

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



**INCIDENCIA DE HEMOGLOBINOPATÍAS EN NEONATOS DEL
HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS**

**ANDREA CELESTE JACINTO RANGEL
ANGÉLICA SARAHI CHIROY SICÁN**

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, MAYO DE 2019

**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 saint, likely St. John the Baptist, holding a sword and a lamb. The seal is surrounded by the Latin motto "CETERAS OMBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" and the year "1690".

**INCIDENCIA DE HEMOGLOBINOPATÍAS EN NEONATOS DEL
HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS**

INFORME FINAL

Presentado por

**ANDREA CELESTE JACINTO RANGEL
ANGÉLICA SARAHÍ CHIROY SICÁN**

**Para optar al título de
QUÍMICAS BIÓLOGAS**

GUATEMALA, MAYO DE 2019

JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de San Carlos de Guatemala y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**, por formarnos como profesionales, brindándonos los conocimientos necesarios para desempeñar nuestras labores diarias y poner en práctica lo aprendido a la comunidad.

Al **Departamento de Citohistología y al Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios**, por confiar en nosotras para la elaboración del estudio, así como el financiamiento y préstamo de las instalaciones.

A nuestros **Asesores Lic. Eliseo Albanés y Lic. Isabel Gaitán** por el aporte de su conocimiento, tiempo y dedicación durante estos años de la elaboración de la investigación.

A nuestra **Revisora Lic. Keila Guerrero** por su eficiencia, conocimiento y guía durante el transcurso de esta investigación.

Al personal técnico del Hospital General San Juan de Dios, en especial a **Jessica Valenzuela e Ingrid Secaida**, por sus enseñanzas y apoyo en el área de Tamizaje Neonatal.

A todos aquellos que participaron directa e indirectamente en la realización de nuestro seminario.

Andrea y Sarahí

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
A. HEMOGLOBINA	3
1. Definición	3
2. Estructura y biosíntesis	3
a. Grupo hemo	4
b. Globina	5
c. Unión del grupo hemo y globina	5
3. Función	6
4. Ontogénesis de la hemoglobina	10
5. Hemoglobinas normales	10
6. Hemoglobinas anormales	11
B. HEMOGLOBINOPATÍAS	13
1. Definición	13
2. Epidemiología	13
3. Clasificación de hemoglobinopatías	15
a. Hemoglobinopatías estructurales	15
b. Síndromes talasémicos	15
c. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal	16
4. Hemoglobinopatías estructurales	16
a. Hemoglobinopatías por alteración de movilidad electroforética de la hemoglobina	17
b. Hemoglobinopatías por alteración en inestabilidad de la hemoglobina	23
c. Hemoglobinopatías por alteraciones en la capacidad de mantener el hierro en estado reducido	25
d. Hemoglobinopatías por afinidad al oxígeno alterada	26
5. Talasemias	27
a. Beta-talasemia	28
b. Alfa-talasemia	28

c. Delta/beta-talasemia	29
d. Dobles estados heterocigotos (SC) (SD), (S-β-talasemia)	29
6. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal	30
C. TAMIZAJE NEONATAL	31
1. Tamizaje neonatal en Latinoamérica	33
2. Tamizaje neonatal en Guatemala	34
a. Programa de tamizaje neonatal en el Hospital General San Juan de Dios	35
b. Otros establecimientos en Guatemala que ofrecen tamizaje neonatal	36
D. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TAMIZAJE DE HEMOGLOBINOPATÍAS	36
1. Pruebas de tamizaje neonatal de hemoglobinopatías	37
a. Electroforesis en membrana de acetato de celulosa (alcalino)	37
b. Electroforesis en agar citrato (ácido)	38
c. Electroforesis capilar	38
d. Enfoque isoelectrico (IEF)	38
e. Cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico (HPLC –por sus siglas en inglés-)	39
2. Diagnóstico confirmatorio	40
a. Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP)	40
b. Discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real	41
c. Secuenciación de ADN	41
IV. JUSTIFICACIÓN	42
V. OBJETIVOS	43
VI. HIPÓTESIS	44
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	45
VIII. RESULTADOS	53
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
X. CONCLUSIONES	66
XI. RECOMENDACIONES	67
XII. REFERENCIAS	68
XIII. ANEXOS	78

I. RESUMEN

Las hemoglobinopatías corresponden a un tipo de defecto hereditario, relacionado a la molécula de la hemoglobina, que resulta en manifestaciones clínicas características. La frecuencia de las hemoglobinopatías en la población mundial es elevada. En Centro América, hay en promedio 175 concepciones anuales con trastornos de células falciformes y dos con β -talasemias (Medina y Ramos, 2016; Ruano y Jato, 2004). El objetivo del estudio fue determinar la incidencia de hemoglobinopatías en neonatos del Hospital General San Juan de Dios en un período de 6 meses.

En el estudio se incluyeron 3006 recién nacidos tamizados durante los meses de enero, marzo, abril, mayo, agosto y septiembre de 2017 a quienes se les realizó la prueba de hemoglobinas anormales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando el equipo VARIANT nbs Newborn Hemoglobin System, marca Bio-Rad®.

Veintitrés pacientes (0.77%) presentaron un patrón de hemoglobina anormal, siendo la variante de hemoglobina tipo S la causa más frecuente de hemoglobinopatías. El 91.3% (21 pacientes) casos corresponde al patrón FAS, 4.35% (1 paciente) al patrón FAC y 4.35% (1 paciente) al patrón FS, homocigoto para anemia falciforme.

Se determinó que la tasa de incidencia de patrones de hemoglobina anormal en neonatos del Hospital General San Juan de Dios fue de 7.65 de cada 1000 recién nacidos y 0.33 de cada 1000 recién nacidos presentan un patrón de hemoglobina FS, correspondiente a anemia falciforme.

La tasa de incidencia obtenida por primera vez en el presente estudio, es un dato fundamental para el futuro establecimiento de programas de prevención y control ya que corresponde a un problema importante de salud pública.

