

Estandarización de PCR punto final para identificación de haplotipos del gen β -globina asociados a Anemia Falciforme en pacientes del Programa de Tamizaje Neonatal, Panamá.

Standardization of the endpoint PCR for identification of β -globin gene haplotypes associated with sickle cell anemia in Neonatal Screening patients, Panama.

Lia Zapata¹, Yissell Terrero¹, Pitágoras Ureña², Melissa Delgado³ ORCID: 0009-0006-0230-9417

¹ Licenciatura en Tecnología Médica, Escuela de Tecnología Médica, Universidad de Panamá

² Departamento de hematología especial, Centro hospitalario de alta complejidad y atención especializada.

³ Laboratorio de Genética, sección de biología molecular. Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel.

Autor de correspondencia: Melissa Delgado, correo electrónico: mdelgado.genresearch@outlook.com

DOI: <https://doi.org/10.66253/conalac.v9.n2.a05>

Recibido: 15 de mayo de 2025

Aceptado: 29 de julio de 2026

Publicado: 31 de agosto de 2026

Abstract

Sickle cell anemia is an inherited hemoglobinopathy characterized by the presence of hemoglobin S (HbS), which is estimated to affect approximately 0.04% of the Panamanian population. Its clinical severity is modulated by the haplotypes of the β -globin gene—Benin, Bantu, Senegal, Cameroon, and Arab-Hindu—whose characterization is not possible using high-performance liquid chromatography (HPLC) as employed in the Neonatal Screening Program at Dr. José Renán Esquivel Children's Hospital. The objective of this study was to standardize the endpoint PCR technique for the identification of these haplotypes in 22 patients with confirmed HbSS, corresponding to the period January 2020–August 2025. Genomic DNA was extracted using the PureLink kit (Invitrogen), and six specific regions of the β -globin gene were amplified. The products were digested with the enzymes Ddel, HindIII, HincII, and HinfI, and visualized on 2% agarose gels. Three haplotypes were identified: Senegal (45.5%), Bantu (40.9%), and Benin (13.6%); the Cameroon and Arab-Hindu haplotypes were not detected. The standardized protocol proved to be reproducible and reliable, constituting a complementary molecular tool for the subclassification of patients with HbSS.

Keywords: sickle cell disease, β -globin haplotypes, endpoint PCR, neonatal screening.

Resumen

La anemia falciforme es una hemoglobinopatía hereditaria caracterizada por la presencia de hemoglobina S (HbS), que se estima afecta aproximadamente al 0.04% de la población panameña. Su severidad clínica está modulada por los haplotipos del gen β -globina_Benin, Bantú, Senegal, Camerún y Árabe-hindú, cuya caracterización no es posible mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizada en el Programa de Tamizaje Neonatal del Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel. El objetivo de este estudio fue estandarizar la técnica de PCR punto final para la identificación de dichos haplotipos en 22 pacientes con HbSS confirmado, correspondientes al periodo enero 2020-agosto 2025. Se extrajo ADN genómico utilizando el kit PureLink (Invitrogen) y se amplificaron seis regiones específicas del gen β -globina. Los productos fueron digeridos con las enzimas Ddel, HindIII, HincII, HinfI, y visualizados en geles de agarosa al 2%. Se identificaron tres haplotipos: Senegal (45.5%), Bantú (40.9%) y Benín (13.6%); los haplotipos Camerún y árabe-hindú no fueron detectados. El protocolo estandarizado demostró ser reproducible y confiable, constituyendo una herramienta molecular complementaria para la subclasificación de pacientes con HbSS.

Palabras clave: Anemia Falciforme, haplotipos, PCR punto final, tamizaje neonatal.



Introducción

La anemia falciforme (AF) es una hemoglobinopatía hereditaria caracterizada por la presencia de hemoglobina S (HbS), originada por la sustitución de adenina por timina en el sexto codón del gen de la B-globina localizado en el cromosoma 11 (11p 15.5), lo que provoca el reemplazo del ácido glutámico por valina¹.

