

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a woman in a red and white dress, likely the Virgin Mary, holding a child. Above her is a golden crown with a cross. To the left and right are golden lions rampant. Below the central figure are two golden columns. The background is a light blue sky with a white cloud. The entire seal is surrounded by a grey border containing the Latin text "ACADEMIA COACTEMALAE CAROLINA CONSPICUA CETERA SORBIS".

**CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES DIABÉTICOS CON HEMOGLOBINAS
ANORMALES QUE ASISTEN A LA CONSULTA EXTERNA DE ADULTOS DE UN
HOSPITAL PÚBLICO URBANO**

**DWIGHT SIDNEY SMITH DE PAZ
NEIDY DEYDANIA OLIVA XITIMUL**

QUÍMICOS BIÓLOGOS

GUATEMALA, MAYO DE 2018

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES DIABÉTICOS CON HEMOGLOBINAS ANORMALES
QUE ASISTEN A LA CONSULTA EXTERNA DE ADULTOS DE UN HOSPITAL PÚBLICO**

URBANO

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

**DWIGHT SIDNEY SMITH DE PAZ
NEIDY DEYDANIA OLIVA XITIMUL**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICOS BIÓLOGOS**

GUATEMALA, MAYO DE 2018

JUNTA DIRECTIVA

DR. RUBÉN DARIEL VELÁSQUEZ MIRANDA	DECANO
M.A. ELSA JULIETA SALAZAR MELÉNDEZ DE ARIZA	SECRETARIA
M.Sc. MIRIAM CAROLINA GUZMÁN QUILO	VOCAL I
DR. JUAN FRANCISCO PÉREZ SABINO	VOCAL II
LIC. CARLOS MANUEL MALDONADO AGUILERA	VOCAL III
BR. ANDREINA DELIA IRENE LÓPEZ HERNÁNDEZ	VOCAL IV
BR. CAROL ANDREA BETANCOURT HERRERA	VOCAL V

ACTO QUE DEDICO A:

A nuestros asesores: Lic. Manuel Díaz, Lic. Eva Montoya y Lic. Antonio Galindo por su paciencia y sus sabias enseñanzas.

A nuestra revisora: MA. Margarita Paz por su dedicación

A todos nuestros catedráticos, por habernos forjado en nuestra vida profesional.

Dwight y Neidy

A Dios por guiar mis pasos y ser mi fortaleza en todo momento. A mis padres: Sidney y Marta por su amor, apoyo, entrega incondicional, consejos, palabras de aliento, por creer en mí y por mostrarme el camino hacia la superación. A mi hermana: Alice por su apoyo en todo momento, cariño y por estar en los momentos más importantes de mí vida. A mis amigos y personas que siempre estuvieron motivándome a seguir adelante y no darme por vencido.

Dwight

Primero que nada, gracias a Dios por permitir que todo esto fuera posible, a mis padres por apoyarme de todas las formas posibles para que llegará hasta acá, a mis hermanos por estar ahí en todo momento, a nuestros asesores y revisores por su paciencia y apoyo para la realización y culminación de este seminario. A la Universidad de San Carlos de Guatemala, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por su enseñanza, al Laboratorio Clínico Popular por abrirme sus puertas y permitirme desarrollar profesionalmente y por último, pero no menos importante a todas las personas y amigos de la Universidad, del Laboclip, del bachillerato, de la Iglesia y de los viajes por ser parte de este recorrido.

Neidy

ÍNDICE

I. Resumen	1
II. Ámbito de la investigación.....	2
III. Antecedentes.....	3
A. Clasificación de las hemoglobinas estructurales	3
1. Hemoglobina S	4
2. Hemoglobina C	7
3. Hemoglobina E	9
4. Hemoglobina D y G.....	11
B. Estudios epidemiológicos de las hemoglobinas anormales	11
C. Relación de pacientes diabéticos y hemoglobinas anormales.....	14
D. Detección de hemoglobinas anormales.....	17
1. Electroforesis	17
2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	19
E. Estudios de hemoglobinas anormales por medio de la metodología de HPLC	20
IV. Justificación.....	22
V. Objetivos	23
VI. Materiales y Métodos	24
VII. Resultados.....	29
VIII. Discusión	37
IX. Conclusiones.....	44
X. Recomendaciones.....	45
XI. Referencias	46
XII. Anexos	52
A. Anexo 1.....	52
B. Anexo 2.....	54
C. Anexo 3	55
D. Anexo 4	56
E. Anexo 5	57
F. Anexo 6	58
G. Anexo 7	59

I. Resumen

Las hemoglobinas anormales comprometen la estructura normal de la molécula de la hemoglobina (Hb), existen más de mil variantes de las cuales aproximadamente el 5% de la población mundial es portador; sin embargo las más frecuentes son: la hemoglobinas S y C (HbS y HbC). Por otra parte se han reportado hallazgos de estas enfermedades durante la medición de la hemoglobina glicosilada (HbA1c), ya que interfieren en dicha medición si no se utilizan métodos certificados por el Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina” (NGSP por sus siglas en inglés).

En el presente estudio, se tomaron 723 muestras a pacientes que asistieron a la consulta externa de adultos del Hospital General San Juan de Dios (HGSJD), registrando 136 hombres y 587 mujeres, a los cuales se les midió la HbA1c por medio de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y que a su vez detecta hemoglobinas anormales, encontrándose nueve pacientes, de los cuales ocho presentaron hemoglobina S (HbS) y uno hemoglobina C (HbC).

Las nueve muestras que presentaron hemoglobinas anormales, fueron analizadas por medio de otro método de diferente principio, electroforesis de acetato de celulosa, el cual confirmó la hemoglobina anormal en los nueve pacientes, pero sin distinguir la HbC, identificando a todos los casos como HbS. Esto demuestra la confiabilidad de la tecnología automatizada, como HPLC, además de ser simple, accesible y rápida.

El estudio determinó 1.24% de frecuencia de pacientes diabéticos con presencia de hemoglobinas anormales, sin presentar recuentos hematológicos eritrocitarios anormales. A partir de los resultados obtenidos se recomienda implementar un programa de tamizaje de hemoglobinas anormales, con el fin de detectar y reportar personas portadoras, así como parejas en riesgo. Esto mejorará la comunicación y vigilancia recomendada en 2010 por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

II. Ámbito de la investigación

Las hemoglobinas anormales son trastornos hereditarios autosómicos recesivos del gen de la globina que llevan a síntesis reducida o nula de las cadenas globínicas o bien a la producción de cadenas anormales lo cual termina afectando la función, solubilidad y estabilidad de la molécula de la hemoglobina. Por lo que su importancia es lograr distinguir entre el portador heterocigoto asintomático, el cual solo presenta la afección de un alelo del gen de la globina, pero tiene la capacidad de transmitir el defecto a sus descendientes; y el homocigoto que sí sufren la enfermedad. Actualmente existen más de 1,000 variantes de hemoglobinas, sin embargo, las más frecuentes son las hemoglobinas S, C, E y D, siendo la hemoglobina S la que presenta las consecuencias clínicas más graves, así como la mayor prevalencia en América.

La hemoglobina glicosilada (HbA1c) es una prueba de rutina en pacientes diabéticos. Por lo que, la “Asociación Americana de Diabetes” (ADA por sus en inglés) recomienda tener un control estricto durante su medición, ya que diversos estudios reflejan que la presencia de hemoglobinas anormales (HbS y HbC) interfieren durante la medición de la HbA1c.

El ámbito de la investigación fue en la consulta externa de adultos del Hospital General San Juan de Dios (HGSJD), en donde se muestrearon por HPLC a pacientes diabéticos con examen de hemoglobina glicosilada en un período de tres meses. Las muestras de los pacientes que presentaron algún tipo de hemoglobina anormal, se les realizó electroforesis en acetato de celulosa como segunda prueba de diferente principio.

III. Antecedentes

Las hemoglobinas anormales son el resultado de mutaciones en las cadenas globínicas ya sean alfa, beta, gamma, épsilon o delta, lo cual afecta la función y estabilidad de la molécula (Rodak, 2007 y Mckenzie, 2000).

Se han identificado más de 1,000 variantes de hemoglobinas anormales alrededor del mundo, que resultan de modificaciones estructurales o cualitativas en la cadena de globina y así como modificaciones cuantitativas. Más del 95% de la alteración consiste en la sustitución de un sólo aminoácido (Mckenzie, 2000). Dependiendo de la naturaleza y localización del aminoácido reemplazado se van a producir cambios en la estabilidad, solubilidad y función de la molécula de hemoglobina, responsables finales de las manifestaciones clínicas (Sáenz, 2005). El mecanismo más simple en la producción de una variante de la hemoglobina es la sustitución de una base en el código genético que da origen a una mutación. El cambio más conocido de configuración molecular es el que ocasiona la sustitución del ácido glutámico por valina en la posición 6 de la cadena Beta, que da origen a la hemoglobina S (HbS) causante de la anemia falciforme, hemoglobina anormal más común en el mundo (Sáenz, 1988).

A. Clasificación de las hemoglobinas estructurales

Las hemoglobinas anormales estructurales más ampliamente extendidas por todo el mundo son: la hemoglobina S, C, E y D (HbS, HbC, HbE y HbD). La HbS es la que presenta las consecuencias clínicas más graves (Rodak, 2005).

1. Hemoglobina S

La hemoglobina S (HbS) fue descubierta en 1910 por el Dr. James B. Herrick que acuñó el término de “enfermedad falciforme” debido a la forma de los eritrocitos. Sin embargo, tuvieron que pasar 15 años antes de que esta enfermedad fuera considerada como primaria y no debida a una infección u otra condición. En 1927, Hahn y Gillespie, demostraron que se podía provocar esta forma saturando de dióxido de carbono una suspensión de eritrocitos, y hacia 1945 Pauling sugirió que la enfermedad se debía a una anomalía de la molécula de hemoglobina a la que denominó hemoglobina S (llamada así por su inicial en inglés “sickle” = hoz, debido a la forma que adoptan los eritrocitos cuando disminuye su oxigenación). Poco después, se evidenció que la hemoglobina S era el resultado de una mutación en el codón 6 del gen beta de la globina en la que la base timina es sustituida por la adenina, que ocasiona que el glutámico en la posición 6 de la globina sea sustituido por valina. Como esta sustitución se lleva a cabo en una posición superficial de la molécula de la hemoglobina y la carga eléctrica es diferente, la movilidad electroforética de la HbS es menor que la de la hemoglobina normal, pudiéndose ser fácilmente separada (Steinberg, 2011).

La anemia falciforme afecta a las personas que heredan dos copias del gen mutado de sus padres portadores. Los padres portadores tienen una probabilidad entre cuatro de tener un hijo enfermo y una probabilidad entre dos de tener un hijo portador no afectado. Los portadores no son afectados, pero pueden transmitir la enfermedad. Los individuos tienen 38-42% de hemoglobina S y el resto es la hemoglobina A. Cada célula roja contiene una mezcla de A y S. La cantidad de A en cada celda es suficiente para prevenir la formación de células falciformes bajo la mayoría de condiciones fisiológicas (Galiano, 2009).

Como consecuencia de la mutación, cuando la hemoglobina se desoxigena sufre un proceso espontáneo de polimerización formando un gel cristalino. Cada polímero está formado por 14 haces longitudinales de deoxi-Hb que se disponen formando un cuerpo tactoide, estructura cilíndrica insoluble y rígida. Debido a estos polímeros se rompe el citoesqueleto del eritrocito, adoptando esta la forma característica del drepanocito (Nelson, 2007).

Aunque el fenómeno de la falciformación es reversible, entre el 5% y 50% de los eritrocitos falciformes no consiguen recuperar su forma original, siendo eliminados por el sistema mononuclear fagocítico. Por otra parte, los eritrocitos alterados presentan un gran descenso del volumen corpuscular y un gran aumento de la concentración de hemoglobina. Esto es debido a que la deoxi-Hb induce alteraciones de la membrana eritrocitaria (modificación de la composición y distribución de los fosfolípidos en la bicapa) que se traducen por una profunda deshidratación. Adicionalmente, los drepanocitos exhiben una gran tendencia a adherirse al endotelio vascular favoreciendo la formación de microtrombos y oclusiones vasculares periféricas (Deulofeu, 2015).

La confirmación diagnóstica de la anemia falciforme o de su carácter portador se lleva a cabo mediante el hemograma (que muestra anemia macro o microcítica y reliculocitosis), el examen morfológico del Frotis (que muestra la presencia de numerosos drepanocitos) y la electroforesis de las hemoglobinas a pH alcalino (que permite determinar el tipo de hemoglobina predominante) y que en el caso de la anemia falciforme homocigota es mayoritario con ausencia total de hemoglobina A normal (Peñazola, 2008). En el caso de la anemia falciforme con portador heterocigoto las bandas electroforéticas de las HbA y HbS suelen ser de la misma intensidad. Para confirmar el carácter drepanocítico del componente hemoglobínico anormal se lleva a cabo el examen microscópico de los hematíes sometidos a desoxigenación sobre el portaobjetos. En el diagnóstico diferencial están incluidas

todas las manifestaciones clínicas y complicaciones de la anemia falciforme (Rodak, 2007).

La HbS se presenta en dos formas clínicas: la homocigota, la más frecuente, en la que los pacientes experimentan anemia hemolítica y la heterocigota, generalmente asintomática. La intensidad de la enfermedad, que se manifiesta a partir de los 3 o 4 meses de edad, depende de su coexistencia con otras hemoglobinas anormales asociadas y es muy variable de unos pacientes a otros (Gulbis, 2008). Se reconocen tres fases evolutivas de la anemia falciforme, cada una de ellas con una sintomatología característica: la fase estacionaria corresponde de los 1 a 4 primeros años de vida y los síntomas son los de un síndrome hemolítico crónico moderado o intenso con una intensa retención esplénica de los eritrocitos y complicaciones vaso-oclusivas. Los niños muestran hiperesplenismo, anemia, palidez cutáneomucosa, ictericia subconjuntival y retraso en el crecimiento (Alvear, 1992).