II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Las hemoglobinopatías son alteraciones de la globina presente en la molécula de hemoglobina, secundarias a mutaciones genéticas, teniendo como consecuencia una modificación estructural o una disminución en la síntesis de una cadena globínica. Están presentes en un 5% de la población a nivel mundial, actuando como portadores de genes causantes de las variantes de hemoglobina, que alteran el transporte de oxígeno por una hemoglobina estructuralmente anormal. Estos trastornos incluyen a las variantes de tipo S, C, D, E, entre otras, donde la anemia de células falciformes se caracteriza por presentar la variante de hemoglobina tipo S (Medina y Ramos, 2016; Ruano y Jato, 2004).

El tamizaje neonatal consiste en una serie de pruebas que permiten la identificación de enfermedades metabólicas o hereditarias, a través de la extracción de sangre del talón de los recién nacidos. A pesar que en diferentes países han establecido el tamizaje neonatal como un programa obligatorio de salud pública, Guatemala no cuenta con cobertura a nivel nacional, es por ello que esta investigación con el apoyo de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, específicamente el departamento de Citohistología, a través de la Unidad de Inmunología y Hematología (UDIHEMA) y el Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios, tiene el propósito de determinar la incidencia de hemoglobinopatías en los neonatos del Hospital San Juan de Dios durante un período de 6 meses, a fin de dar a conocer por primera vez datos acerca de variantes de hemoglobina presentes en una porción de la población guatemalteca y generando información para el futuro establecimiento de programas de prevención y control de hemoglobinopatías en todo el país.

III. ANTECEDENTES

A. HEMOGLOBINA

1. Definición

La hemoglobina es una proteína conjugada globular y el principal componente de los eritrocitos. Fija oxígeno (O_2) en los pulmones y lo transporta a través de la sangre a los tejidos periféricos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. Al volver a los pulmones, desde la red de capilares, la hemoglobina actúa como transportador de dióxido de carbono (CO_2) y protones (H^+) para ser posteriormente excretados. Su concentración aproximada en los eritrocitos es de 12 a 16 g/dL en mujeres y 13 a 18 g/dL en hombres (Pocock, 2005; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2011).

2. Estructura y biosíntesis

La hemoglobina está conformada por una estructura cuaternaria constituida por cuatro subunidades proteicas cada una de ellas, denominadas cadenas de hemoglobina. Están formadas por una cadena polipeptídica denominada globina que se encuentra unida de forma no covalente a un grupo prostético, el grupo hemo (ver Anexo 1) (Rodak, 2004; Scarff, Patel, Thalassinis & Scrivens, 2009).

La síntesis de hemoglobina se inicia en los eritroblastos a través de dos vías metabólicas diferentes: síntesis del grupo hemo y síntesis de la globina (Brandan, Aguirre y Giménez, 2008; Scarff, et al., 2009).

a. Grupo hemo

El grupo hemo es un grupo prostético, que corresponde a la porción no polipeptídica que forma parte de la hemoglobina en su estado funcional. Está conformado por un anillo de protoporfirina IX unida a un átomo de hierro en estado ferroso (II) (Pocock, 2005).

La protoporfirina IX consiste en un anillo tetrapirrólico que contiene dos grupos ácidos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos. El hierro ferroso se encuentra en el centro del anillo de protoporfirina IX; tiene posibilidad de formar seis enlaces de coordinación, con una geometría octaédrica. Cuatro de los enlaces están formados con los nitrógenos de los cuatro anillos pirrólicos de la protoporfirina IX y se dirigen aproximadamente desde el centro hacia los vértices de un cuadrado, por lo que los dos restantes pueden dirigirse en dirección perpendicular al plano del hemo, uno a cada lado (Peñuela, 2005).

Cada grupo hemo se ubica en un área de la cadena de polipéptidos cerca de la superficie de la molécula de hemoglobina y puede combinarse de forma reversible con una molécula de oxígeno (Franco, 2010; Nelson y Cox, 2009).

El grupo hemo se produce en la mitocondria y el citoplasma de los precursores eritrocitarios en la médula ósea. Los eritrocitos maduros no pueden producir hemoglobina debido a que pierden su mitocondria. Los precursores de la biosíntesis de protoporfirina IX son la glicina y la succinil coenzima A. La ferroquelatasa contribuye a la unión de hierro (II) a la protoporfirina IX para la formación final del grupo hemo. El hierro (II) es transportado a la médula ósea por la transferrina, donde se une a la protoporfirina IX en la mitocondria y finalmente el grupo hemo viaja al citoplasma para su unión a las cadenas de globina (Franco, 2010; Forrellat, du Défaix, Gómez y Fernández, 2000).

b. Globina

La globina presenta dos pares de cadenas de polipéptidos. Cada cadena se forma por 141 a 146 aminoácidos. Las variaciones en las secuencias de aminoácidos dan origen a distintos tipos de cadenas; cada cadena se designa con una letra griega (Cuadro 1). Cada cadena se divide en 8 hélices y 7 segmentos no helicoidales. Las hélices son relativamente rígidas y lineales; los segmentos no helicoidales son más flexibles y se ubican entre los helicoidales. Los seis genes estructurales que controlan la síntesis de las cadenas de globina se encuentran en el cromosoma 16 (cadenas alfa y zeta) y 11 (cadenas gamma, beta, delta y épsilon). Las cadenas ya sintetizadas son liberadas desde los ribosomas hacia el citoplasma para su unión al grupo hemo (Brandan, et al., 2008; Nelson y Cox, 2009; Forrellat, et al., 2000).

Cuadro 1. Variantes de cadenas de globina

Cromosoma	Nombre	Letra griega	Número de aminoácidos
16	Alfa	A	141
11	Beta	B	146
11	Gamma A	γ_A	146 (posición 136: alanina)
11	Gamma G	γ_G	146 (posición 136: glicina)
11	Delta	Δ	146
11	Épsilon	E	Desconocido
16	Zeta	Z	141
11	Theta	Θ	Desconocido

Fuente: Rodak, 2004

c. Unión del grupo hemo y globina

Una vez se han liberado las cadenas de globina, dos cadenas, una alfa y una no alfa, se unen para formar un dímero; dos dímeros forman el tetrámero. Cada cadena de globina, a su vez, se une a un grupo hemo. Las cadenas de globina son curvas formando una

hendidura para el grupo hemo, debido a la hidrofobia de los aminoácidos. El grupo hemo se encuentra suspendido entre las hélices E y F de la cadena de polipéptidos (Brandan, et al., 2008).