Bajas condiciones de desoxigenación, la HbS polimeriza y deforma los eritrocitos en forma de hoz, generando episodios recurrentes de hemólisis y oclusión vascular asociados a complicaciones clínicas significativas².

Se estima que más de 300,000 niños nacen anualmente con alguna forma de la enfermedad, siendo la AF la hemoglobinopatía hereditaria más frecuente a nivel mundial³. En Panamá, aproximadamente el 15% de la población es portadora del alelo HbS y el 0.04% desarrolla la enfermedad, con cerca de 620 pacientes en seguimiento activo y un promedio de 30 nuevos casos diagnosticados cada año⁴.

Aunque todos los individuos afectados comparten la misma mutación puntual, la variabilidad clínica observada se explica, en gran medida, por los haplotipos del clúster β -globina, definidos como combinaciones de sitios polimórficos heredados junto con la mutación β S.

Se han descrito cinco haplotipos principales: Senegal, Benín, Bantú, Camerún y árabe-hindú, asociados a distintos niveles de hemoglobina fetal (HbF) y, por consiguiente, a diferentes grados de severidad clínica. Los haplotipos Senegal y árabe-hindú se asocian a una mayor producción de cadenas G γ y, en consecuencia, a niveles más elevados de HbF (superiores al 20%), lo que inhibe la polimerización de la HbS y se traduce en una presentación clínica más leve, con menor frecuencia de episodios drepanocíticos, síndrome torácico agudo e infartos esplénicos u óseos.

Por el contrario, el haplotipo Bantú presenta los niveles más bajos de HbF (menores al 5%), asociándose a la forma más severa de la enfermedad y a la afectación de órganos vitales antes de los 40 años de edad. Conocer el haplotipo específico de cada paciente resulta, por tanto, fundamental para anticipar su curso clínico y orientar su seguimiento individualizado^{5,6}. A pesar de su relevancia, el programa de Tamizaje Neonatal del Hospital del Niño - Dr. José Renán Esquivel emplea cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para confirmar el genotipo HbSS, metodología que no permite la caracterización haplotípica. Asimismo, aunque un estudio previo realizado en Panamá logró identificar haplotipos de HbS, su metodología no fue descrita con suficiente detalle para garantizar su reproducibilidad.

Ante esta limitación, el presente estudio tuvo como objetivo estandarizar un protocolo reproducible de PCR punto final para la identificación de haplotipos del gen B-globina en pacientes del Programa de Tamizaje Neonatal correspondientes al periodo enero 2020 a agosto 2025. Su implementación aportaría una herramienta complementaria para la subclasificación molecular de pacientes con HbSS y serviría de base para futuras investigaciones sobre la distribución haplotípica en la población panameña.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional descriptivo prospectivo tipo series de casos en pacientes del programa de Tamizaje Neonatal del Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel que cumplieron con los criterios de inclusión.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética en Investigación del Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel (CBIHN-M-202507-0005; 5 de agosto de 2025).

Población y muestra

Se incluyeron pacientes con diagnóstico confirmado de hemoglobina SS (HbFS/HbSS) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), provenientes del Programa de Tamizaje Neonatal del Hospital del Niño Dr. José Renan Esquivel, correspondientes al periodo enero 2020-agosto 2025. Se excluyeron pacientes heterocigotos para HbS, portadores de otras hemoglobinopatías y aquellos cuyos tutores no firmaron el consentimiento informado.

El universo estuvo conformado por 23 pacientes; sin embargo, la muestra final analizada fue de 22 individuos debido al agotamiento de una de las muestras durante la fase de estandarización.

Extracción de ADN y amplificación por PCR

El ADN genómico se extrajo a partir de sangre total con EDTA utilizando el kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

La amplificación se realizó mediante PCR punto final utilizando seis pares de oligonucleótidos específicos para el gen β -globina (FalciBETA, Falci5 ϵ , FalciYG, Falci3Will y Falci3J3). Se evaluaron mezclas de reacción Qiagen e Invitrogen Dream Taq 2X, seleccionándose esta última por presentar mayor reproducibilidad. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador CFX96 (Bio-Rad) bajo condiciones optimizadas de desnaturalización, alineamiento y extensión.