La fase de expresividad aguda se inicia a partir de los 4 años, con agravamiento del cuadro anémico y aparición de diversas manifestaciones clínicas de carácter vasooclusivo, así como infecciones recidivantes, que son las responsables de un elevado porcentaje de muertes. Además los pacientes experimentan crisis depreanocíticas muy dolorosas que obedecen a pequeños infartos de la microvasculatura en los miembros superiores e inferiores (dactilitis con síndrome mano-pie)(Jamen, 2010). Cuando ocurren accidentes vasooclusivos en vasos grandes, la afectación del sistema vascular pulmonar que pueden producir hipertensión pulmonar e insuficiencia respiratoria grave y trombosis de la arteria central de la retina que puede ser la causa de amaurosis. La fase de expresividad crónica se observa solo en los pacientes que sobreviven la infancia, siendo muy numerosas las complicaciones que ocasiona. En más del 50% de los pacientes aparecen úlceras maleolares favorecidas por traumatismos e infecciones. Otras complicaciones, más o menos frecuentes, son las necrosis óseas asépticas, las

retinopatías proliferativas muy parecidas a las diabéticas, insuficiencia pulmonar crónica frecuentemente con hipertensión pulmonar, sobrecarga funcional cardíaca y complicaciones renales, en particular e incapacidad para concentrar orina. Por el momento la anemia falciforme no tiene cura; por tanto, los tratamientos son paliativos y preventivos de las complicaciones (Galiano, 2009).

Los objetivos del tratamiento son el manejo de las crisis vasooclusivas, el alivio de los dolores crónicos, el tratamiento de la anemia hemolítica crónica, la prevención y tratamiento de las infecciones, el tratamiento de las complicaciones en los órganos afectados por la enfermedad, la prevención del ictus y la detección y tratamiento de la hipertensión pulmonar. La aparición de una crisis drepanocítica aguda, con dolores intensos y fiebre de 38 grados o más, requiere un tratamiento de urgencia para aliviar el dolor, descartar la posibilidad de una infección y prevenir la deshidratación (Duarte, Balderas & Hinojosa, 2009).

Las crisis vasooclusivas son tratadas mediante una hidratación adecuada con fluidos intravenosos; para el dolor, se recomiendan opiáceos, siendo la morfina el fármaco de primera elección. El tratamiento de la anemia aguda requiere la práctica de frecuentes transfusiones hasta conseguir valores de hemoglobina del orden de los 100 g/L (Torres, Eberle, Sciuccati & Bonduel, 2003).

2. Hemoglobina C

La hemoglobina C (HbC) es una enfermedad autonómica recesiva (heredada), ocasionada por una mutación en el gen que codifica la cadena beta de la globina que se da como resultado de la sustitución del ácido glutámico por lisina en la posición 6 de la misma cadena (Rodak,2007). Las anomalías provocadas por esta mutación son la formación de la cristalización de los tetrámeros C dentro del eritrocito, debido a la disminución de la solubilidad de la HbC en el eritrocito por la alteración de la carga eléctrica superficial que disminuye su solubilidad y hace que

se precipite en el interior de los glóbulos rojos. Los individuos tienen un 25 - 40% de la hemoglobina C y el resto es la hemoglobina A. Cada célula roja contiene una mezcla de HbA y HbC (Gulbis & Aguilar 2008).

En algunos casos se puede presentar como enfermedad secundaria una anemia hemolítica moderada, el 50% de los pacientes aparecen ictericos y anémicos en el período neonatal o en los primeros meses de vida, 30% en la infancia y 20% en la adolescencia (Gulbis & Aguilar, 2008).

En los individuos homocigotos hay una anemia normocrómica normocítica, en donde en ocasiones puede encontrarse cierto grado de microcitosis y una hipocromía leve. Hay un aumento marcado en el número de células en diana y reticulocitos. El estado heterocigoto no produce trastorno alguno. Aunque la HbC tiende a cristalizar en condiciones de hipoxia, no produce crisis vasooclusivas como las de la HbS. La morfología eritrocitaria se caracteriza por la aparición de dianocitos (Saénz, 2005).

La mayoría de las personas con esta anomalía no presentan síntomas. Ocasionalmente, los pacientes pueden presentar ictericia y algunas personas afectadas pueden desarrollar cálculos biliares que requieren de tratamiento (Deulofeu, 2015). El examen físico puede mostrar una esplenomegalia, en los pacientes que presentan el estado homocigoto.

Para diagnosticar esta anomalía se requiere de un hemograma, de una electroforesis de hemoglobina, de un frotis de sangre periférica donde se observara la formación de cristales tetragonales de HbC, una hemoglobina en la sangre junto con el conteo sanguíneo completo para determinar qué tipo de anemia se presenta y en este caso es una anemia normocrómica normocítica, con cierto grado de microcitosis e hipocromía leve y actualmente se realiza la metodología HPLC (Jamen, 2010).

Usualmente no se requiere tratamiento. El suplemento de ácido fólico puede ayudar al cuerpo a producir glóbulos rojos normales y mejorar los síntomas de la anemia.

Las expectativas de vida de las personas con la enfermedad de la hemoglobina C pueden esperar llevar una vida normal. Aunque en algunos casos pueden resultar complicaciones tales como anemia, colecistopatía y esplenomegalia (Gulbis & Aguilar, 2008).

3. Hemoglobina E

La hemoglobina E (HbE) es el resultado de una mutación en el gen que codifica la síntesis de la cadena beta de la globina, en la que la lisina sustituye al ácido glutámico en la posición 26. Este tipo de variante causa una reducción en el tamaño de los eritrocitos (microcitos), por lo que disminuye su afinidad por el oxígeno, acompañados de hipocromía (Alvear, M., 1992). Los individuos heterocigotos son asintomáticos y los homocigotos sufren anemia con una reducción en la vida media de los eritrocitos. Las personas tienen entre 20% y 40% de la hemoglobina E, el resto de la hemoglobina es A. Cada célula roja contiene una mezcla de A y E (Rodak, 2007).

La síntesis de esta hemoglobina está parcialmente reducida, manteniéndola como una enfermedad benigna. Un individuo puede ser heterocigoto para la enfermedad (individuos HbAE) cuando sólo uno de los genes de β -globina está mutado, u homocigoto cuando los dos genes β - globina están afectos (individuos HbEE). La síntesis de esta hemoglobina anormal se encuentra parcialmente reducida. Pacientes heterocigotos y homocigotos para HbE (HbAE y HbEE, respectivamente) no presentan síntomas clínicos y tienen una esperanza de vida normal (Saézn, 2005). En el estudio morfológico del frotis de sangre, se puede

observar microcitosis e hipocromía. Se debe realizar el diagnóstico diferencial con el déficit de hierro (Galanello, Origa, Orphanet & Rare, 2010).

El carácter benigno de esta hemoglobina conlleva que en la gran mayoría de casos no sea necesario ningún tipo de tratamiento. Dos personas que son portadores de un único gen mutado tienen un 25% de probabilidad de tener un hijo afectado por la enfermedad en cada embarazo. El 50% de probabilidad de tener un hijo que sea portador sano, es decir que no desarrolle clínicamente la enfermedad, y un 25% de probabilidad de tener un hijo sano, es decir que no tenga la enfermedad ni que sea portador (James, 2010).

La HbE es ligeramente inestable, pero no lo suficiente como para modificar significativamente la vida de los eritrocitos. La alta frecuencia del gen de la HbE puede ser un resultado del fenotipo talasémico asociado a su herencia. Los heterocigotos se parecen a los que tienen un rasgo β -talasémico leve (Gulbis & Aguilar). Los homocigotos presentan anomalías algo más evidentes, pero se encuentran asintomáticos. Los heterocigotos compuestos, de HbE y un gen de β -talasémico, pueden tener β -talasemia intermedia o β talasemiamayor, dependiendo de la gravedad del gen talasémico heredado simultáneamente (Ruiz, 2009).

El alelo β E contiene solamente un cambio de base, en el codón 26, que produce la sustitución del aminoácido. Sin embargo, esta mutación activa un lugar de corte y empalme del ARN, generando un ARNm de globina estructuralmente anómalo, que no se puede traducir a partir de, aproximadamente, el 50% de la molécula inicial de pre-ARNm. El 40% a 50% restante, que se corta y empalma normalmente genera un ARNm funcional que se traduce en Globina β E porque el ARNm maduro es portador del cambio de base que modifica el codón 26. El consejo genético a las personas con riesgo de HbE debe centrarse en la interacción de la HbE con la β -talasemia, más que en los homocigotos de HbE, una situación que se acompaña de microcitosis e hipocromía y que, habitualmente, es

asintomática, con concentraciones de hemoglobina que rara vez son inferiores a los 10 g/dl (anemia leve a moderada) (Patton, 2014).

4. Hemoglobina D y G

Son variantes de hemoglobina cuando ocurre una mutación en la posición 121 de la cadena beta en donde la glicina sustituye al ácido glutámico. Los eritrocitos se observan microcíticos e hipocrómicos; por tanto, se dificulta el transporte de oxígeno y se vuelven poco flexibles para transitar en los vasos sanguíneos (Patton, 2014). Tanto la HbD como la HbG son asintomáticas en el estado heterocigoto, sin embargo el estado homocigoto se caracteriza por una anemia hemolítica leve y esplenomegalia no progresiva crónica (Rodak, 2007).

B. Estudios epidemiológicos de las hemoglobinas anormales

Costa Rica es el país de Centro América que más investigación tiene sobre hemoglobinas anormales; se realizó una de las primeras publicaciones en la “Revista Médica de Costa Rica” en 1945, de un caso de una mujer de 26 años que presentaba abundantes eritrocitos alargados a manera de drepanocitos, reticulocitosis y eritroblastemia. Años más tarde, en 1966, se realiza una búsqueda intencional de hemoglobinas anormales al proceder con un estudio en la población Santa Cruz Guanacaste detectando 7.6% de muestras positivas para drepanocitosis. En 1967 en una población similar del mismo territorio se señala un 4.8% de hemoglobina AS. Un año más tarde con la intención de obtener datos numéricos y estadísticos mínimos sobre la frecuencia de hemoglobinas anormales en Costa Rica, se encontraron 1.4% de hemoglobinas anormales en un total de 947 adultos de 13 poblaciones distribuidas en todo el territorio costarricense (Saénz, G., Avarado, A., Atmetlla, F., Arroyo, G., Jiménez, R., Valenciano, E., 1973)(Saénz, G., Arroyo, G., Jiménez, J., Gutiérrez, A., Barrenechea, M., Brilla, E. &Valenciano, E., 1971).

En 1974 Sáenz realiza un estudio con la población estudiantil universitaria de Costa Rica, analizando 1,500 estudiantes entre 17 y 35 años de edad, logrando determinar 1.26% de hemoglobinas anormales, 1.06% HbAS y 0.20% HbAC (Saénz, G., Montero, G., Arroyo, G., Jiménez, J., Alvarado, A., Valenciano, E., 1973). Dos años más tarde, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define políticas en torno a la planificación epidemiológica, la investigación y el consejo genético que se debedársele a las mutaciones de la hemoglobina (hemoglobinas anormales) que son clínicamente importantes: como la anemia drepanocítica y la herencia dual de la hemoglobina S y C, o genes talasémicos; con este fin en 1980 se fundó el Centro de Investigación de Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA). Ese mismo año se llevó a cabo un proyecto de investigación en Costa Rica; seleccionando estadísticamente a 12,000 escolares diferenciándolos en caucásica, híbrida (mestizo) y raza negra, logrando una incidencia de la hemoglobina S de un 10.90% en la raza negra, 4.43% en la híbrida y 0.84% en la caucásica, de la misma manera para la hemoglobina C un 3.72%, 0.40% y 0.14%, respectivamente (Saénz, 2005)(Saénz, G., Cerdas, J. 2009).

En 1986 en Guatemala se llevó a cabo un estudio sobre la “Frecuencia de hemoglobinopatías en la población de Livingston, Izabal”, el cual reveló que de un total de 750 pacientes de raza negra de ambos sexos entre 1 a 35 años, 30 pacientes presentaron variaciones de la hemoglobina HbS, HbF y hemoglobina normal (HbA), reflejando un 4% del total de las muestras presentaban el carácter heterocigoto; logrando así determinar una frecuencia del 3.33% de anemia drepanocítica con predominio del sexo femenino y siendo las edades más afectadas entre 1 a 5 años y de 31 a 35 años (Solórzano, C., & Arturo, E., 1986).

En zonas de Centroamérica, un estudio realizado en 1988 revela la prevalencia de HbS y HbC, logrando así determinar que varía mucho de un país a otro y aun dentro de las poblaciones de cada país (Anexo 2), logrando identificar diferentes frecuencia de hemoglobina AS y AC que existen en zonas de

Centroamérica; entre los que se pueden mencionar: San Salvador 1.65% de HbAS, en Ciudad de Panamá 18.6% de HbAS y 0.80% de HbAC; en Limón, Honduras 16.8% de HbAS y 2.4% de HbAC y en Livingston, Guatemala 17.6% HbAS (Saénz, G., Altafulla, M., Sancho, M., 1988).