El átomo de hierro (II) que se encuentra en el centro del anillo de protoporfirina IX, tiene posibilidad de formar seis enlaces de coordinación, con una geometría octaédrica. Cuatro de los enlaces están formados con los nitrógenos de los cuatro anillos pirrólicos de la protoporfirina IX y se dirigen aproximadamente desde el centro hacia los vértices de un cuadrado, por lo que los dos restantes pueden dirigirse en dirección perpendicular al plano del hemo, uno a cada lado. El quinto enlace de coordinación del átomo de hierro (II) se emplea para unir el grupo hemo firmemente a la apoproteína, concretamente a través de un nitrógeno del imidazol de un residuo de histidina proximal (F8) (Nelson y Cox, 2009).

Al otro lado del plano se encuentran los residuos de fenilalanina CD1 y valina E11, que proporcionan un entorno apolar adecuado para el acoplamiento del hemo y para la entrada de la molécula apolar de oxígeno. La unión de oxígeno tiene lugar por medio del sexto enlace de coordinación del hierro. Como consecuencia de esta unión, la molécula de oxígeno se polariza lo suficiente como para establecer un enlace de hidrógeno con el imidazol protonado de la histidina E7. Los aminoácidos en el exterior son hidrófilos, lo que permite que la molécula sea hidrosoluble. Finalmente, la estructura molecular permite que se pueda unir una molécula del ligando a cada uno de los cuatro grupos hemo, es decir, es posible la unión de cuatro moléculas de oxígeno a cada molécula de hemoglobina (Brandan, et al., 2008; Rodak, 2004).

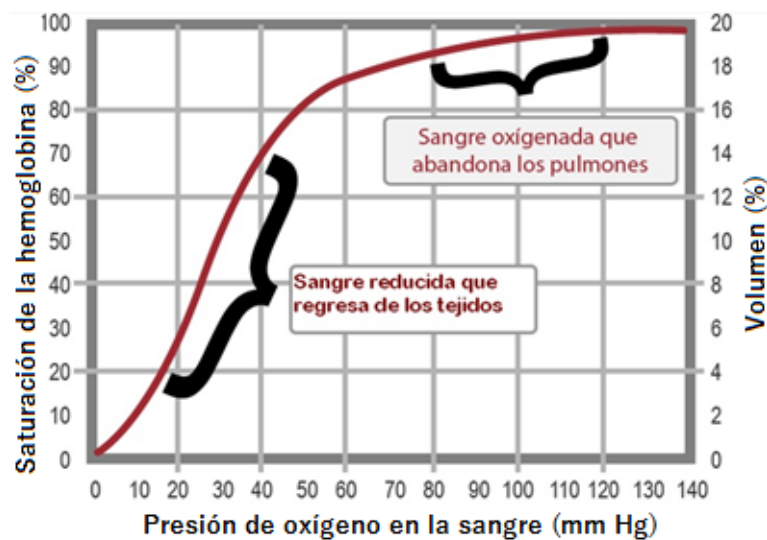
3. Función

La hemoglobina tiene como función principal la fijación de las moléculas de oxígeno en los pulmones y su transporte vía sanguínea hacia los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. Al volver a los pulmones, desde la red de capilares, la hemoglobina actúa como transportador de dióxido de carbono y de protones. Por cada litro

de sangre hay 150 gramos de hemoglobina, y cada gramo de hemoglobina disuelve 1.34 mL de oxígeno, en total se transportan 200 mL de oxígeno por litro de sangre. Esto es, 87 veces más de lo que el plasma podría transportar solo. Sin un transportador de oxígeno como la hemoglobina, la sangre tendría que circular 87 veces más rápido para satisfacer las necesidades corporales (Brandan, et al., 2008; Scarff, et al., 2009).

El proceso de fijación del oxígeno por la hemoglobina requiere una elevada afinidad; la liberación del oxígeno a los tejidos precisa una afinidad baja. La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno depende de la presión parcial de oxígeno (pO_2). La relación entre la presión parcial de oxígeno y la saturación de oxígeno se describe mediante la curva de disociación de oxígeno- hemoglobina. Esta curva es sigmoidea (Figura 1) e indica una afinidad baja de la hemoglobina por el oxígeno frente a una baja tensión de oxígeno y una elevada afinidad con tensiones de oxígeno elevadas (Renaldo, 1974; Rodak, 2004).

Figura 1. Curva de disociación oxígeno-hemoglobina



Fuente: Rinaldi, 1974

Además, la curva sigmoidea revela que la porción más empinada de la curva se encuentra en las zonas de baja tensión de oxígeno de los tejidos, lo que significa que disminuciones relativamente pequeñas en la tensión de oxígeno dan lugar a grandes

incrementos en la cesión o fijación del oxígeno. Sin embargo, pequeñas disminuciones en la tensión de oxígeno en los pulmones (altitud moderada) no comprometen seriamente la capacidad de la hemoglobina para fijar oxígeno. La hemoglobina está saturada 98% en los pulmones y sólo 33% en los tejidos, de manera que cede casi 70% de todo el oxígeno que puede transportar (Brandan, et al., 2008).

El transporte eritrocitario de dióxido de carbono, a diferencia del transporte de oxígeno, no se realiza por unión directa al hemo, sino que se relaciona estrechamente con el mantenimiento del pH sanguíneo. El dióxido de carbono difunde libremente en los eritrocitos, donde la anhidrasa carbónica cataliza la reacción que genera ácido carbónico. De la posterior ionización del ácido carbónico, los iones hidronio generados se incorporan a la hemoglobina desoxigenada, proceso facilitado por el efecto Bohr. El bicarbonato resultante de la ionización, por su parte, difunde a través de la membrana eritrocitaria y en parte se intercambia con iones cloruro (Cl⁻) del plasma, mecanismo denominado desplazamiento del cloruro (Peñuela, 2005).