Digestión enzimática y análisis de haplotipos

Los productos amplificados fueron digeridos con las enzimas de restricción DdeI, HindIII, HincII y HinfI (New England Biolabs) para la obtención de patrones de restricción específicos. Las digestiones se realizaron a 37°C bajo las condiciones recomendadas por el fabricante.

Los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% tenidos con SYBR Safe, utilizando un marcador molecular de 100 pb como referencia de tamaño y agua libre de nucleasas como control negativo en cada ensayo.

Los haplotipos se asignaron según el patrón combinado de presencia (+) o ausencia (-) de sitios de restricción en los loci 5' ϵ -HincII, Gy-HindIII, Ay-HindIII, 3' Ψ β -HincII y 3' β -HinfI. La interpretación se realizó siguiendo la nomenclatura descrita por Sutton et al. (1989)⁷ y Rusanova et al. (2011)⁵. El genotipo HbSS se confirmó previamente mediante digestión del amplicon FalciBETA.

Resultados

Se logró la estandarización del protocolo de extracción de ADN y de la técnica PCR punto final para la identificación de cinco sitios de restricción del grupo de genes de la β -globina. El protocolo de extracción con PureLink (Invitrogen) generó ADN íntegro y funcional en las 22 muestras procesadas, evidenciado por la amplificación exitosa de todos los fragmentos de interés. El master mix de Qiagen presentó amplificaciones inconsistentes y requirió volúmenes excesivos de muestra, lo que ocasionó la pérdida de la muestra M1.

El master mix de Invitrogen proporcionó bandas claras y reproducibles en todas las corridas (Figura 1). La optimización de las condiciones de amplificación permitió obtener productos específicos y reproducibles para los fragmentos FalciBETA, Falci5 ϵ , FalciYG, FalciYA, Falci3Will y Falci3J3. Cinco de los seis oligonucleótidos amplificaron adecuadamente a 60 °C; el cebador Falci5 ϵ , con temperatura de fusión calculada de 54.5 °C, requirió ajuste a 55 °C para obtener una banda óptima.

La electroforesis en gel prefabricado al 2% no requirió modificaciones sobre el protocolo del fabricante.

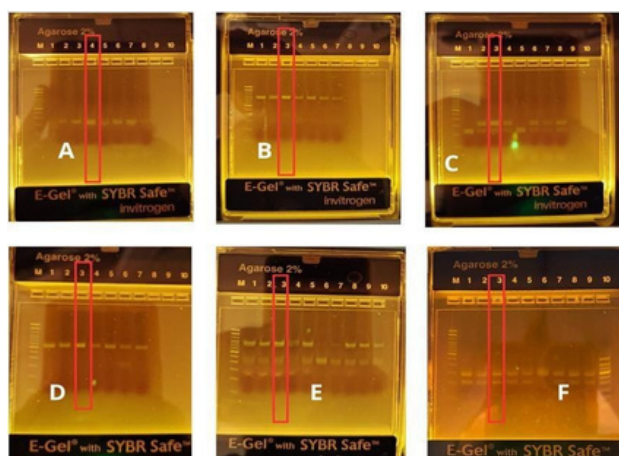


Figura 1. Visualización de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Patrones de digestión enzimática para el haplotipo Senegal. Se observa la muestra 22 en cada carril marcado con los diferentes oligonucleótidos y las enzimas de restricción correspondientes. FalcB-Ddel (A), Falc5ε-HincII (B), YG-HindIII (C), YA-HindIII (D), 3WILL-HincII (E), 3J3-HfiI (F). Obtenemos los cortes correspondientes, marcando la ausencia de restricción (-) 350pb (A), 974pb (B), 635pb (D); Seguido por la presencia del sitio de restricción (+) 91pb y 237pb (C), 914pb, 479pb y 435pb (E), 123pb, 213pb, 302pb (F). Basándonos en estos resultados, la muestra corresponde a un paciente con haplotipo Senegal.

