DxH 800, Beckman Coulter LH 780, and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire hematology analyzers on adult specimens in a tertiary care hospital. *Am J Clin Pathol.* junio de 2011;135(6):939-51.
72. Traeger-Synodinos J, Harteveld CL, Old JM, Petrou M, Galanello R, Giordano P, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet.* abril de 2015;23(4):426-37.
73. Kountouris P, Lederer CW, Fanis P, Feleki X, Old J, Kleanthous M. IthaGenes: An Interactive Database for Haemoglobin Variations and Epidemiology. de Brevern AG, editor. *PLoS ONE.* 24 de julio de 2014;9(7):e103020.
74. Old JM, Fitches A, Heath C, Thein SL, Weatherall DJ, Warren R, et al. First-trimester fetal diagnosis for haemoglobinopathies: report on 200 cases. *Lancet Lond Engl.* 4 de octubre de 1986;2(8510):763-7.
75. Giambona A, Damiani G, Leto F, Yakil C, Passarello C, Cigna V, et al. Earlier Antenatal Diagnosis of Hemoglobinopathies By Coelocentesis. *Blood.* 3 de diciembre de 2015;126(23):2133.
76. Kuliev A, Pakhalchuk T, Verlinsky O, Rechitsky S. Preimplantation genetic diagnosis for hemoglobinopathies. *Hemoglobin.* 2011;35(5-6):547-55.
77. Ansari S, Rashid N, Hanifa A, Siddiqui S, Kaleem B, Naz A, et al. Laboratory diagnosis for thalassaemia intermedia: Are we there yet? *J Clin Lab Anal.* 2019;33(1):e22647.
78. Ghosh S, Chakrabarti S, Bhattacharyya M. Prenatal Screening and Diagnosis of ss-Thalassaemia in India: Is ARMS-PCR Enough? *Indian J Hematol Blood Transfus.* julio de 2021;37(3):448-52.

79. Boardman FK, Hale R. "I didn't take it too seriously because I'd just never heard of it": Experiential knowledge and genetic screening for thalassaemia in the UK. *J Genet Couns.* 2019;28(1):141-54.
80. Pata S, Pongpaiboon M, Laopajon W, Munkongdee T, Paiboonsukwong K, Pornpresert S, et al. Immunostick Test for Detecting ζ -Globin Chains and Screening of the Southeast Asian α -Thalassemia 1 Deletion. *Biol Proced Online.* diciembre de 2019;21(1):15.

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

MARÍA JOSÉ LOAIZA AGUILAR portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0704850809**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“SCREENING Y DIAGNOSTICO MOLECULAR DE TALASMEIA”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **24 de Febrero de 2023**

F:



María José Loaiza Aguilar
C.I. **0704850809**