Cuando la hemoglobina se oxigena, asume una configuración cuaternaria relajada (R). Cuando se encuentra en la conformación desoxigenada asume una estructura cuaternaria tensa (T). Los fenómenos moleculares del cambio de conformaciones no se han establecido totalmente, pero al parecer implica una configuración intermedia entre la estructura relajada y tensa. El 2,3-difosfoglicerato funciona como un efector alostérico para la hemoglobina. En la conformación tensa existe una cavidad suficientemente grande para admitir al 2,3-difosfoglicerato entre las cadenas beta. Además, esta cavidad está cargada positivamente, fijando así una molécula de 2,3-difosfoglicerato de carga negativa (Peñuela, 2005).

La conversión final a la conformación relajada se inicia con la fijación de una molécula de oxígeno a un contacto intercatenario $\alpha 1\beta 2$ y continúa con la eliminación del 2,3-difosfoglicerato y la disrupción de los puentes salinos e interacciones hidrófobas en el contacto $\alpha 1\beta 2$ formados en la conformación tensa. Las variaciones de la concentración del 2,3-difosfoglicerato desempeñan un papel fundamental en la adaptación a la hipoxia, de

manera que en la hipoxemia aumenta el 2,3-difosfoglicerato eritrocitario, la afinidad por el oxígeno declina y el aporte a los tejidos se facilita (Rodak, 2004).

Muchos factores afectan la interacción entre las superficies moleculares de la hemoglobina, que pueden ser alteradas por variaciones ya sea del medio ambiente en que se encuentra la célula como también por la estructura del tetrámero de la hemoglobina. El estado de combinación de la hemoglobina después de terminar su unión con el oxígeno es considerablemente menos soluble que la hemoglobina oxigenada, pues la conformación del tetrámero cambia considerablemente de forma que las dos cadenas beta se separan aproximadamente siete angstrom. La concentración de hemoglobina intracelular (CHCM), determina las distancias intermoleculares. El pH intracelular puede afectar la carga de los residuos y la fuerza iónica del medio afecta las fuerzas de interacción de la superficie de la molécula de hemoglobina (Sáenz, 1976).

La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno está influida por la concentración y unión a la hemoglobina de protones, el dióxido de carbono, la temperatura y el 2,3-difosfoglicerato, ya mencionado. La concentración del ión hidrógeno influye sobre la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El pH bajo desplaza la curva hacia la derecha, facilitando la cesión de oxígeno, mientras que el pH elevado la desplaza hacia la izquierda; la oxigenación de la hemoglobina aumenta la acidez (Efecto Bohr). La temperatura tiene también un efecto importante sobre la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. A temperaturas por debajo de la normal, la fijación es más fuerte, desplazando la curva a la izquierda; a temperaturas elevadas la fijación se hace débil y la curva se desplaza a la derecha (Brandan, et al., 2008; Scarff, et al., 2009).

En cuanto a las variables en la estructura del tetrámero de la hemoglobina que influyen en las interacciones moleculares, se encuentran las mutaciones genéticas que alteran la estructura y/o síntesis de las cadenas polipeptídicas de globina (hemoglobinas anormales) y las alteraciones estructurales químicamente inducidas (Sáenz, 1976).

4. Ontogénesis de la hemoglobina

La composición de las subunidades de globina varía con la edad gestacional o postnatal, específicamente en las secuencias de aminoácidos, que dan origen a distintos tipos (Cuadro 1). Estos cambios se deben a variaciones en la activación e inactivación de los genes en los cromosomas 11 y/o 16 (Rodak, 2004).

Los genes que sintetizan las subunidades zeta y épsilon, generalmente, aparecen solo durante los primeros tres meses del desarrollo embrionario, dando origen a la hemoglobina Gower I ($\zeta_2\xi_2$). Al final del primer trimestre las subunidades alfa reemplazan todas las subunidades zeta, originando hemoglobina Gower II ($\alpha_2\xi_2$). Hacia la décima semana de gestación cesa la producción de cadenas épsilon y zeta y todas las subunidades épsilon son reemplazadas por subunidades gamma, dando origen a la hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$). Finalmente, las subunidades beta comienzan su síntesis en el tercer trimestre y no reemplazan a las subunidades gamma en su totalidad hasta algunas semanas después del nacimiento, dando origen a la forma adulta, hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$). Durante el desarrollo embrionario también ocurre la síntesis de hemoglobina Portland ($\xi_2\gamma_2$), que desaparece al final del primer trimestre (Rodak, 2004; De la Torre y Pelayo, 2007).

5. Hemoglobinas normales

De un 95 a 97% de la hemoglobina del adulto y de niños mayores de siete meses de edad es hemoglobina A. Los adultos normales también presentan de un 2 a 3% de hemoglobina A₂, la cual está compuesta por dos cadenas alfa y dos delta ($\alpha_2\gamma\delta_2$). Normalmente, existen diversas especies de hemoglobina A por modificaciones postraduccionales con diversos azúcares como glucosa-6-fosfato. Se designan como A1a1, A1a2, A1 $\delta\delta$ b y A1c. La más importante es la hemoglobina A1c, que proviene de la fijación covalente de un resto de glucosa al extremo N-terminal de la cadena β . La reacción postraduccionale no es catalizada enzimáticamente, sino que depende de la velocidad de la concentración de glucosa. Por tanto, la hemoglobina A1c resulta ser una medida útil de control de pacientes diabéticos

durante los días o semanas previas a la toma de la muestra (Peñuela, 2005; De la Torre y Pelayo, 2007).

La hemoglobina fetal es el componente principal de la hemoglobina del recién nacido, corresponde al 80% de la hemoglobina. A partir de la octava a la décima semana de gestación comienza su síntesis. Posterior al nacimiento su síntesis disminuye rápidamente y a partir de los siete meses constituye menos del 1 al 2% del total. La hemoglobina fetal se encuentra adaptada al ambiente materno-fetal y fija el oxígeno mucho más fuerte para competir por el oxígeno con la hemoglobina A materna. Esto se consigue gracias a que dos de los grupos que recubren la cavidad de fijación de 2,3-difosfoglicerato tienen cadenas laterales neutras, a diferencia de la hemoglobina A, en la que están cargadas positivamente (De la Torre y Pelayo, 2007).