Por otra parte, en América Latina, la contribución africana ha sido predominante desde los inicios del siglo XVI, con base en la migración forzada de alrededor de 20 millones de esclavos. Por lo que se ha calculado que la probabilidad de anemia falciforme (HbSS) en este continente es de 0.16/1000; y para poblaciones de origen africano-caribeño se ha calculado una frecuencia de 6.1% a 18% para hemoglobina S (HbS) y de 0 a 5% para hemoglobina C (HbC) (Rodríguez, W.E., Sáenz, G. F., & Chaves, M. A., 1998).

Al igual que en los demás países de América tropical, la población de Ecuador es muy heterogénea y está constituida en un gran porcentaje por mestizos y grupos raciales puros de indígenas y negros. Por lo que la prevalencia de hemoglobinas anormales detectadas en Ecuador (24.3%) es una de las más altas que se han publicado en América Latina. Las hemoglobinas AS y AC se han detectado en Brasil con frecuencia, en un porcentaje de 4.8% hasta un 15%, en Cuba se refieren frecuencias de 15%, en Costa Rica de 10.6%, en Surinam de 11.5%, en Colombia se ha comunicado frecuencias entre 7.7% y 14.7% y finalmente en Livingston, Guatemala la frecuencia de hemoglobinas anormales es entre 18.3%, sin detectarse hemoglobina C (Guevara, A., Chino, M., Calvopiña, M., & Guaderian, R., 1998). Sin embargo, en 1999 en Guatemala, en el departamento de Izabal, se realizó un estudio de la “Prevalencia de anemia de células falciformes en niños de 5 a 10 años de raza negra” logrando determinar una prevalencia de 3.6 % por 100 niños siendo prevalente el género masculino (Zúñiga, C., 1999).

En 2005 la OMS declara la drepanocitosis como una prioridad de la salud pública, dada la problemática socioeconómica y familiar que genera esta enfermedad (Abarca, G. Navarrete, M., Trejos, R., Cespedes, C., & Saborío, M. 2008). En 2008, en el boletín de la OMS, se publicaron datos de 2003 sobre la “Epidemiología de las hemoglobinas anormales”, evidenciando así que el 5.2% de la población mundial es portadora de alguna hemoglobina anormal; de igual manera se revela que América posee un 3% de portadores y un 0.49% de personas con Trastornos Drepanocíticos. Asimismo, se reveló que aproximadamente 3.4% de las defunciones en los niños menores de 5 años son por causa de hemoglobinas anormales y en torno a un 7% de las mujeres embarazadas son portadoras de hemoglobina S, C, D o E y más de un 1% de parejas corren riesgo mundialmente. En países caribeños se calcula que aproximadamente de 170 uniones, una unión ocurre entre dos individuos heterocigotos y que probablemente cerca de 1,600 niños drepanocíticos nacen anualmente en estas regiones. Por lo que la recomendación de la OMS es que el cribado de las hemoglobinas anormales deberá formar parte de los servicios básicos de salud de la mayoría de los países (Modell, B., Darlison, M., 2008,) (Saénz, 1998).

C. Relación de pacientes diabéticos y hemoglobinas anormales

La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC por sus siglas en inglés) se refiere a la hemoglobina glicosilada (HbA1c) como un grupo de sustancias que se forman a partir de reacciones bioquímicas entre la hemoglobina A (HbA) y algunos azúcares presentes en la circulación sanguínea, que no pertenece a las hemoglobinas anormales ya que no se forma debido a una mutación de alguna cadena de la globina sino a los niveles que glucosa que se mantienen en circulación sanguínea (Capuzano, G., Latorres, G. 2010).

En 2010, en la revista “Medicina & Laboratorio” de la Universidad de Colombia fue publicado un artículo sobre el manejo de pacientes diabéticos y su diagnóstico por medio de la HbA1c. El estudio “La HbA1c en el diagnóstico y en el manejo de las diabetes” dio a conocer algunos factores que interfieren con la medición de dicha hemoglobina, entre ellos puede ser: las hemorragias agudas, hemólisis, anemias y transfusiones sanguíneas, lo que hace que disminuya dicha hemoglobina debido a la corta supervivencia de los eritrocitos; mientras que el aumento es causado por la larga vida media del eritrocitos que puede suceder cuando hay eritropoyesis disminuida, hemoglobinas anormales S y C en donde no hay cadena beta y en otras, como la hemoglobina Raleigh que puede interferir con la glicación dando como resultado valores inferiores; por lo que en un cromatograma por medio de cromatografía de alta resolución (HPLC) permite la identificación de hemoglobinas anormales así como la HbA1c sin ser alterada (Campuzano, G., Latorre, G, 2010). Ese mismo año, la revista “Journal of Tropical Medicine”, publicó un estudio de hemoglobinas anormales en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, analizando 2,965 pacientes a los cuales se les tipificó la hemoglobina y se les midió la HbA1C por metodología HPLC, revelando así un 2% (53 pacientes) de pacientes con hemoglobinas anormales (HbF 98% y HbS 2%) y que presentaban una HbA1c entre 7.02% – 7.52% relativamente alta a los valores que según la IFCC presenta como normales, los cuales deben de ser <5.5% aproximadamente; este estudio sugiere que a todo aquel paciente que presenta un valor de HbA1c anormal se le investigue para alguna hemoglobina anormal ya que son hematológicamente y clínicamente silenciosas (Chandrasena, L., Peiris, H., Williams, S., Siribaddana, S. 2010).

En 2013 el “Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences” publicó un estudio en el que analizaron 11,904 pacientes con el fin de determinar el porcentaje de hemoglobinas anormales durante la monitorización de la HbA1c. El resultado fue que el 2.3% de pacientes presentó alguna hemoglobina anormal, de los cuales 10.3% presentaron variaciones de la HbS, 89% otras variaciones que no son de las hemoglobinas S y C y 0.7% la combinación de HbS con otras hemoglobinas anormales.

Estos resultados reflejan que se debe tener un control estricto en la medición de HbA1c, ya que si los valores de la misma no tienen correlación con la clínica del paciente o si son >15%, se debe sospechar de algún tipo de hemoglobina anormal. Por lo anterior, la “Academia Nacional de Bioquímica Clínica” (NACB por sus siglas en inglés) de la academia de la “Asociación Americana de Química Clínica” (AACC por sus siglas en inglés), en sus guías del 2002, recomienda que todo laboratorio clínico debe reportar la presencia de las hemoglobinas anormales cuando estas se detectan durante el análisis de HbA1c (Nureslyna, I., Sabariah, M., Lim, C., Syanfiqah, W., Chem, D., Choy, S. & Ashikin, O. 2013).

Un año más tarde “Libyan Journal of Medicine” publicó un estudio en el que se incluyeron 9,792 paciente diabéticos que consultaron o bien que permanecían en el Hospital Charles Nicolle, en Túnez; a quienes se les realizaron las mediciones de Hb1Ac por cromatografía líquida de intercambio catiónico de alta presión (HPLC), el cual mide niveles la hemoglobina glicosilada y niveles alterados de otras hemoglobinas), obteniendo así un 2.30% de pacientes con hemoglobina anormal, de las cuales se identificaron 191 casos con hemoglobina S heterocigoto, 27 casos con hemoglobina C heterocigota, obteniendo una prevalencia de 2.05% del rasgo de HbS; mostrando así una alta prevalencia de hemoglobinas anormales en pacientes diabéticos lo cual es, con frecuencia, un hallazgo fortuito cuando se analiza la HbA1c por lo que es una población que posee silenciosamente estas anormalidades y por ello es importante diagnosticarlas con precisión y exactitud, por medio de métodos correctos como el HPLC (Bouزيد, K., Ahmed, H., Eya, K., Blibeche, S., Nathalie, C., Khiari, K., et al. 2014).

D. Detección de hemoglobinas anormales

Se han utilizado numerosos procedimientos para identificar y caracterizar las hemoglobinas normal y anormal. Tradicionalmente estos métodos han incluido electroforesis (siendo este el estándar de oro), isoelectroenfoque y macrocromatografía. Desde hace algunos años, se ha venido aplicando la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en el estudio de las hemoglobinas anormales y de la diabetes mellitus. Las ventajas de la HPLC incluyen la sensibilidad, especificidad y velocidad relativamente altas del análisis; por lo que podría ser el nuevo estándar de oro por sus altas ventajas.

1. Electroforesis

La electroforesis es un método de laboratorio que se utiliza con la finalidad de separar biomoléculas, según su tamaño y carga eléctrica, por medio de una matriz gelatinosa (Fuentes, Castiñeiras, & Queralto, 1998), el proceso comienza cuando una mezcla de moléculas ionizadas con carga neta, son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas, las cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y las cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo) (Jan, 2004). Por lo general, para la identificación de hemoglobinas anormales y talasemias se utilizan gel de agarosa en medios alcalino o ácidos, en donde se observan patrones de migración o de elución electroforética y se pueden identificar con mayor frecuencia variaciones de la HbS, HbC y HbE (Chopin, M. 2012).

La electroforesis de hemoglobina es un examen en el que se miden los distintos tipos de hemoglobina en la sangre. Este método se basa en la separación de las hemoglobinas de acuerdo con su movilidad en un campo eléctrico; requiere mucho tiempo y buena preparación de la muestra. En la electroforesis alcalina las

hemoglobinas S, D y G migran juntas; por tanto, hay que realizar una electroforesis ácida para separar la HbS de la D y de la G. Esta técnica, a pesar que se introdujo hace unos cuarenta años, no es sensible a la carga del residuo mutado; sin embargo, la molécula de la hemoglobina interactúa con la agarpectina contenida en el gel, lo que hace que se pueda distinguir la HbS de las otras variantes (Nelson & Cox, 2007) (Wajcman, H., Moradkhani, K. 2011).

La determinación de hemoglobinas anormales por electroforesis se realiza por medio de preparados hemolizados de sangre periférica, utilizando gel de acetato de celulosa y un buffer alcalino (pH 8.6 a 9.2) y se espera que migre, durante aproximadamente 30 minutos, de 250 a 300 voltios. Después de revelar y decolorar la tira, por último, se incuba por 10 minutos a una temperatura entre 60 a 100 grados Celsius para observar las movilizaciones de las hemoglobinas en el gel (Bustamante, García, & Martínez, 2002).

En 2010, “The Journal of Haematology” publicó que para la elección de equipo y método se debe de tomar en cuenta el volumen de carga de trabajo, tipo de muestra (Ej, sangre líquida o seca), facilidad de manejo, reproducibilidad, disponibilidad, experiencia y costo. Aunque los consumibles para electroforesis sean de bajo costo, los costos laborales son relativamente altos, por lo tanto en la actualidad se han manejado con mayor facilidad los sistemas automatizados como el HPLC y en donde sus costos son neutrales y la cantidad de muestras para analizar pueden ser mayor (Ryan, K., Bain, B., Worthington, D., James, J., Plews, D., Mason, A., et al. 2010).

2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Es un proceso analítico especialmente diseñado para separar, cuantificar y analizar los componentes de una mezcla química completamente automatizado. Esta técnica es ampliamente utilizada para análisis cualitativo y cuantitativo, que frente a otros métodos analíticos clásicos presenta una alta especificidad, permitiendo el análisis de muestras complejas. Asimismo, en 2012 la IFCC en su mesa redonda sobre “Herramientas diagnósticas para hemoglobinopatías” estableció que la técnica por HPLC es una herramienta excelente y específicamente diseñado para el estudio de hemoglobinas, por su sencillez, rapidez y especificidad (Ibarra, B, 2012) (Rouge, P., Hardmeier, I., López, E., Lagomarsino, A., 2002).

Para la medición de la hemoglobina por medio de HPLC existen varios equipos; los cuales se han utilizado en varios países de Latinoamérica, especialmente en hospitales y clínicas del Sistema Nacional Público de Salud de cada país, ya que además de la determinación de la HbA1c, poseen la capacidad de detectar HbS, HbC, HbF, HbE, entre otras (Rodríguez, W.E., Villalobos, J., Salas, P., Hong, L., Chui, David;2012). Sin embargo, la mayor ventaja que tiene el HPLC es lograr una medición de HbA1c sin interferencia de hemoglobinas anormales; ya que lleva a cabo una dilución de la muestra, inyectándola en la columna de resina de análisis, por lo que por medio de un gradiente de tampones programado de fuerza iónica, las hemoglobinas se separan en función de sus interacciones iónicas con el material de la columna, para luego atravesar la célula de flujo del fotómetro donde se mide por espectrofotometría mediante un sistema de doble longitud de onda (415 nm y 690 nm), donde toda la información de absorbancias son procesadas por una computadora usando un programa analítico específico para hemoglobinas; asimismo, este equipo está compuesto en dos programas distintos: el programa corto el cual dura 3 minutos y permite determinar los porcentaje de área de HbA1c; y el programa extendido el cual dura 6.5 minutos y permite determinar el porcentaje de hemoglobina fetal, A₂, y A1c, así como

determinar lo porcentajes de hemoglobinas S, E, C y D (Bio-Rad,2005) (Roa, Aguinaga, Ruiz, Ulloa & Turner, 1997).

E. Estudios de hemoglobinas anormales por medio de la metodología de HPLC

En 2008, en la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia; se realizó una investigación en la que se compararon las técnicas de HPLC y la electroforesis de catequinas extraídas de plantas, generando un debate sobre las ventajas, desventajas y las diferencias en cuanto a mecanismos de separación de los analitos y costos, por lo que se demuestra que la electroforesis resulta más ventajosa en términos de costos. Sin embargo, el método demostró que el HPLC es más sensible permitiendo detectar concentraciones de hasta 0.05ug/mL y útil para análisis de tipo cuantitativo; mientras que la electroforesis resulta útil para análisis preliminares o cualitativos, debido a los tiempos y sus límites de detección entre 0.1 - 0.5 ug/mL. De igual manera se tomaron en cuenta algunos criterios cromatográficos como son: el poder analizar gran variedad de moléculas, analizar moléculas con alto peso molecular y su termolabilidad; los cuales permitieron establecer, en general, que por HPLC se alcanza mayor resolución, debido a la posibilidad de variar la composición de la fase móvil durante los análisis y tener menos dependencia con la matriz de origen (Cala & Vásquez, 2008).