En relación con la distribución de haplotipos, de las 22 muestras analizadas se identificaron tres variantes principales, con mayor frecuencia el haplotipo Senegal en 10 muestras (45.5%), seguido por el haplotipo Bantú en 9 muestras (40.9%) y el haplotipo Benín en 3 muestras (13.6%) (Tabla 1). De igual manera, se observó concordancia total entre los resultados obtenidos mediante PCR y el análisis previo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), confirmándose la presencia del alelo β S en el 100% de las muestras estudiadas.

Haplotipo	n	Frecuencia (%)
Senegal	10	45.5%
Bantú	9	40.9%
Benín	3	13.6%
Camerún	0	0%
Árabe-hindú	0	0%

Tabla 1. Distribución de haplotipos del gen β -globina en pacientes con HbSS. (n=22).

Discusión

La estandarización de la técnica de PCR punto final para la identificación de haplotipos asociados a anemia falciforme demostró ser reproducible y adecuada. La obtención de ADN íntegro y funcional mediante el kit PureLink Genomic DNA permitió una amplificación exitosa de los fragmentos de interés, respaldando la utilidad del protocolo empleado en concordancia con estudios previos.

La optimización de las condiciones de PCR evidenció diferencias en el desempeño de los reactivos utilizados, observándose mayor estabilidad y reproducibilidad con el máster mix de Invitrogen. Así mismo, la evaluación de los oligonucleótidos permitió establecer condiciones óptimas de amplificación, particularmente para el cebador Falc5ε, cuya eficiencia mejoró tras el ajuste empírico de la temperatura en el alineamiento.

El protocolo molecular desarrollado permitió identificar de manera confiable los haplotipos del clúster β -globina mediante PCR-RFLP, obteniendo patrones de restricción consistentes con metodologías previamente descritas. La distribución de haplotipos mostró predominio del haplotipo Senegal, seguido de Bantú y Benín, resultados concordantes con la presencia de haplotipos africanos clásicos reportados en poblaciones afrodescendientes, estos resultados son concordantes con los de Rusanova et al. (2011), el único estudio previo realizado en Panamá, aunque la metodología actualizada permite ahora su replicabilidad.

En conjunto, los hallazgos respaldan la viabilidad de incorporar esta metodología al laboratorio de genética como herramienta complementaria del Programa de Tamizaje Neonatal, favoreciendo una caracterización molecular temprana que permita correlacionar el perfil genético con la evolución clínica de los pacientes.

Conclusión

La estandarización de la técnica de PCR punto final permitió establecer condiciones reproducibles y confiables para la amplificación y digestión de fragmentos del gen β -globina,

Los procedimientos optimizados constituyen una base sólida para la implementación de un método molecular complementario al diagnóstico neonatal de anemia falciforme, aportando información genética relevante que podría contribuir al seguimiento y manejo clínico de los pacientes. A su vez, los resultados obtenidos abren camino a futuros estudios sobre la distribución haplotípica en la población panameña, información que podría orientar estrategias de salud pública dirigidas a esta enfermedad.

Agradecimientos

Las autoras expresan su agradecimiento al Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel y a su Programa de Tamizaje Neonatal por facilitar las muestras y el acceso al laboratorio de genética, a la Licda. Cynthia Cepeda y el Licdo. Sergio Real. Asimismo, a las familias de los pacientes que otorgaron su consentimiento informado para la realización de esta investigación.