Lo anterior hace que el 2,3-difosfoglicerato, cargado negativamente, se una menos a la hemoglobina fetal y en lugar de ello, se fije más fuerte el oxígeno. Además, entre 15% y 20% de la hemoglobina fetal se encuentra acetilada en sus N-terminales y se denomina hemoglobina fetal 1; esta variante no fija 2,3-difosfoglicerato (Rodak, 2004).

6. Hemoglobinas anormales

La causa principal de las hemoglobinas anormales es una mutación puntual, es decir, la sustitución de un nucleótido de ácido desoxirribonucleico (ADN) por otro, modificando el código genético e induciendo un cambio en un aminoácido de la globina formada. Las alteraciones de la estructura primaria de la molécula de hemoglobina pueden afectar cualquiera de las cadenas polipeptídicas. En consecuencia, la función de una hemoglobina anormal va a depender no sólo del tipo de cadena afectada, sino también de la parte de la cadena en que esa alteración se ha efectuado y, muy importante, del aminoácido sustituido (Peñuela, 2005).

De tal forma, la sustitución de un aminoácido hidrofóbico por un aminoácido polar (mutación muy frecuente) modifica la estabilidad, la cohesión y la solubilidad de la molécula. Por otra parte, la sustitución de un aminoácido cualquiera por una prolina (iminoácido) produce una interrupción de la hélice con modificación de la estructura secundaria y posiblemente de la terciaria. Finalmente, la sustitución de un aminoácido de volumen pequeño por otro de gran volumen modifica las relaciones entre diferentes puntos de la molécula. La función y la supervivencia en solución de la molécula de las hemoglobinas dependen del mantenimiento de una precisa arquitectura tridimensional (Ariza, 2011).

Algunas de las sustituciones en la superficie no alteran la conformación general o la interacción de las subunidades dentro de los tetrámeros, no obstante, pueden alterar las interacciones de la superficie entre las moléculas, llevando a cambios en el estado físico de la hemoglobina intracelular. Las dos hemoglobinas mutantes más importantes y frecuentes que exhiben interacciones intermoleculares alteradas con significancia clínica son la Hemoglobina S y C. En la hemoglobina S la sustitución de valina por el residuo normal glutamato en la posición 6 (A3) de la cadena beta da como resultado una polimerización de la hemoglobina desoxigenada y falciformación de los eritrocitos. En la hemoglobina C la sustitución en el mismo punto, esta vez por lisina, disminuye la solubilidad de la hemoglobina y promueve su cristalización dentro de las células (Sáenz, 1976).

En heterocigotos, solamente una pequeña proporción del total de la hemoglobina intracelular es mutante, la mayoría de las sustituciones en la superficie de la molécula no tienen efectos importantes en su función y estabilidad por lo que usualmente no muestran anomalías clínicas. Estos efectos tienen repercusión clínica significativa solamente cuando predominan los tetrámeros mutantes, como sucede en los homocigotos, o en dobles heterocigotos en los cuales ambas sustituciones actúan en forma interactuante, es decir, de una manera aditiva o sinérgica. Es en estos últimos dos casos cuando se habla de hemoglobinopatías (Sáenz, 1976).

B. HEMOGLOBINOPATÍAS

1. Definición

Es un trastorno relacionado a la molécula de hemoglobina, que corresponde a un tipo de defecto hereditario, que tiene como consecuencia una alteración cualitativa o cuantitativa de la globina secundaria a mutaciones genéticas, cuya consecuencia puede ser una modificación estructural (hemoglobinopatías estructurales), una disminución de la síntesis de una cadena globínica estructuralmente normal (talasemias) o la persistencia de hemoglobinas neonatales en la edad adulta (Pérez, Reyes, Rodríguez y Torres, 2017).

2. Epidemiología

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las hemoglobinopatías representan un problema de salud importante en un 71% de 229 países y en ese 71% se producen el 89% de todos los nacimientos. Cada año nacen más de 330,000 niños afectados. Más de 275,000 concepciones presentan un trastorno de células falciformes con la necesidad de un diagnóstico y profilaxis temprana. Alrededor del 56,000 tienen una talasemia mayor, incluyendo al menos 30,000 personas que necesitan transfusiones regulares para sobrevivir y 5,500 mueren durante el período perinatal debido, principalmente, a la alfa talasemia mayor. Se estima que la frecuencia del estado de las personas que padecen rasgo drepanocítico es del 7% y cada año nacen de 300,000 a 400,000 niños enfermos, así mismo las hemoglobinopatías causan aproximadamente un 3.4% de defunciones entre los niños menores de 5 años. A nivel mundial, aproximadamente un 7% de las mujeres embarazadas son portadoras de talasemia β o α , o de hemoglobina S, C, D Punjab o E (Bernadette & Darlison, 2008; Hernández, Sánchez y García, 2017; Modell & Darlison, 2008).

Según estudios se ha calculado para América Latina una probabilidad de anemia falciforme (HbSS) de 0.16 por cada 1000 nacidos y para talasemia de 0.1. En poblaciones de origen africano-caribeño se ha calculado una frecuencia de 6.1% a 18% para HbS y de

0 a 5% para HbC. En 2006 la OMS presentó un informe en el que clasificaba a los países como El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá con tasas de incidencia de Talasemias y otras hemoglobinopatías mayores a 19 por cada 1000 nacidos y a Guatemala con una tasa menor a 0.1 (Anexo 2). Un estudio del 2011 de Panamá indica una tasa de incidencia de 68.6 por cada 1000 nacidos para hemoglobinas anormales, 54.5 para patrón FAS y una tasa de 0.08 por cada 1000 nacidos para anemia falciforme. Un estudio en Costa Rica determinó una incidencia de 1.26 por cada 1000 nacidos para variantes anormales de hemoglobina, recomendando extrapolar a cifras generales del país (Abarca, Navarrete, Trejos, de Céspedes y Saborío, 2008; Cossio, Chávez, González y Delgado, 2011; OMS, 2006).