En 2009, la revista costarricense del “Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos” publicó un estudio comparativo de la electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa y el HPLC para la detección de hemoglobina S y C. En el estudio participaron 10,800 pacientes, de los cuales 100 presentaban hemoglobinas anormales; entre ellos 65% del género femenino y 35% masculino, entre las edades comprendidas de 18 a 75 años. Los resultados fueron porcentajes dentro 35-45% de HbS, 50-60% de HbA y hemoglobina fetal (HbF) superior al 2%. Asimismo, las 100 muestras fueron enviadas al Laboratorio de Referencia CIHATA para realizar la prueba de electroforesis

de hemoglobina convencional, revelando así que 100% de las muestras poseían el mismo patrón de hemoglobina que preliminarmente se obtuvo con el equipo utilizado de HPLC (Vega, Martínez, Ascencio & Aguilar, 2009).

En 2013, en el “Hospital Materno Infantil Dr. José María Vargas” de Venezuela, se analizaron 507 muestras de sangre de cordón umbilical para la detección de hemoglobinas anormales en recién nacidos. De las muestras analizadas 1.97% presentaron HbS (10 pacientes) y un 0.2% presentó HbC (1 paciente) por electroforesis, los cuales fueron confirmados por HPLC obteniendo un resultado igual. El estudio demostró la importancia de plantear la creación de un programa regional para el tamizaje neonatal de hemoglobinas anormales y que el HPLC sea un método válido para el tamizaje, ya que reúne las ventajas como son: rapidez, simplicidad, accesibilidad y fiabilidad (Varela, I., Sequera, A., Olivero, R. 2013).

Por otra parte, en el artículo “La electroforesis capilar en el estudio de las hemoglobinopatías y talasemias”, publicado en 2014, se definen algunas ventajas de HPLC en comparación con la Electroforesis en gel; entre las que se mencionan que el HPLC permite realizar la identificación de variantes de hemoglobina con mayor proporción, ya que utiliza volúmenes pequeños permitiendo cuantificar e identificar hemoglobinas anormales, así como disminuir errores analíticos ya que es un sistema automatizado; mientras que la electroforesis es relativamente laboriosa ya que requiere preparación manual, permitiendo así solamente la separación de hemoglobinas importantes, con la dificultad de tener que visualizar las bandas mediante la tinción del gel y la medición de la concentración de las fracciones individuales por densitometría; por lo que debido a la baja precisión y exactitud de las hemoglobinas en bajas concentraciones, el Colegio Americano de Patólogos (CAP) ya no recomienda el uso de la exploración densitométrica para la cuantificación de HbA₂ (Saénz & Sorroche, 2014).

IV. Justificación

Las hemoglobinas anormales representan un problema a nivel mundial, especialmente en regiones tropicales, cuya población es muy heterogénea debido a las altas migraciones ocurridas durante años, por lo que en 2005 fueron declaradas “Problema de salud pública” por la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud (OMS/OPS). En 2010, dada la alta morbimortalidad de este desorden genético, dichas organizaciones recomendaron fortalecer el acceso a los servicios de salud, vigilancia e investigaciones para fomentar la comunicación a personas portadoras del gen y realizar sistemáticamente pruebas de detección (OMS, 2010).

Este estudio pretende determinar la presencia de hemoglobinas anormales en una población que padece de diabetes, a la cual se le ha solicitado realizarse el examen de hemoglobina glicosilada y que asiste a la consulta externa del Hospital General San Juan de Dios (HGSD). La importancia de realizar el estudio en la población diabética es que diversas investigaciones revelan que la presencia de hemoglobinas anormales (HbS y HbC) forman parte de los hallazgos durante la medición de la HbA_{1c}, pues interfieren en la medición de esta hemoglobina. Por lo anterior, la “Asociación Americana de Diabetes” (ADA por sus siglas en inglés) recomienda tener un control estricto durante su medición utilizando métodos certificados por el “Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina” (NGSP por sus siglas en inglés).

Por medio de la utilización de equipo de alta tecnología certificado por el NGSP el cual mide la hemoglobina glicosilada y la presencia de anomalías de la hemoglobina, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y el uso de un segundo método con diferente principio como la Electroforesis de Acetato de Celulosa; se determinó la frecuencia de hemoglobinas anormales en la población que padece diabetes, así como la presencia de otro tipo de alteración hematológica presente en los pacientes estudiados.

V. Objetivos

Objetivo General

Determinar la presencia de hemoglobinas anormales a pacientes diabéticos que asisten a la consulta externa de adultos de un hospital público urbano.

Objetivo Específicos

- Identificar en la muestra estudiada la frecuencia en la que se presentan las hemoglobinas anormales.
- Establecer si existen parámetros hematológicos eritrocitarios anormales en pacientes con hemoglobinas anormales.

VI. Materiales y Métodos

A. Universo de trabajo

1. Universo

Pacientes diabéticos que asistieron al servicio de consulta externa de adultos del Hospital General San Juan de Dios (HGSJD) que presentaron una orden médica del examen de hemoglobina glicosilada (HbA1c), a los cuales se les investigo la presencia de alguna hemoglobina anormal.

2. Muestra

Se tomó una muestra de 723 pacientes diabéticos los cuales fueron aceptados según el criterio de inclusión y con un nivel de confianza del 95%.

B. Materiales

1. Recursos Humanos

- a.** Investigadores: Dwight Sidney Smith y Neidy Deydania Oliva.
- b.** Asesor: Licda. Eva Montoya
- c.** Coasesor: Lic. Antonio Galindo
Lic. Manuel Díaz

2. Recursos Materiales

a. Instrumentos

- Consentimiento informado (Anexo 1).

b. Equipo

- Equipo analizador de hemoglobina glicosilada Program BIO-RAD D10.
- Equipo de Hematología Cell Dyn Ruby.

c. Instituciones

- Instalaciones del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.
- Laboratorio de referencia. “Inmunología” de la ciudad de Guatemala.

C. Procedimiento

1. Selección de la muestra en el Hospital General San Juan de Dios de Guatemala.

a. Criterios de inclusión para el grupo de pacientes:

Se aceptaron todos aquellos pacientes de edad comprendida entre 18 a 80 años, de ambos sexos, de diversas etnias, que provenían del área metropolitana y del interior del país; y que, asistieron a la consulta externa del Hospital General San Juan de Dios, con una orden médica para hemoglobina glicosilada.

2. Consentimiento

Se explicó al paciente sobre el estudio realizado y se le invitó a participar en el mismo. A los pacientes que aceptaron participar, se le explicó en qué consistía su participación y se obtuvo el consentimiento informado correspondiente (Anexo1). Esto se aplicó a todos los pacientes que asisten a la consulta externa del Hospital General San Juan de Dios y que llevaban una orden médica de hemoglobina glicosilada.

3. Extracción de sangre venosa

Se utilizó el equipo de bioseguridad correspondiente, se le explicó al paciente el procedimiento que se le iba a realizar. Como primer paso se colocó el torniquete en el brazo, se indicó al paciente que empuñara su mano y se ubicó el lugar de punción; se limpió la zona con alcohol al 70% de forma circular y se punccionó esperando que el tubo con EDTA llenara su vacío. Una vez recogido el volumen, se retiró el tubo, la liga y la aguja; se colocó un algodón en el lugar de la punción y se pidió al paciente que ejerciera una leve presión. Todo el material infectocontagioso se descartó en bolsa roja y en el recipiente de punzo-cortantes según correspondiera.

D. Metodología

1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Luego de extraídas las muestras de sangre (en tubo con anticoagulante - EDTA), se procesaron inmediatamente en el analizador D-10 Program el cual se basa en la separación cromatografía de los analitos mediante principios de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por intercambio iónico.

Luego de transcurridos tres minutos el equipo generó un cromatograma, así como los porcentajes de hemoglobina fetal, A lábil, A1c y; si fuera el caso, la(s) hemoglobina(s) S o C. En el anexo 3 se representa un resultado de un paciente con presencia de hemoglobina S y en el anexo 4 la tabla de interpretación del cromatograma.

2. Analizador Hematológico

A todos los pacientes que presentaron alguna hemoglobina anormal, se les realizó un hemograma por medio del contador hematológico Cell Dyn Ruby; para evaluar tres parámetros hematológicos que fueron: recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito.

3. Frote Periférico

A todos los pacientes que presentaron alguna hemoglobina anormal, se les realizó dos frotos periféricos los cuales se tiñeron por medio de la tinción de Wright y se observaron en busca de morfología eritrocitaria anormal.

E. Verificación por una segunda metodología

Todos los pacientes que presentaron alguna hemoglobina anormal, las muestras fueron enviadas a un laboratorio de referencia para realizarles una segunda prueba de diferente principio, como la electroforesis en acetato de celulosa, a fin de comparar los resultados.

Los resultados enviados por el laboratorio de referencia constaban de un histograma, porcentajes de las fracciones de hemoglobinas encontradas y una breve interpretación del resultado (anexos 5 y 6).

F. Diseño estadístico

Se obtuvo una muestra representativa de 723 pacientes diabéticos que presentaron el criterio de inclusión, de los cuales se obtuvieron los resultados de hemoglobinas anormales. Este estudio utilizó un nivel de confianza del 95%.

G. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron técnicas de estadística descriptiva e inferencial para la cual se usó una base de datos de EpiInfo 7 y Microsoft Excel.

VII. Resultados

Se analizaron 723 muestras de pacientes diabéticos entre 18 y 80 años, que asistieron a la consulta externa del Hospital General San Juan de Dios (HGSJD), a quienes se les realizó la medición de hemoglobina glicosilada y la detección de hemoglobinas anormales.

La mayoría de pacientes (98.5%) son guatemaltecos y 1.5% centroamericanos de El Salvador, Honduras y Nicaragua. Entre los guatemaltecos, la distribución por departamento fue de: Guatemala, 48.3%; Jutiapa, 6.6%; Santa Rosa, 5.7%; El Progreso, 5.3%; San Marcos, 4.4%; Escuintla, 3.9%; Jalapa, 3.7%; Quetzaltenango, 2.9%; Zacapa, 2.4%, Chimaltenango, 2.5%; Suchitepéquez, 2.2%; Huehuetenango, 1.9%; Totonicapán, 1.7%; Izabal y Baja Verapaz, 1.4%; Quiché, 1.1%; Chiquimula, 1.0%; Alta Verapaz y Retalhuleu 0.8%; Sololá, 0.3% y Sacatepéquez 0.1% (Tabla 1).

La muestra constó de 81.2% de mujeres y 18.8% de hombres (Tabla 2), y con respecto a la edad se encontró que el rango de 36 a 59 años presentó una frecuencia de 52.4%, de los cuales el género femenino (83.9%) fue más frecuente que el masculino (16.1%); seguidamente los mayores de 60 años presentaron una frecuencia de 43.3% igualmente siendo más frecuente el género femenino (78.6%) y, finalmente, el rango de 18 a 25 años con una frecuencia del 4.3% (Tabla 3).

Tabla 1. Distribución de muestras por lugar de origen y género

Lugar de Nacimiento	Masculino	Femenino	Total	Porcentaje (%)
Alta Verapaz	2	4	6	0.8
Baja Verapaz	2	8	10	1.4
Chimaltenango	2	17	19	2.6
Chiquimula	3	4	7	1.0
El Progreso	6	32	38	5.3
El Salvador	0	6	6	0.8
Escuintla	5	23	28	3.9
Guatemala	79	270	349	48.3
Honduras	1	1	2	0.3
Huehuetenango	1	13	14	1.9
Izabal	4	6	10	1.4
Jalapa	6	21	27	3.7
Jutiapa	5	43	48	6.6
Nicaragua	0	3	3	0.4
Quetzaltenango	4	17	21	2.9
Quiché	0	8	8	1.1
Retalhuleu	0	6	6	0.8
Sacatepéquez	0	1	1	0.1
San Marcos	3	29	32	4.4
Santa Rosa	6	35	41	5.7
Sololá	0	2	2	0.3
Suchitepéquez	4	12	16	2.2
Totonicapán	1	11	12	1.7
Zacapa	2	15	17	2.4
TOTAL	136	587	723	100.0

Fuente: Datos experimentales

Tabla 2. Distribución por género

Género	Frecuencia	Porcentaje (%)
Masculino	136	18.8
Femenino	587	81.2
TOTAL	723	100.0

Fuente: Datos experimentales

Tabla 3. Distribución por edad según el género en pacientes diabéticos

Edad* (años) / género	Masculino	Femenino	Total	Estructura** (%)
18 - 35	8	23	31	4.3
36 a 59	61	318	379	52.4
Mayores de 60	67	246	313	43.3
TOTAL	136	587	723	100.0

Fuente: Datos experimentales

*Clasificación etaria según OMS (adultos jóvenes, adultos y adultos de tercera edad)

**Estructura: corresponde a la participación de la frecuencia por edad dentro del total de la muestra

Al evaluar por etnia se encontró que 87.3% fueron ladinos, 12.7% no ladinos y no hubo pacientes de la etnia garífuna. En las primeras dos etnias el género femenino fue el más frecuente: etnia ladina 80.0 % y no ladina, 89.1% (Tabla 4.)