Referencias

1. López, M., Morado, M., Ricard, M. & Villegas A. (2021). Guía de enfermedad de células falciformes. <https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2022/02/28/2021-Guia-Enfermedad-de-Celulas-Falciformes.pdf>
2. Díaz Suárez, J. H. (2011). Frecuencias de los haplotipos asociados a pacientes con anemia falciforme y el rasgo falciforme del Valle del Cauca [Tesis de pregrado, Universidad del Valle]. Biblioteca Digital Universidad del Valle. <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/items/1a7eaa4c-5ed0459e-9ef9-ae97800ef813>
3. Piel, F. B., Steinberg, M. H., & Rees, D. C. (2017). Sickle Cell Disease. *The New England journal of medicine*, 376(16), 1561–1573. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1510865>
4. Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel. (2021). Anemia falciforme, una enfermedad genética común, conócela. <https://hn.sld.pa/anemia-falciforme-una-enfermedad-genetica-comun-conocela/>
5. Rusanova, I., Cossio, G., Moreno, B., Javier Perea, F., De Borace, R. G., Perea, M., Escames, G., & Acuña-Castroviejo, D. (2011). β -globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panamá. *American journal of human biology: the official journal of the Human Biology Council*, 23(3), 377–380. <https://doi.org/10.1002/ajhb.21148>

6. Gesiotto, Q. (2015). Beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell disease: polymorphisms of the Arab Indian haplotype [Tesis de maestría, Boston University]. <https://hdl.handle.net/2144/16291>
7. Sutton, M., Bouhassira, E. E., & Nagel, R. L. (1989). Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β S haplotypes. *American Journal of Hematology*, 32(1), 66–69.
8. QIAGEN. (s.f.). dPCR vs. qPCR vs end-point PCR. QIAGEN Knowledge Hub. <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/benchguide/pcr/digital-pcr/digital-pcr-vs-quantitative-pcr-vs-end-point-pcr>
9. Díaz-Matallana, M., Márquez-Benítez, Y., Martínez-Lozano, J. C., Briceño-Balcázar, I., Benavides-Benítez, E., & Bernal, J. E. (2021). Anemia falciforme: una revisión sobre el genotipo de la enfermedad, haplotipos, diagnóstico y estudios asociados. *Revista médica de Chile*, 149(9), 1322-1329. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872021000901322>
10. Durán, C. L., Morales, O. L., Echeverri, S. J., & Isaza, M. (2012). Haplotipos del gen de la globina beta en portadores de hemoglobina S en Colombia. *Biomédica*, 32 (1), 103-111. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572012000100012&lng=en&tlng=es
11. Adabale, A., Makanjuola, S. B. L., Akinbami, A., Dosunmu, A., Akanmu, A., Javid, F. A., & Ajonuma, L. C. (2021). Frequency of beta S globin gene haplotypes among sickle cell patients in Nigeria. *The Journal of international medical research*, 49(6), 3000605211019918. <https://doi.org/10.1177/03000605211019918>
12. Arishi, W. A., Alhadrami, H. A., & Zourob, M. (2021). Techniques for the Detection of Sickle Cell Disease: A Review. *Micromachines*, 12(5), 519. <https://doi.org/10.3390/mi12050519>
13. Cela, E., Ruiz, A., & Cervera, Á. (2019). Enfermedad de células falciformes. Guía de práctica clínica. *Enfermedad De Células Falciformes. Guía De Práctica Clínica* (abril 2019). <https://www.sehop.org/wp-content/uploads/2019/03/Gu%C3%ADa-SEHOP-Falciforme-2019.pdf>
14. Cossio, G., Chávez, T., González, D., & Delgado, M. (2011). Estudio preliminar de incidencia de hemoglobinopatías, en neonatos tamizados en el Hospital del Niño de Panamá. *Agosto-diciembre 2009. Revista Pediátrica de Panamá*, 40(01), 1–1. <https://www.pediatricadepanama.org/index.php/rssp/article/view/2089>
15. Aghajani, F., Mahdavi, M. R., Kosaryan, M., Mahdavi, M., Hamidi, M., & Jalali, H. (2017). Identification of β -globin haplotypes linked to sickle hemoglobin (Hb S) alleles in Mazandaran province, Iran. *Genes & genetic systems*, 91(6), 311–313. <https://doi.org/10.1266/ggs.16-00005>