La versión última (2008) del almanaque de Modell para la epidemiología global de los trastornos de hemoglobina (talasemias y trastornos de células falciformes) de la OMS, que incluía datos de trastornos como Hb H, alfa talasemia, Hb SC, Hb SS, Hb S/beta talasemia, beta talasemia Hb E/beta talasemia y otras menos comunes combinaciones, indicaba que en América 0.54 de cada 1000 nacidos son afectados por estos trastornos. En Centro América, hay 175 concepciones anuales con trastornos de células falciformes y 2 con β talasemias. Según el boletín, el país centroamericano con mayor tasa incidencia general por cada 1000 nacidos es Costa Rica con una tasa de 0.182, 0.034 para rasgo drepanocítico (HbSC) y 0.127 para anemia falciforme (HbSS). El Salvador presenta una tasa general de 0.072 y para anemia falciforme de 0.066; Honduras una tasa general de 0.003 y para anemia falciforme 0.002; Nicaragua una tasa general de 0.044 y para anemia falciforme 0.023; Guatemala una tasa general de 0.001, incluyéndose solo casos homocigotos de beta talasemia (Modell & Darlison, 2008).

El flujo génico de la HbS en América proviene exclusivamente del África, a excepción de una pequeña fracción aportada por inmigrantes europeos. Los genes talasémicos tienen un origen más amplio, fueron introducidos por europeos y en menor proporción por africanos y asiáticos. En Centro América las hemoglobinas S y C se presentan en individuos cuya ascendencia incluye raza negra de extracción africana. Se estima que las poblaciones indígenas de Centro América no presentan genes de talasemia; los pocos

informes de su presencia indican que se trata del producto de cruces raciales. Las frecuencias de estos trastornos pueden variar en las poblaciones étnicas de un mismo país. (Martínez y Colombo, 1985; Modell & Darlison, 2008; Sáenz, Altafulla, Sancho y Salgado, 1988).

En el año de 1999 se realizó el primer estudio de incidencia de anemia de células falciformes o hemoglobinopatía S en Guatemala, en la población de raza negra del barrio el Rastro en Puerto Barrios, determinando que en el grupo de 5 a 10 años de edad existía una incidencia de 3.6% para el test de células falciformes, siendo el sexo masculino el más afectado. Según Rodríguez, et al., la prevalencia de hemoglobinopatía S en población de raza negra es de 18,3 (Rodríguez, Sáenz y Chaves, 1998; Zúñiga, 1999).

3. Clasificación de hemoglobinopatías

Existen tres clases principales de hemoglobinopatías:

a. Hemoglobinopatías estructurales

Se producen cuando las mutaciones modifican la secuencia de aminoácidos de una cadena de globina, alterando las propiedades fisiológicas de las variantes de hemoglobina y provocando las manifestaciones clínicas características (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 2016; Sáenz, 1976).

b. Síndromes talasémicos

Surgen a partir de mutaciones que alteran la producción o la traducción del ARNm de la globina, lo que lleva a una biosíntesis deficiente de la cadena de globina. Las alteraciones clínicas son atribuibles al suministro inadecuado de hemoglobina y al desequilibrio en la producción de las distintas cadenas, lo que conduce a la destrucción prematura de

eritroblastos y eritrocitos. Las variantes de hemoglobina talasémicas combinan las características de la talasemia y de las hemoglobinopatías estructurales (CDC, 2016).

c. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal

Se caracteriza por la síntesis de cantidades elevadas de hemoglobina fetal en la edad adulta. A pesar de que la mayoría de las hemoglobinopatías son de carácter hereditario, existen hemoglobinopatías adquiridas, que comprenden las modificaciones de la molécula de hemoglobina por toxinas (CDC, 2016; Sáenz, 1976; Fundación para la Investigación y Apoyo a la Persona con Drepanocitosis y otras Hemoglobinopatías [FUNDREPA], 2014).

4. Hemoglobinopatías estructurales

Corresponden a alteraciones de la globina, secundarias a mutaciones genéticas, cuya consecuencia es una modificación estructural de la molécula de globina, alterando las propiedades fisiológicas de las variantes de hemoglobina y provocando las manifestaciones clínicas características. Aunque existen hemoglobinas resultado de mutaciones estructurales, las hemoglobinopatías de este tipo se pueden clasificar según la alteración en las propiedades fisiológicas de la hemoglobina:

- Alteración de movilidad electroforética de hemoglobina
- Alteración de la estabilidad
- Hemoglobinas que no consiguen mantener el hierro en estado reducido.
- Aumento o disminución de la afinidad por el oxígeno (CDC, 2016).

La mayoría de las sustituciones en la molécula de hemoglobina no tienen efectos importantes en su función y estabilidad por lo que los portadores heterocigotos usualmente no muestran anormalidades clínicas. Algunas de estas sustituciones pueden, no obstante, alterar las interacciones de la superficie entre las moléculas, llevando a cambios en las propiedades fisiológicas, constituyendo así hemoglobinas con relevancia clínica causantes

de hemoglobinopatías. A continuación se presentan las de mayor importancia y frecuencia (Beernadette & Darlison, 2008).

a. Hemoglobinopatías por alteración de movilidad electroforética de hemoglobina

i. Drepanocitosis o anemia de células falciformes

Es la más frecuente mundialmente y se halla hasta en 20% de las personas en algunas poblaciones africanas. En su forma heterocigota afecta al 8% de la población de raza negra en los Estados Unidos y al 25% de la población de raza negra africana, aunque también puede encontrarse con mucha menor frecuencia en Europa e Hispanoamérica. Las estadísticas más actuales estiman que afecta aproximadamente a 100,000 estadounidenses. La drepanocitosis se produce entre aproximadamente 1 de cada 365 nacimientos afroamericanos (menos del 0.01%) y entre aproximadamente 1 de cada 16,300 nacimientos de Hispanoamérica (En México se ha notificado una frecuencia variable en individuos mestizos, desde menos de 1% en el centro del país hasta más de 14% en las costas) (Peñaloza, Buentello, Hernández, Nieva, Lisker & Salamanca, 2008; Weatherall, 2004; CDC, 2016).