Tabla 4. Distribución por etnia de hombres y mujeres en pacientes diabéticos

Etnia/género	Hombre	Mujeres	Total	Estructura* (%)
No Ladinos	10	82	92	12.7
Ladinos	126	505	631	87.3
Garífunas	0	0	0	0.0
TOTAL	136	587	723	100.0

Fuente: datos experimentales

*Estructura: corresponde a la participación de la etnia dentro del total de la muestra

De las 723 muestras de pacientes diabéticos entre 18 y 80 años que asistieron a la consulta externa del Hospital General San Juan de Dios (HGSJD) y a las que se les analizó la hemoglobina por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se encontraron nueve pacientes con hemoglobinas anormales (1.24%), de los cuales se identificaron ocho con hemoglobina S y uno con hemoglobina C. Todos los pacientes fueron del género femenino y de la etnia ladina; siete correspondieron al grupo etario entre 36 a 59 años y dos mayores de 60 años. El origen geográfico de los pacientes positivos por departamento fue: Guatemala, dos; Alta Verapaz, uno;

Escuintla, uno; Huehuetenango, uno; Izabal, uno; Jutiapa, uno; Retalhuleu, uno y El Salvador, uno. La paciente con hemoglobina C, fue ladina, de género femenino, adulta y perteneciente del departamento de Huehuetenango (Tabla5).

Tabla 5. Datos sociodemográficos de pacientes según tipo de hemoglobina anormal

	HbS	HbC	Total
Edad* (Años)			
18 - 35	0	0	0
36 a 59	6	1	7
Mayores de 60	2	0	2
Género			
Masculino	0	0	0
Femenino	8	1	9
Etnia			
Ladinos	8	1	9
No Ladinos	0	0	0
Garífuna	0	0	0
Departamento de Nacimiento			
Alta Verapaz	1	0	1
San Salvador, El Salvador	1	0	1
Escuintla	1	0	1
Guatemala	2	0	2
Huehuetenango	0	1	1
Izabal	1	0	1
Jutiapa	1	0	1
Retalhuleu	1	0	1
Total	8	1	9

Fuente: datos experimentales obtenidos en el

*Clasificación etaria según OMS (adultos jóvenes, adultos y adultos de tercera edad)

HbS: hemoglobina S, HbC: hemoglobina

Se evaluaron tres parámetros hematológicos en las muestras de pacientes que presentaron hemoglobinas anormales: recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito. Ninguno de los nueve pacientes presentó parámetros fuera del valor de referencia ni anomalías microscópicas al examen de frote periférico (Tabla 6).

Tabla 6 Parámetros hematológicos en pacientes con hemoglobinas anormales

	Recuento de glóbulos rojos (4.0-6.13x10 ⁶ /mm ³)*	Hemoglobina (12.0 -18.10g/dL)*	Hematocrito (37.7-53.7%)*	Frote periférico
1	4.0	11.5	35.2	SD
2	4.5	11.5	37.6	SD
3	5.1	12.4	41.8	SD
4	4.3	13.6	40.4	SD
5	4.3	12.9	36.0	SD
6	5.5	17.1	51.9	SD
7	4.8	14.2	43.0	SD
8	5.2	14.7	46.4	SD
9	4.8	13.0	40.0	SD

Fuente: datos experimentales.

SD: Sin anomalías diagnósticas

*Valores de referencia del Hospital General San Juan de Dios

Todas las muestras de los pacientes con presencia de hemoglobinas anormales, que fueron medidas con el método de HLPC, fueron enviadas a un laboratorio de referencia para realizarles una segunda medición por, electroforesis en acetato de celulosa. Los resultados con el primer método identificaron ocho pacientes con presencia de hemoglobina S y uno con hemoglobina C; mientras que, con el segundo método se reportaron los nueve pacientes con hemoglobina S (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación entre HPLC y Electroforesis en acetato de celulosa

	HPLC*	Electroforesis**
HbS	8	9
HbC	1	0
Total	9 (1.24%)	9 (1.24%)

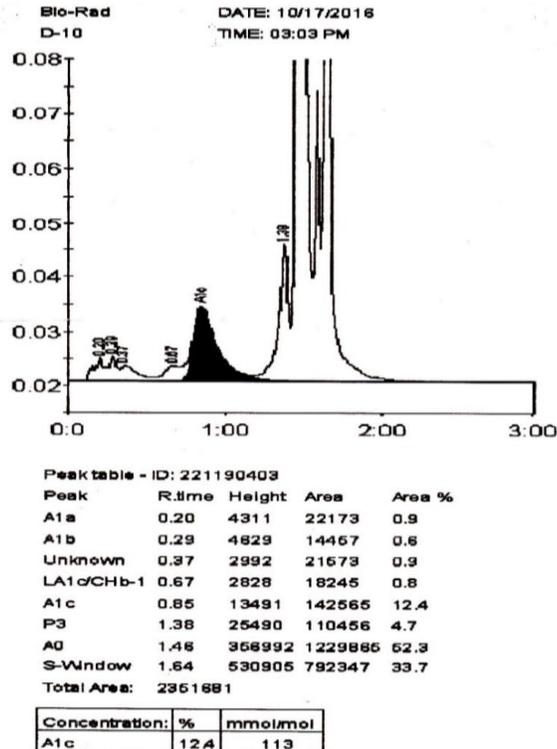
*Fuente: datos experimentales

**Fuente: datos obtenidos del laboratorio de referencia

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, HbS: hemoglobina S, HbC: para hemoglobina

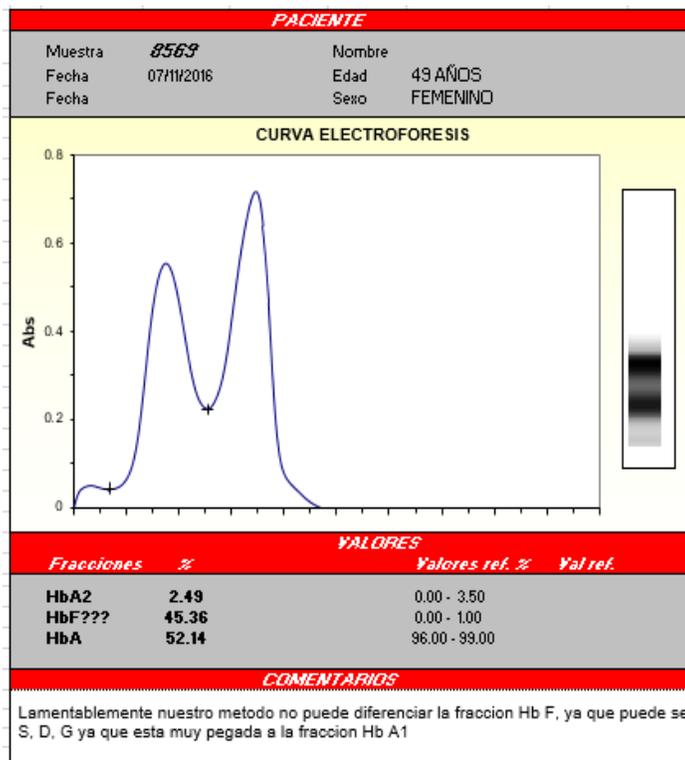
En la gráfica 1 se observa el reporte de hemoglobina glicosilada de un paciente por HPLC, en donde se observa la aparición de diferentes hemoglobinas dependiendo sus tiempos de retención y al final el reporte de la presencia de hemoglobina S expresada en porcentaje. En la gráfica 2 se observa el resultado de electroforesis del mismo paciente.

Gráfica 1 Resultado de cromatografía de paciente con presencia de hemoglobina S



Fuente: datos experimentales

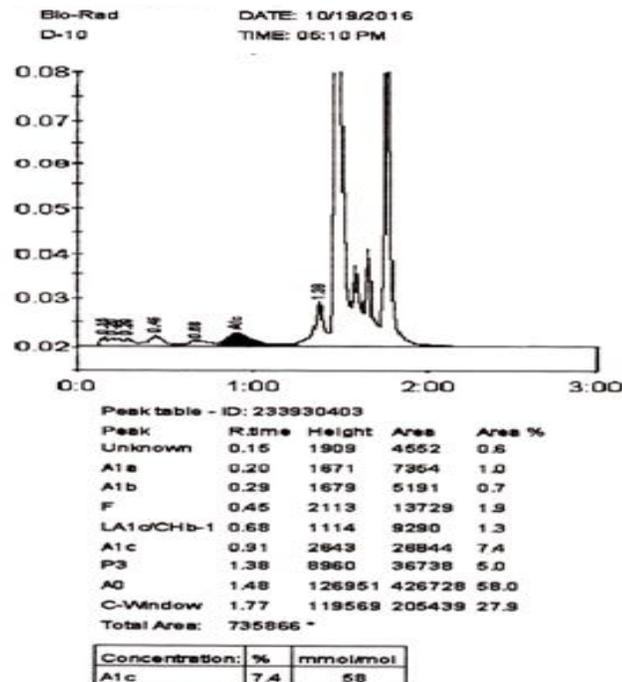
Gráfica 2 Resultado de Electroforesis de paciente con presencia de hemoglobina S, D o G.



Fuente: datos obtenidos del laboratorio de referencia

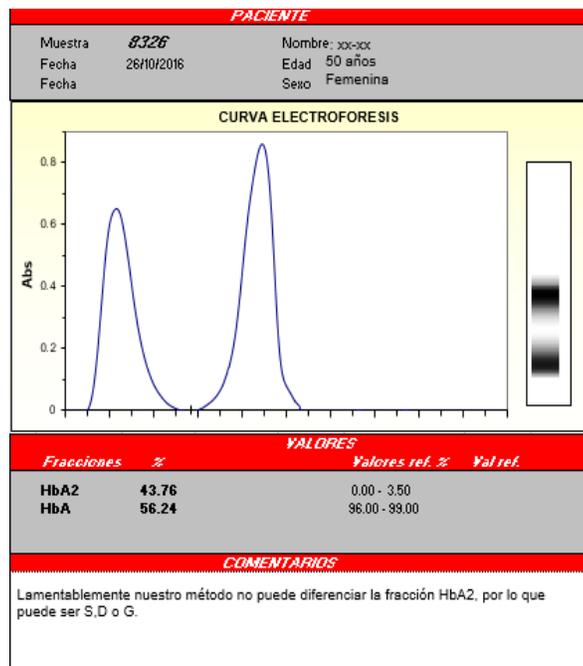
En la gráfica 3 se observa el resultado del paciente con hemoglobina C medida por cromatografía y en la gráfica 4 se observa la medición por electroforesis del mismo paciente, la cual es reportada como hemoglobina S, D o G.

Gráfica 3 Resultados de Cromatografía del paciente con presencia de hemoglobina C.



Fuente: datos experimentales

Gráfica 4 Resultado de Electroforesis del paciente con presencia de hemoglobina S, D o G y Cromatografía con hemoglobina C.



Fuente: datos obtenidos del laboratorio de referencia

VIII. Discusión

Se analizaron 723 muestras de pacientes diabéticos, provenientes de distintos departamentos de Guatemala, con el propósito de investigar la presencia de hemoglobinas anormales. Los departamentos con mayor frecuencia de pacientes atendidos fueron Guatemala, con 48.3%; Jutiapa con 6.6%, Santa Rosa con 5.7%, El Progreso con 5.3%, San Marcos con 4.4% y Escuintla con 3.9% (tabla 1). Es de señalar que 1.5% de los pacientes era de origen de otros países centroamericanos. El grupo etario que presentó mayor frecuencia fue el rango entre 36 y 59 años con 52.4%, seguido de los de mayor de 60 años con 43.3% y el rango de 18 y 35 años con 4.3% (tabla 3).

La etnia ladina fue la más predominante con 87.3% de la población evaluada y la etnia no ladina con 12.7%, no habiendo ningún paciente de la etnia garífuna (tabla 4). De igual manera el género con mayor predominio fue el femenino con 81.2% y el masculino con un 18.8% de frecuencia (tabla 2).

Respecto a los datos sociodemográficos anteriormente descritos se logra visualizar que la población atendida en consulta externa del Hospital General San Juan de Dios (HGSJD) es mayormente adulta, de etnia ladina, de género femenino y provenientes de diversas regiones geográficas especialmente de la región metropolitana.

Antes del siglo XVI se creía que las anormalidades de las hemoglobinas eran exclusivas de raza negra; sin embargo, debido a las altas migraciones forzadas a partir de este siglo, se han tenido poblaciones más diversas. Por lo tanto, varios estudios con investigaciones al respecto en países de América Latina, han demostrado que en la raza ladina (mestiza) existe presencia de hemoglobinas anormales: en Brasil entre 4.8% y 16%, Ecuador 24.3%, Panamá 16%, en Costa Rica entre 1.26% y 4.43%, Honduras con 18% y El Salvador con 1.65% (Saénz, G., Altafulla, M., Sancho, M., 1988) (Zúñiga, C.

1999). Por otra parte, en Guatemala ha reportado una frecuencia entre 17% y 18% en poblaciones de raza negra (Saénz, G., Altafulla, M., Sancho, M., 1988).

A pesar de ser un trastorno que es más frecuente en poblaciones de raza negra (aproximadamente 2% de personas homocigotas y entre 10% y 40% heterocigotas según OMS, 2015), en el presente estudio que atendió a personas de diferentes regiones de Guatemala y en el que hubo predominio de etnia ladina (87.3%), se encontró 1.24% de pacientes portadores del gen (heterocigotos).

Las muestras del estudio se analizaron mediante el método HPLC, obteniendo a nueve pacientes del género femenino y de etnia ladina que presentaron alguna hemoglobina anormal, de las cuales ocho de ellas presentaron hemoglobina S (HbS) y una hemoglobina C (HbC), representando 1.1% HbS y 0.1% HbC. Por otro lado, se observó que los nueve pacientes provenían de diferentes departamentos de Guatemala, incluyendo uno de El Salvador, logrando observar así una población bastante heterogénea dentro del estudio realizado, lo que permite visualizar que dentro de la etnia ladina hay casos de personas que presentan alguna de las hemoglobinas variantes, sin descartar que ello también ocurra en las otras etnias (tabla 5).