La drepanocitosis se hereda como un rasgo autosómico recesivo. Los portadores (heterocigotos) de este trastorno generalmente son asintomáticos. En el caso de que ambos padres sean portadores, los hijos tienen un riesgo del 25% de ser homocigotos para hemoglobina S y desarrollar drepanocitosis. El riesgo aumenta al 50% cuando uno de los padres presenta drepanocitosis y el otro solo es portador (Jarrett, Williams, Horn, Radford, & Wyss, 2016).

La hemoglobina S, variante que causa la drepanocitosis, tiene como consecuencia una polimerización anormal que resulta de una mutación en el sexto codón del gen de la globina beta ubicado en el brazo corto del cromosoma 11 y ocurre una sustitución del ácido

glutámico de la posición 6 de la cadena beta de globina por valina. Este cambio causa la formación de largas fibras de hemoglobina que distorsionan totalmente la estructura del eritrocito adoptando forma de “hoz”; estos eritrocitos se conocen como drepanocitos o células falciformes. Estos drepanocitos aumentan la viscosidad sanguínea y bloquean la circulación capilar en diferentes áreas del organismo, produciendo, como principal mecanismo fisiopatogénico, microinfartos (Peñaloza, et al., 2008; Bereciartúa, Bartolomé, Llamas, Asenjo y García, 2008).

La desoxigenación de las células con hemoglobina S produce una salida de potasio y agua, aumentando su contenido de calcio que, normalmente es expulsado, aumentando la densidad y, por ello, la tendencia de la hemoglobina S a polimerizarse. La adherencia de los eritrocitos al endotelio vascular ocurre como consecuencia de daño a las membranas celulares. El balance entre vasoconstrictores y vasodilatadores se altera a favor de los primeros y el flujo de la sangre se hace lento, de tal forma que los procesos de polimerización de la hemoglobina S, la deformidad de los eritrocitos y la vaso-oclusión ocurren antes del paso sanguíneo. La supervivencia de los eritrocitos también es afectada, acortándola a 20 días (De Haro, 2008; Azpiazu, 2001).

Así mismo, un porcentaje alto de neutrófilos se considera un factor de riesgo que puede producir la muerte en casos de anemia falciforme, pues estos interactúan con las células deformadas y el endotelio, que son estimuladas a liberar citoquinas dañinas. Por otra parte, los reticulocitos que son liberados prematuramente de la médula favorecen también la adherencia de los eritrocitos deformados al endotelio, de igual forma, las plaquetas activadas liberan trombospondina que promueve también adherencia y por este motivo, la crisis trombótica o vaso oclusiva ocurre en un 70% de los pacientes (López, De Julián, Bravo y Gómez, 2005).

El estado homocigoto es el conocido como drepanocitosis o anemia de células falciformes que se caracteriza por una anemia crónica con episodios intercalados de crisis hemolíticas. En ausencia de estas crisis, la sintomatología anémica es relativamente escasa

en relación con las cifras de hemoglobina, ya que la hemoglobina S tiene menor afinidad por el oxígeno, y la curva de disociación de la hemoglobina se desplaza hacia la derecha (Blanes y Ruiz, 2015).

La gravedad del cuadro clínico depende en parte de la concentración de hemoglobina fetal, ya que cuanto mayor sea ésta, menor será la posibilidad de que el eritrocito experimente alteraciones irreversibles de su forma y función. La mayoría de los pacientes sufren trastornos constitucionales (retraso de crecimiento), y las manifestaciones clínicas son consecuencia de las crisis vaso-oclusivas producidas por la obstrucción del sistema vascular por agregados eritrocitarios. Estas crisis suelen estar desencadenadas por infecciones bacterianas o víricas, deshidratación, desoxigenación o frío y se acompañan de dolor abdominal inespecífico o que simula una apendicitis o un cólico biliar, dolor articular, pleurítico u óseo (López, et al., 2005).

Los fenómenos oclusivos de la circulación cerebral u ósea son los más graves, ya que pueden producir convulsiones, déficit neurológico grave e incluso coma; los que ocurren en los huesos favorecen la aparición de áreas de infarto, sobre todo en las vértebras y necrosis aséptica de la cabeza de fémur (Bereciartúa, et al., 2008; Machín, Martínez, Gutiérrez, Svarch, Menendez, Gil... y López, 2016).

Los pacientes pueden desarrollar osteomielitis por *Salmonella enterica*. Las manifestaciones viscerales pueden afectar prácticamente todos los órganos y sistemas. Son frecuentes la insuficiencia cardíaca (las macroangiopatías son de mayor frecuencia, aunque el infarto de miocardio no es común); la formación de cálculos biliares y de infartos hepáticos que pueden abscesificarse, también se observan infartos de la médula. Una de las complicaciones más graves de la drepanocitosis la constituyen las crisis aplásicas, que pueden deberse a una infección por parvovirus B19 o a un déficit de folato, el cual manifiesta como una anemia hemolítica grave que aparece a los pocos meses de nacer, cuando la hemoglobina S reemplaza a la hemoglobina fetal. En los niños es frecuente encontrar esplenomegalia, que desaparece a medida que se producen infartos esplénicos

generando una atrofia esplénica (Gómez, Puigbert y Aramburu, 2003; Planas, Fernández, Cutiño, Navarro y Pascau, 2015).

La afectación renal comienza en la infancia, sus manifestaciones más comunes son la hematuria, la necrosis papilar renal y los defectos de la función tubular, todos ellos desencadenados por fenómenos vaso-oclusivos. Las consecuencias crónicas son las glomerulopatías falciformes (albuminuria hasta en un 68% de los adultos) con evolución a insuficiencia renal crónica hasta en un 20% de los pacientes homocigotos. También pueden producirse infartos de la microcirculación del ojo. Las alteraciones circulatorias cutáneas favorecen la aparición de úlceras crónicas, sobre todo en los tobillos. Debe tenerse en cuenta la posibilidad de que un paciente con drepanocitosis sufra, además, un déficit de glucosa-6- fosfato (Rodríguez, et al., 1998; Hernández, et al., 2017; Núñez, Hondal y Ayllón, 2011).

ii. Rasgo drepanocítico

Aproximadamente un 8.3% de afroamericanos presentan el rasgo drepanocítico. Este rasgo corresponde al estado portador heterocigoto para hemoglobina S. Los portadores no desarrollan anemia ni signos clínicos de la enfermedad. La morfología eritrocitaria es normal y no se observan drepanocitos en el frotis sanguíneo. En los portadores, la hemoglobina S representa el 45-50% de la cifra total de la hemoglobina (Rodríguez, et al., 1998).