A las muestras de los nueve pacientes con hemoglobinas anormales se les realizó un hemograma, evaluando parámetros hematológicos como el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito. En la tabla 6 se observa que dos pacientes presentaron 11.5g/dL de hemoglobina (12.0 – 18.1 g/dL), y uno de los dos pacientes presentó 35.2% de hematocrito (37.7 -53.7%); sin embargo, el recuento de glóbulos rojos se encontró dentro de los límites normales.

En algunas ocasiones se pueden obtener valores ligeramente por debajo del nivel de hemoglobina sin tener ningún otro parámetro hematológico anormal, lo que no significa necesariamente presencia de enfermedad, ya que algunas personas se adaptan, en atención a una altitud geográfica baja, a un valor ligeramente bajo de hemoglobina. Asimismo, existen ligeras variaciones en la medición de hemoglobina, ya que los equipos automatizados calculan el promedio de cinco mediciones realizadas. Otras razones por la cual dichos valores puedan estar disminuidos podrían ser por una hemodilución, crioaglutininas y por ingesta de algunos medicamentos como las aminas aromáticas. Por otro lado, el valor de hematocrito dependerá del recuento, la forma y el tamaño eritrocitario, el cual no se puede interpretar por si solo ya que una anemia se define como la disminución de más del 10% de los valores normales del recuento eritrocitario, la hemoglobina y el hematocrito (Rodack, 2005).

Adicionalmente, para un mejor diagnóstico de anemia se recomienda: la evaluación de los índices eritrocitarios, la realización de un frote periférico y conocer la historia clínica del paciente. En consecuencia, a todos los pacientes del estudio se les realizó un frote periférico y ninguno presentó anomalía eritrocitaria. Por lo que, tomando en consideración los aspectos indicados, se considera que los dos pacientes, quienes viven en ciudades con baja altitud (Escuintla, 347 metros sobre el nivel del mar; y Puerto Barrios, 638 metros sobre el nivel del mar) no presentan anemia. (Gómez, C., Gómez M. & Gómez P, 2014).

Se debe tener en cuenta que en el frote periférico de un paciente homocigoto con hemoglobina S se observan células falciformes (drepanocitos) irreversibles y los parámetros hematológicos (recuento de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito) se encuentran disminuidos. Por otro lado, los drepanocitos también pueden deberse a situaciones de hipoxia tisular; sin embargo, en este estado se estimula la producción de eritropoyetina, generando gran cantidad de eritrocitos y un aumento de hemoglobina, permitiendo normalizar, así, la capacidad de transporte de oxígeno. En esta situación,

los drepanocitos son reversibles, como consecuencia de la hipoxia y no de una alteración genética (Svarch, E. 2009) (Torres, Y., Montoya, A. & Hicks, J, 2009).

Para la observación de células falciformes, existe la prueba de inducción a drepanocitos, la cual evalúa la susceptibilidad del eritrocito de degenerar a drepanocito y es utilizada como prueba de escrutinio. Sin embargo, a pesar de que es una prueba sencilla de realizar, tiene un alto porcentaje de falsos negativos y además puede dar falsos positivos puestos que otras hemoglobinas como las C-Harlem o C-Georgetown dan positiva la inducción. Por esto, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) no la recomienda como prueba para determinar la enfermedad o el rasgo de células falciforme y, en consecuencia, recomienda utilizar métodos como la electroforesis, HPLC o una prueba de ADN (CDC, 2015). En lo particular, en este estudio, la prueba no fue útil, ya que se utilizó un método confirmatorio que indicó el tipo de hemoglobina anormal, por lo que su utilización hubiera sido en vano. Sin embargo, en laboratorios particulares, nacionales o públicos que no tengan acceso a los métodos recomendados por la CDC, puede ser útil como prueba de tamizaje.

Dado que la formación de drepanocitos también puede ocurrir por presencia de hipoxia, por medio de un oxímetro de pulso es posible evaluar el estado del paciente, ya que el equipo permite estimar la saturación de oxígeno (SpO_2) de la hemoglobina arterial. Sin embargo, existe una serie de factores que afectan su medición, tales como: el movimiento, la pigmentación de la piel, arritmias, ictericia, anemias y variantes de hemoglobina como: carboxihemoglobina, metahemoglobina, hemoglobinas S y entre otras. En el caso de las anemias y variantes de hemoglobina, la saturación de oxígeno puede ser normal a pesar de que existe insuficiente hemoglobina para el transporte de oxígeno al tejido; esto debido a que el aporte y la entrega de oxígeno dependen no sólo del porcentaje de la saturación de oxígeno si no, también del oxígeno disuelto en la sangre (PaO_2). Por lo tanto, esta prueba podría ayudar a orientar en el estado de hipoxia del paciente, pero no ayudaría en el diagnóstico definitivo de las hemoglobinas

anormales (Rojas. E, 2006) (Verhovsek, M., Henderson, M., Cox, G. & Steinber, M, 2010) (Zur, B., Bagci, S., Ludwing, M & Stoffel,B, 2012).

Con fines de comparación, las nueve muestras fueron enviadas a un laboratorio de referencia y fueron sujetas a una segunda metodología de diferente principio (electroforesis de hemoglobina) el cual reportó nueve pacientes con hemoglobinas anormales. Sin embargo, con el primer método se identificaron ocho pacientes con presencia de hemoglobina S y uno con hemoglobina C; mientras que, con el segundo método se identificaron nueve pacientes con hemoglobina S (tabla 7). La discrepancia en el resultado entre ambas metodologías es debida a que el método de electroforesis del laboratorio de referencia, al cual se llevaron las muestras a analizar, no permite diferenciar las distintas fracciones de hemoglobina. Cabe destacar que el método HPLC que hace uso de nueva tecnología automatizada y estandarizada, poseen una mayor sensibilidad que la electroforesis, permitiendo una mejor detección de las hemoglobinas anormales.

Con referencia a lo anterior, en la gráfica 1 se observa el resultado de la cromatografía de un paciente con presencia de hemoglobina S. En la gráfica 2 se observa el resultado de electroforesis del mismo paciente el cual, debido al método utilizado, no se puede diferenciar si existe la presencia de hemoglobina S, D o G ya que estas poseen una movilidad electroforética igual a la de la hemoglobina F.

En las gráficas 3, se observan la cromatografía del paciente con presencia de hemoglobina C y en la gráfica 4 la electroforesis del mismo paciente la cual es reportada como posible presencia de hemoglobina S, D o G. Sin embargo, al utilizar el método de electroforesis se sabe que la hemoglobina A₂ posee una movilidad electroforética igual a las hemoglobinas C, E u O. Por lo que, al utilizar esta metodología existe el riesgo de interpretar las fracciones de hemoglobina de una forma incorrecta confundiéndolas con presencia de talasemias, hemoglobina SC o, como fue en este caso con hemoglobinas S, D o G. También se tiene la dificultad de no poder

separar las diversas hemoglobinas ya que la mayoría poseen igual movilidad electroforética. Por ello mismo, en la actualidad el método de electroforesis está siendo desplazado por el HPLC, ya que este es muy útil cuantificando las hemoglobinas A₂, F, A1c, así como la identificación de hemoglobinas anormales; y, además, es rápido, exacto y reproducible (Cela, E. Beléndez, C. & Galarón, P. 2009).

Asimismo, el HPLC proporciona un porcentaje de hemoglobina anormal (gráfica 1 y 3), por medio del cual se logró identificar en este estudio que los nueve pacientes eran heterocigotos, quienes por presentar la afección en un alelo del gen de la hemoglobina, son asintomáticos y no presentan anomalía eritrocitaria; estos pacientes poseían un porcentaje de hemoglobina anormal entre 20 y 45%, y ya que el método indica que si el porcentaje de alguna hemoglobina anormal es mayor o igual a 60%, se sospecha de una variante homocigota, el cual si sufre la enfermedad y presentando anomalía eritrocitaria en el frote periférico (Bio-Rad, 2005) (Rodack, 2007).

Un estudio similar realizado en 2004 por la “Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva York y el Hospital Bellevue de Nueva York”, demostró que de las 60,293 muestras de sangre analizadas 34 tuvieron presencia de hemoglobinas anormales. Estas se analizaron por medio del HPLC y de electroforesis, logrando encontrar que existen hemoglobinas con movilidad electroforética similar a la HbC (dos hemoglobinas la HbF y HbJ) y similar a la HbS (6 hemoglobinas); y, por otro lado, este estudio también demostró que por medio de los tiempos de retención que el HPLC proporciona, se lograron diferenciar estas hemoglobinas, ya que cada una migra a diferente tiempo en la columna de resina del HPLC. Asimismo, el análisis de la fracción de la hemoglobina, por medio de este método tiene la ventaja de cuantificar la hemoglobina F, la hemoglobina A₂ y las hemoglobinas anormales (Joutovsky, A., Hadzi, J. & Nardi, M, 2004).

Igualmente, un estudio realizado en 2011 por el “Instituto de Hematología e Inmunología, la Habana, Cuba” demostró que, por medio de la cuantificación de la hemoglobina A₂ por medio de electroforesis, esta resulta ser inefectiva ya que no puede separar la hemoglobina A₂ de la hemoglobina C, así como encontrarse aumentada, por anemia perniciosa, hemoglobina SC, talasemias e incluso por trasplantes de médula ósea (Morales, M., Díaz, M. & Santana, H. 2012).

Por medio de éste y otros estudios citados con anterioridad, se logra observar que, con el paso de los años han surgido nuevas tecnologías con mayor sensibilidad sobre la electroforesis, lo cual les permite ser utilizadas como métodos de tamizaje por su alta reproducibilidad, rendimiento y rapidez en los resultados. Asimismo, se pueden combinar para funcionar como métodos de tamizaje y confirmatorios. Por ello mismo, en 2015, la Asociación de Laboratorios de Salud Pública de Estados Unidos (APHL por sus siglas en inglés) y el Centro de Control y Prevenciones de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), con el objeto de mejorar y fortalecer la detección de los trastornos de la hemoglobina, dieron a conocer que los métodos actuales de detección y diagnóstico para tales trastornos son: el enfoque isoelectrico (IEF), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y los métodos moleculares (CDC, 2016).

A pesar de obtener un resultado en el que solo una de nueve muestras no concordó por medio de los dos métodos, el Objetivo General de este estudio se logró debido a que tanto por el HPLC y por la electroforesis se detectó la presencia de hemoglobinas anormales en los nueve pacientes. Lo anterior permite sugerir que los hospitales y laboratorios de Guatemala, dispongan de un algoritmo para diagnóstico como el recomendado por el CDC (Anexo 7), para poder reportar con mayor confiabilidad los resultados de hemoglobinas anormales.

IX. Conclusiones

1. Existe presencia de hemoglobinas anormales entre los pacientes diabéticos que asistieron a la consulta externa de adultos del Hospital General San Juan de Dios.
2. La frecuencia de hemoglobinas anormales en la muestra estudiada fue de 1.24%, encontrándose únicamente presencia de hemoglobina S y C.
3. No se evidenció anormalidad en los parámetros hematológicos evaluados en los pacientes con hemoglobinas anormales.

X. Recomendaciones

1. Implementar el tamizaje de todas las muestras de hemoglobina glicosilada del laboratorio del Hospital General San Juan de Dios para la detección de hemoglobinas anormales.
2. Apoyar y fomentar la investigación para tener datos estadísticos que evidencien este tipo de anormalidades en nuestro país; y con ello efectuar la vigilancia adecuada recomendada por la OMS/OPS, para mejorar la calidad de vida de los afectados.
3. Para una caracterización y confirmación completa de hemoglobinas anormales se recomienda utilizar herramientas basadas en el estudio del ADN que hace posible identificar genotipos específicos de portadores, así como examinar los patrones de herencia familiar con varios genes.

XI. Referencias

- Alaiz, A. d. (2001). *Microalbuminuria & Hemoglobina Glicosilada*. Clínica Diabentológica., 1-15.
- Alvear, M. (1992). *Medicina interna* (2a. ed.). Buenos Aires: Panamericana.
- Abarca, G., Navarrete, M., Trejos, R., Céspedes, C., & Saborío, M. (2008). Hemoglobinas anormales en la población neonatal de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(3), 995-1001.
- Bio-Rad (2005). *Manual de instrucciones, Bio-Rad D10 dual program*. Estados Unidos de América.
- Bouزيد, K., Ahmed, H., Eya, K., Blibeche, S., Nathalie, C., Khiari, K., et al. (2014). Prevalence of hemoglobin variants in a diabetic population at high risk of hemoglobinopathies and optimization of HbA1c monitoring by incorporating HPLC in the laboratory workup. *Libyan Journal of Medicine*, 9:25768, 1-5.
- Brandan, N., Aguirre, M., V., Giménez, C., E. (2008). *Hemoglobina*. Facultad de medicina UNNE, cátedra de bioquímica.
- Bustamante, Z., García, R., & Martínez, G. (2002). *Genética, Características de la Hemoglobina S, Anemia Falciforme y Haplotipos*. Facultad de Bioquímica y Farmacia – UMSS.
- Cala, M. P., Vásquez, A. M. (2008). *Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia Labiaceae, y determinación de su actividad antioxidante*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Industrial de Santander, Buvaramanga
- Campuzano, G., Latorre, G. (2010). La HbA1C en el diagnóstico y en el manejo de la diabetes. *Medicina & Laboratorio*, 16, 211-241.
- Cela, E. Beléndez, C. & Galarón, P. (2009). Interpretación de la electroforesis de hemoglobina. *Desde el laboratorio a la clínica*, 7(3), 152-155.
- Centro de control y prevención de enfermedades (2015) Hemoglobinopathies, Current Practices for Screening, Confirmation and Follow-up.

- Chandrasena, L., Peiris, H., Williams, S., Siribaddana, S. (2010). Hemoglobin Variants in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, 41 (5), 1247-1251.
- Chopin, M. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Tecnología en salud*, 1(2), 86-89.
- Deulofeu, P., R. (2015). *Evaluación de hemoglobinopatías*. Recuperado de: <http://www.labtestsonline.es/tests/Hemoglobinopatias.html?tab=3>.
- Ducrocq, R., Bévier, A., Leneveu, A., Maier-Redelsperger, M., Bardakdjian-Michau, J., Badens, C., Elion, J. (2015). *Compound heterozygosity HbS/Hb Hope ($\beta 1^{36} Gly \rightarrow Asp$): a pitfall in the newborn screening for sickle cell disease*. Journal of Medical Screening.
- Duarte, M. L., Balderas, V., J., & Hinojosa, M., M. (2009). *Importancia de la Detección Temprana de Hemoglobinopatías con el tamiz neonatal*. Recuperado de: <http://www.orthinlab.com.mx/maillingtamiz/hemoglobinopatias.pdf>
- Fuentes, A., Castiñeiras, L., & Queralto, C. (1998). *Bioquímica Clínica y Patología Molecular* (2a ed.). Barcelona: Reverte.
- Galanello, R., Origa, R., Orphanet, J., & Rare, D. (2010). Hemoglobin E. Recuperado de: <http://www.ojrd.com/content/5/1/11>
- Gómez, A., Gómez, M., & Gómez, P. (20014) *Interpretación Clínica del Laboratorio* (8ª ed.). Bogotá: Médica Panamericana.
- Guevara, A., Chino, M., Calvopiña, M., & Guderian, R. (1998). Hemoglobinopatías en comunidades de raza negra de los ríos Cayapas, Onzoles, cantón Eloy Alfaro, provincia de Esmeralda, Ecuador. *Biomedica*, 1B(2), 122-128.
- Gulbis, B., & Aguilar, P. (2008). Hemoglobina C. Recuperado en: http://www.enerca.org/media/upload/pdf/hemoglobina_c_DOCUMENTS1_93.pdf.
- Gulbis, B., & Aguilar, P. (2008). Hemoglobina E. Recuperado en: http://www.enerca.org/media/upload/pdf/hemoglobina_c_DOCUMENTS1_93.pdf.
- Gulbis, B., & Aguilar, P. (2008). Hemoglobina S y los Síntomas Depranocíticos. Recuperado en: http://www.enerca.org/media/upload/pdf/hemoglobina_c_DOCUMENTS1_93.pdf.

- Hillman , R., Ault, K., & Rander, H. (2006). *Hematología en la práctica Clínica*. México : McGraw Hill.
- Ibarra, B. (2012) Herramientas diagnósticas para hemoglobinopatías. Recuperado de: <http://www.ifcc.org/media/216143/hemoglobinopatias.pdf>
- Jan, K. (2004). *Bioquímica: Texto y Atlas* (3a. ed.). Madrid: Panamericana.
- Joutovsky, A., Hadzi, J. &Nardi, M. (2004) HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: A study of 60,000 samples in a clinical Diagnostic Laboratory. *Clinical Chemistry*, 50 (10), 1736-1747.
- Malcorra, J. (2001). Hemoglobinopatías y Talasemias. *BSCP*, 25(2), 265-277.
- Mckenzie, S. (2000). *Hematología Clínica* (2a ed.). Mexico: Manual moderno.
- Modell, B., &Darlison, M. (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of World Health Organization, Public health reviews*, 86, 480-487.
- Morales, M., Díaz, M. & Santana, H. (2012) Cuantificación de hemoglobina A₂ por electroforesis en gel de agarosa. *Revista de cuba, hematología, inmunología y hemoterapia*. 23(4).
- Nelson, D., & Cox, M. (2007). *Lehninger: Principio de Bioquímica* (6a. ed.). Barcelona: Omega.
- Nureslyna, I., Sabariah, M., Lim, C., Syanfiqah, W., Chem, D., Choy, S. &Ashikin, O. (2013). Percentage of Haemoglobin Variants Detected during HbA_{1c} Analysis in Hospital Kuala Lumpur. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 9(2), 13-17.
- Organización Mundial de la Salud (2010). Resoluciones y decisiones de la 63^a. Asamblea Mundial de La Salud, Ginebra.
- Patton, D. (2014). Guía de la enfermedad de hemoglobina E y D. Recuperado en: http://health.utah.gov/newbornscreening/Disorders/HB/Hb_E_Disease_EE/FactSheet_Family_HbEE_Sp.pdf.
- Peñaloza, R., Buentello, L., Hernández, A., Nieva, B., Lisker, R., &Salamnca, F. (2008). Frecuencia de la hemoglobina S en cinco poblaciones mexicanas y su importancia en la salud pública. *Salud pública de México*. 50(4), 325-329.

- Restrepo, A. (1976). Importancia clínica de las hemoglobinas anormales. *Acta médica Colombiana*, Vol. I No. 3.
- Roa, D., Aguinaga, M., Ruiz, W., Ulloa, V., & Turner, E. (1997). *Búsqueda de hemoglobinas anormales en los recién nacidos en las grandes alturas*. *RevMedHered*; 8:87 – 91.
- Rodak, B. F. (2007). *Hematología: Fundamentos y Aplicaciones Clínicas* (2a. ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Rodríguez,W,E., Sáenz,G, F., & Chaves, M, A. (1998). Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemilógica antropológica y clínica. *Revista Panamericana de Salud Pública*., 3(1), 1-8.
- Rodríguez, W.E., Villalobos, J., Salas, P., Hong, L., Chui, David. (2012). Hemoglobina Raleigh en Costa Rica detectada como un valor falsamente elevado de hemoglobina glicosilada. *Revista Biomed*, 23,33-38.
- Rojas. E. (2006) Factores que afectan la oximetría de pulso. *Revista mexicana de Anestesiología*. 29. 192-198.
- Rouge, P., Hardmeier, I., López, E., Lagomarsino, A. (2002). Estudio comparativo en la cuantificación de tensioactivos entre HPLC Y RMN. Recuperado de: <http://www4.inti.gov.ar/GD/4jornadas2002/pdf/cequipe-128.pdf>
- Ruiz, G. (2009). *Fundamentos de Hematología* (4a. ed.). Mexico: Panamericana.
- Ryan, K., Bain, B., Worthington, D., James, J., Plews, D., Mason, A., et al. (2010).Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *British Journal of haematology*.149, 35-49.
- Saézn, M. S., Sorroche, P. (2014). La electroforesis capilar en el estudio de las Hemoglobinopatías y Talasemias. *Hematología* 18(3), 272-276.
- Saézn, G., Altafulla, M., Sancho, G., Salgado, M. (1988). Abnormal hemoglobin and thalasseмии in Costa Rica, other countries of Central America, and Panama. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 22(1), 101-119.
- Saézn, G., Arroyo, G., Jiménez, J., Gutiérrez, A., Barrenechea, M., Brilla, E. &Valenciano, E.(1971). Investigación de hemoglobinas anormales en población de raza negra costarricense. *Revista de Biología Tropical*, 19(1), 251-256.

- Saénz, G., Avarado, A., Atmetlla, F., Arroyo, G., Jiménez, R., Valenciano, E. (1973). Investigación de Hemoglobinas anormales en población costarricense del Guanacaste. *Acta Médica Costarricense*, 16(2), 147-159.
- Sáenz , G. F. (1988). Hemoglobinopatías en los países de la Cuenca del Caribe . *Biol. Trop.* , 36(2B), 361-372.
- Sáenz, G. F. (2005). *Hemoglobinas anormales*. Vol. 47. Acta médica Costarricense, número 4 (173-179).
- Sáenz, G., Cerdas, J. (2009). Proyecto Costa Rica-Caribe. Congreso Iberoamericano sobre Drepanocitosis. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 15(4), 28-29.
- Saénz, G., Montero, G., Arroyo, G., Jiménez, J., Alvarado, A., Valenciano, E., (1973). Hemoglobinas anormales en una población estudiantil universitaria. *Revista de Biología Tropical*, 21(2), 417-424.
- Sofronescu, A., Williams, L., Adrews, D & Zhu, Y. (2011). Unexpected Hemoglobin A1c Results. *Clinical Chemistry*, 57(2), 153-157.
- Solórzano, C., & Arturo, E. (1986). *Frecuencia de hemoglobinopatías en la población de Livingston, Izabal*. Tesis de Licenciatura : Univesidad de San Carlos de Guatemala.
- Steinberg, MH. (2011). *Sickle cell disease and associated hemoglobinopathies*. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Cecil Medicine*. 24th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier.
- Svarch, E. (2009). *Fisiología de la drepanocitosis*. Instituto de Hematología e Inmunología. Cuba.
- Torres, A., Eberle, E., Sciuccati, G. & Bonduel, M. (2003). *Efecto de la hidroxiurea en hemoglobina*. S. Scielo, v.63 n.2 Buenos Aires.
- Torres, Y., Montoya, A. & Hicks, J. (2009) La disfunción del eritrocito en la hipoxia tisular en pacientes con EPOC y su relación con estrés oxidativo. *Revista del Instituto de Enfermedades Respiratoria*. 22(4), 356-365.
- Varela, I., Sequera, A., Olivero, R. (2013). Detección de hemoglobinopatías en recién nacidos del Hospital Materno Infantil “Dr. José María Vargas” de la ciudad de Valencia, Venezuela. *Salus online*, 17(2), 6-12.

- Vega Sigel, M., Martínez, V., Ascencio, C., & Aguilar, C. (2009). Comparación entre los resultados del equipo D10TM Bio Rad (HPLC) y la electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa para la detección de hemoglobina S y C en paciente de la Clínica Dr. Marcial Fallas Díaz. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 15(4), 15-18.
- Verhovsek, M., Henderson, M., Cox, G & Steinberg, M. (2010) Unexpectedly low pulse oximetry measurements associated with variant hemoglobins: a systematic review. *Am J Hematology*, 85(11), 882-995.
- Vives, J., & Aguilar, J. (1988). *Manual de técnicas de laboratorio de hematología*. España: Salvat.
- Wajcman, H., Moradkhani, K. (2011). Abnormal haemoglobins: detection & characterization *Indian Journal Medicine Re*. 134(4):538-546.
- Zuñiga, C. (1999). *Prevalencia de anemia de células falciformes en niños de 5 a 10 años de raza negra*. Tesis de Licenciatura : Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Zur, B., Bagci, S., Ludwing, M. & Stoffel, B. (2012) Oxygen Saturation in pulse oximetry in hemoglobin anomalies. *Klin Pedratty*, 224(4), 259-265.

XII. Anexos

A. Anexo 1

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR “ESTUDIO DE HEMOGLOBINAS ANORMALES”

Estamos realizando un estudio en el que le invitamos a participar llamado: “Caracterización de pacientes diabéticos con hemoglobinas anormales que asisten a la consulta externa de adultos de un hospital público urbano”, el cual consiste en que todo paciente diabético que asisten a la consulta externa del laboratorio clínico y que tenga una orden de médica para el análisis de hemoglobina glicosilada se le tome una muestra de sangre (5mL en un tubo de EDTA) para el análisis de hemoglobinas anormales, las cuales no son muy comunes en nuestro país sin embargo la presencia de alguna, pueden provocar valores altos o bajos en la medición de la hemoglobina glicosilada, alterando así su diagnóstico de diabetes; por otra parte poseer alguna hemoglobina variantes, le puede provocar diferentes tipos de anemias como la anemia de células falciformes, anemia normocrómica normocítica, anemia hemolítica leve, anemia con una reducción en la vida media de los eritrocitos, en ocasiones hay microcitosis y aumento de reticulocitos, en algunas ocasiones los parámetros hemáticos son normales.

Si usted opta participar, se le solicita su consentimiento para realizar el análisis de hemoglobina anormales, el cual se podrá realizar en la misma muestra de hemoglobina glicosilada que solicitó su médico. En el caso de presentar alguna hemoglobina anormal, se le comunicara por vía telefónica, orientándolo y refiriéndolo con un especialista. La importancia de participar en este estudio es ayudar a los pacientes que salgan con alguna hemoglobina anormal y brindarles la información pertinente.

Usted está en todo su derecho de decidir participar o no en este estudio, se puede retirar en cualquier momento de la investigación y de realizar todas las preguntas necesarias antes y durante toda la investigación, sus datos no serán revelados bajo ninguna circunstancia y el examen no tiene ningún costo. En caso de decidir no participar, no tendrá ninguna repercusión en su atención y tratamiento.

Yo (Paciente) _____ he leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente la preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Nombre: _____ DPI: _____

Firma: _____ Fecha: _____ Hora: _____

Nombre del quien obtiene el consentimiento: _____ DPI: _____

Firma: _____ Fecha: _____ Hora: _____

Estudio de Hemoglobina Anormales – Hospital San Juan de Dios de Guatemala

Para mayor información puede comunicarse a los siguientes teléfonos: estudiantes que están realizando la investigación.

Dwight Smith Cel: 5460-8850

Neidy Oliva Cel: 4203-971

**Datos de interés para el estudio de
“Hemoglobinas anormales en pacientes diabéticos”**

No. Orden _____

Lugar de Nacimiento: _____

Dirección: _____

Edad: _____ Tel./cel.: _____

Raza: Ladino: _____ No Ladino: _____ Garífunas: _____

Sexo: Masculino: _____ Femenino: _____

Resultados de Hemoglobinas:

% de HbA1c: _____ % HbS: _____ %HbC: _____

% Hb F: _____

Resultado de Hematología (solo a pacientes con presencia de hemoglobinas variantes).

RBC: _____ HGB: _____ HCT: _____

Resultado del Frote Periférico (solo a pacientes con presencia de hemoglobinas variantes).

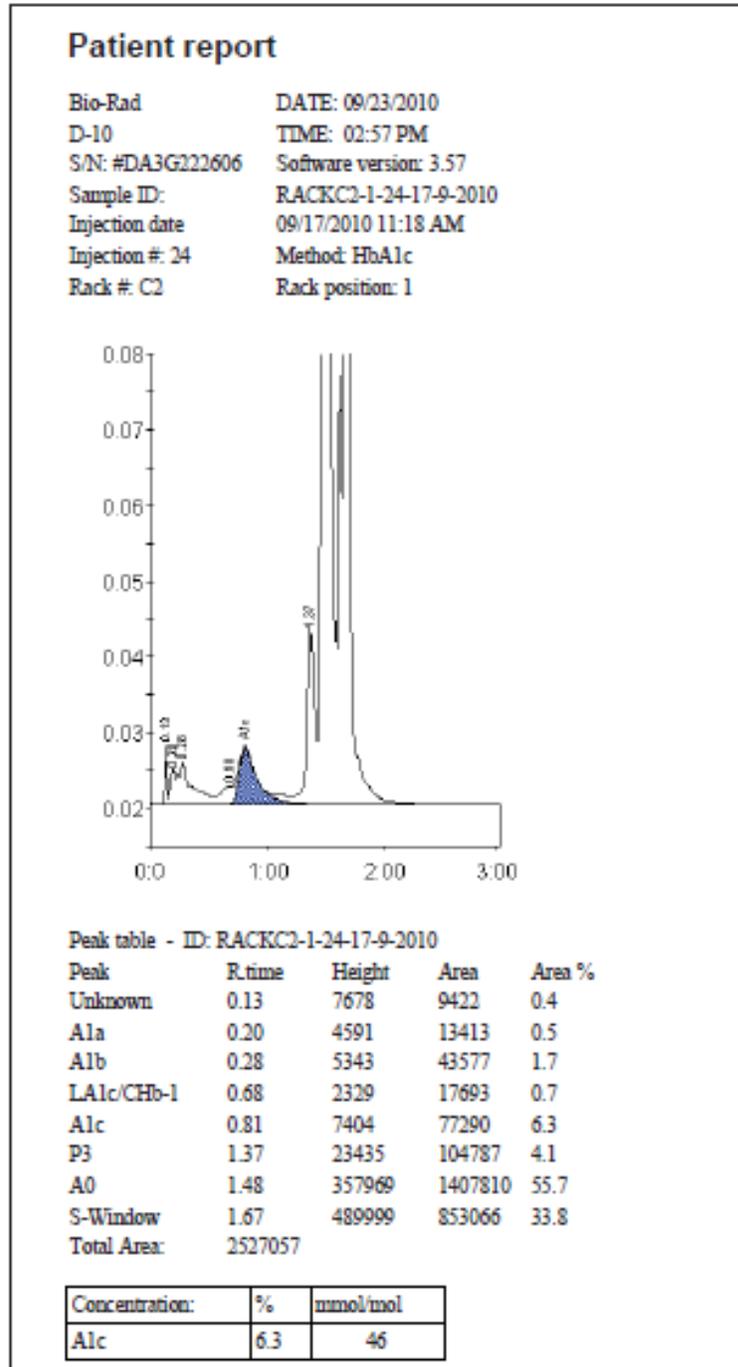
B. Anexo 2 “Frecuencia de marcadores genéticos heterocigotos de hemoglobina S (AS) y hemoglobina C (AC) en poblaciones centroamericanas estudiadas”

País y localidad	Raza o porcentaje de la población	No. de Individuos	AS (%)	AC (%)
EL SALVADOR				
San Salvador	Pacientes hospitalizados	2,100	1.65	nc
PANAMÁ				
Boca del toro	Negros	356	10.4	5.0
Costa arriba	Negros	106	21.0	nc
Costa arriba	Negros	268	15.0	2.2
Colón	Panameños en general	3000	30.0	nt
Chipre	Estudiantes	1500	17.0	nt
Ciudad e panamá	Pacientes hospitalizados	896	6.0	nt
Ciudad e panamá	Pacientes hospitalizados	850	18.6	0.8
Colón	Pacientes hospitalizados	428	21.0	nt
Chiriqui	Panamá en general	200	4.5	nt
HONDURAS				
Corozal	Negros caribeños	293	10.6	0.0
Santa Rosa	Negros Caribeños	342	6.1	1.8
Limón	Negros caribeños	327	16.8	2.4
Tocamacho	Negros caribeños	209	8.6	0.0
Trujillo	Negros caribeños y mulatos	500	8.2	nt
GUATEMALA				
Livingston	Negros caribeños	82	18.3	---
Livingston	Negros	68	17.6	---
COSTA RICA				
Santa cruz guanacaste	Mestizos	227	7.5	nc
Liberia, Guanacaste	Mestizos	539	4.8	nc
Todo el país	Adultos	947	1.1	0.1
Todo el país	Costarricense	1053	2.0	0.2
Limón	Negros	621	8.2	2.4
Santa cruz, Guanacaste	Mestizos	1702	8.9	0.3
San José	Estudiantes universitarios	1500	1.1	0.2
Nicoya, Guanacaste	Pacientes hospitalizados	231	3.9	0.9
Nicoya, Guanacaste	Recién nacidos en hospital	538	3.7	0.4
Todo el país	Escolares	12000	0.8	0.1
Cartago	Caucásicos (recién nacidos)	671	0.3	nc
Limón	Negros (recién nacidos)	280	6.1	3.6
Santa cruz, Guanacaste	Preescolares	1000	10.6	0.2

nc: no se encontró ningún caso, nt: no se realizaron pruebas, AS: heterocigotos de la hemoglobina S, AC: heterocigotos de la hemoglobina C.

Fuente: Bulletin of the Pan American Health Organization.

C. Anexo 3 “Formato de informe de un paciente heterocigoto con hemoglobina S”



Fuente: Manual de instrucciones Bio-Rad D10 dual program.

D. Anexo 4 Tabla de interpretación del cromatograma

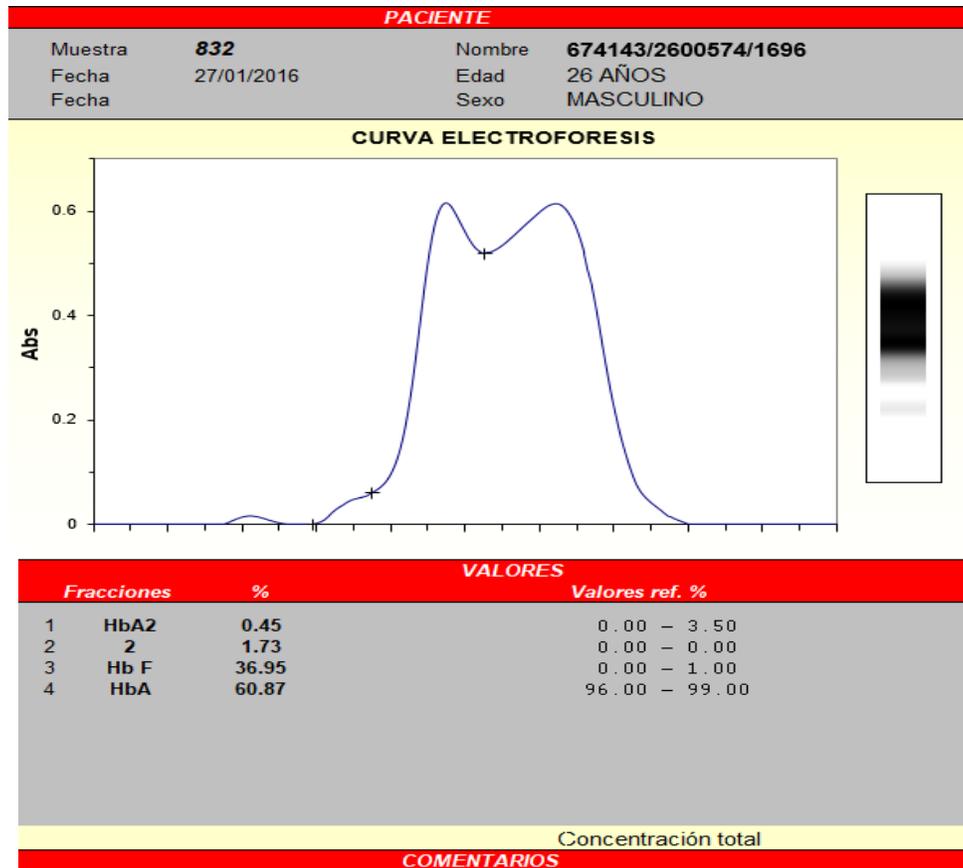
Elemento	Criterios
Rango del área total	Debe de estar entre 1.0 y 5.0 millones.
Rango de Hemoglobina glicosilada (HbA1c)	NGSP* : 3.8 – 18.5% IFCC** : 18 -179mmol/mol
Valor de hemoglobina F (HbF)	Menor o igual 10%
Hemoglobina A lábil (LA1C/CHb-1)	Menor o igual a 4%
Hemoglobina S y C (S-Window o C-Window)	Para cualquier muestra que tenga un área mayor a 60%, debe considerarse la posibilidad de que presente una variante homocigota o fenotipo de beta talasemia. No se debe reportar la HbA1c.

* Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina” (NGSP por sus siglas en inglés)

** Federación internacional de química clínica y ciencia de laboratorio clínico (IFCC por sus siglas en inglés)

Fuente: Manual de instrucciones Bio-Rad D10 dual program.

E. Anexo 5 Formato de informe de un paciente que probablemente presenta un tipo de hemoglobina anormal S, C, D, O, G o A2.



COMENTARIOS

Desafortunadamente el método usado no puede distinguir la fracción 2 y esta puede ser Hb A2,C,E,O y la fracción 3 no puede ser fracción HbF por la edad del paciente pero puede ser S,D G. Se corrió con 30 min. más de tiempo para ver si se separaba mas la fracciones pero no sucedio esto.

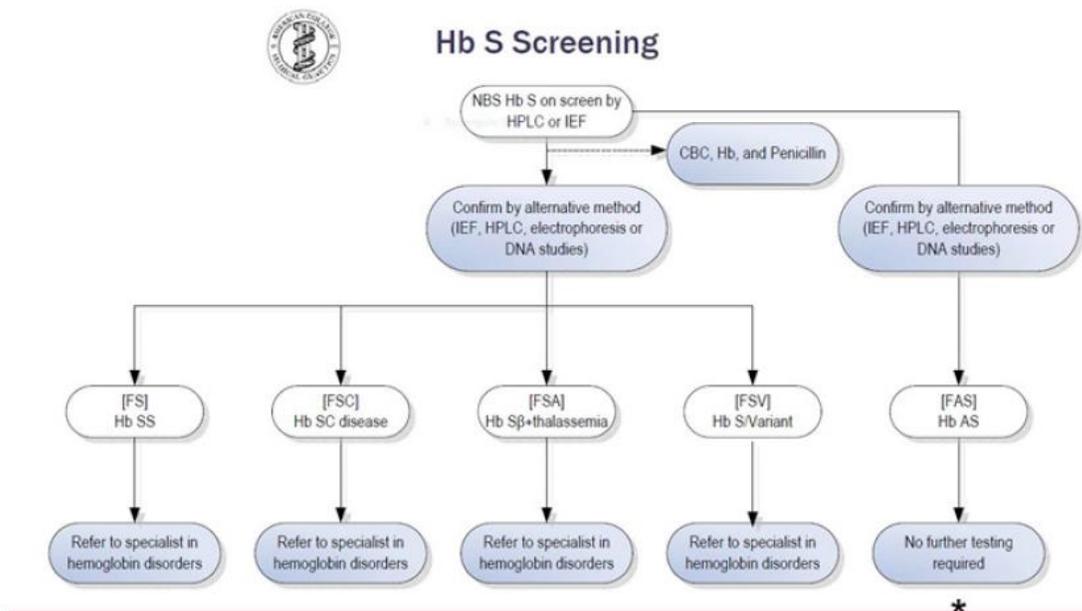
Fuente: Laboratorio de referencia de “Inmunología”

F. Anexo 6 Tabla de Interpretación de electroforesis

Fracciones	Valores Normales	Valores anormales
Hemoglobina A	96-99%	
Hemoglobina F	< 1%	Valores aumentados puede ser presencia de: hemoglobina S, D o G
Hemoglobina A ₂	< 3.5%	Valores aumentados puede ser presencia de hemoglobina C, E u O.

Fuente: Laboratorio de referencia de “Inmunología”

G. Anexo 7 Algoritmo diagnóstico para la detección de Hemoglobinas Anormales



Abbreviations/ Key: F, S, A, C, and V = The hemoglobins seen in neonatal screening; HPLC: High performance liquid chromatography; IEF: Isoelectric focusing; ‡ = Repeat testing at 6 months age is required if genotyping to confirm the newborn screening result is not done.

Fuente: Centro Control y Prevención de Enfermedades (CDC) 2015

Dwight Sidney Smith de Paz
AUTOR

Neidy Deydania Oliva Xitimul
AUTOR

Licda. Eva Carolina Montoya Imeri
ASESOR

Lic. Manuel Alejandro Díaz Paz
CO-ASESOR

Lic. Antonio Alejandro Galindo Ruiz
CO-ASESOR

MA. Ana Margarita Paz de Ramírez
REVISOR

MSc. Alba Marina Valdés de García
DIRECTORA ESCUELA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
DECANO