Este estado parece conferir cierta protección frente a la malaria, motivo por el cual el gen puede haber persistido a lo largo del tiempo. Ocasionalmente sufren hematurias e infartos esplénicos cuando se exponen a situaciones de hipoxia prolongada (anestesia general y procesos neumónicos), estos casos también se conocen como rasgo drepanocítico. La alteración clínica más frecuente que puede presentarse es la renal, por lo que muchos portadores tienen hipostenuria o hematuria indolora. Se han descrito algunos casos de

pacientes con rasgo drepanocítico que han sufrido un episodio de rabdomiólisis tras el ejercicio intenso (Azpiazu, 2001; Gay, Garçon y Coppo, 2016).

iii. Enfermedad homocigótica por hemoglobina C

Es una hemoglobinopatía propia del África occidental, pero puede encontrarse con cierta frecuencia en países europeos como España. En Latinoamérica, su alta frecuencia en raza negra es indicativa de su origen africano centro occidental (Ghana, Alto Volta, Liberia, Sierra Leona, Costa de Marfil, Togo, Benin y Oeste de Nigeria). La hemoglobina C se caracteriza por la sustitución del ácido glutámico de la posición 6 de la cadena beta por lisina, por lo que las interacciones intermoleculares que promueven la cristalización de los tetrámeros C son presumiblemente polares. Al igual que la hemoglobina S, tiene una solubilidad disminuida dentro del eritrocito, tendiendo a cristalizarse (Yang, Voelkel, Lezon-Geyda, Schulz & Gallagher, 2017).

La enfermedad se produce en el estado homocigoto, que al igual que la hemoglobina S, se hereda como un rasgo autosómico. Se caracteriza por una ligera anemia hemolítica crónica con esplenomegalia. El estado heterocigoto es asintomático. Sin embargo, la patogenicidad puede ser acentuada cuando existe interacción con mutaciones, como por ejemplo la causante de xerocitosis, que en pacientes heterocigotos para el gen de la hemoglobina C se ha reportado que desencadena una hemólisis con somatocitosis (Yang, et al., 2017).

Aunque la hemoglobina C tiende a cristalizar en condiciones de hipoxia, no produce crisis vaso-oclusivas como las de la hemoglobina S. La morfología eritrocitaria se caracteriza por la aparición de dianocitos. La presencia de hemoglobina C interfiere en la determinación por cromatografía en columna de la hemoglobina A, cuyo aumento es característico de la beta-talasemia heterocigota (Rodríguez, et al., 1998).

iv. Hemoglobinopatías por variantes de hemoglobina menos frecuentes

La hemoglobina J fue descrita por primera vez en una familia afroamericana en 1956. En la actualidad se han identificado más de 48 tipos y pueden clasificarse como hemoglobina J en base a su movilidad electroforética. Estas variantes incluyen sustituciones de aminoácidos en ambas cadenas, alfa y beta, con anomalías de la cadena alfa que constituyen la mayoría de las variantes conocidas. Se han encontrado en Indonesia, India, China, en canadienses con descendencia francesa y española. Las hemoglobinas J se caracterizan por un movimiento electroforético rápido resultante de la sustitución de un residuo amino cargado negativamente en cadenas de globina α , β o γ (Ranjana & Sadhna, 2015).

Las variantes Meerut, Capetown y Birmingham de la hemoglobina J son las más comunes en Oriente. La variante Meerut fue reportada por primera vez cuando fue detectada accidentalmente al medir la hemoglobina a1c por el método de cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico (HPLC) en pacientes diabéticos, presentando un pico P3 anormal, arriba del 15%. Pueden ser diferenciadas e identificadas únicamente en su tiempo de retención. Presentan una incidencia de aproximadamente 1 en 4000 casos. La mayoría de estas variantes no produce síntomas hematológicos y raramente se detectan. Algunas variantes se han descrito como causantes de anemia hemolítica congénita, la hemólisis es incrementada con la enfermedad febril y la ingestión de medicamentos oxidantes, similares a la deficiencia de glucosa -6- fosfato-deshidrogenasa (G6PD) (Hegde, Bagalkot & Prashanth, 2011).

La hemoglobina D no produce trastorno alguno en estado heterocigoto. El estado homocigoto, muy infrecuente, produce una discreta anemia hemolítica, caracterizada por células en hoz. Se ha descubierto que cuando la hemoglobina D se asocia a la variante S, puede manifestarse fenotípicamente esta combinación por una anemia hemolítica de grado moderado con eritrocitos falciformes. La movilidad electroforética de la hemoglobina D es la misma que la de la hemoglobina S (Smith & Conley, 1959).

La hemoglobina E es la tercera más prevalente en el mundo (después de la A y la S), principalmente en el sudeste asiático (>15%) y en poblaciones negras, pero es rara en los chinos. El estado homocigoto no produce alteraciones clínicas, pero el hemograma es semejante al de las talasemias. El estado heterocigoto provoca sólo microcitosis discreta. La existencia de hemoglobina E se acompaña de manifestaciones clínicas y hematológicas cuando se asocia a hemoglobina S (doble estado heterocigoto) (Mendal, 1965; Sarnaik, 2005).

b. Hemoglobinopatías por alteración en inestabilidad de la hemoglobina

Se han reportado más de 250 hemoglobinas inestables de un total de 800 variantes descritas. Sólo las variantes de cadena alfa, beta y gama se asocian a manifestaciones clínicas, dado que las variantes de cadena delta, por su concentración baja, no ocasionan sintomatología. Si bien la mayoría de las hemoglobinas inestables dan sintomatología en los heterocigotos, también se han descrito pacientes homocigotos. Las hemoglobinas inestables han sido reportadas en diversos grupos étnicos, y casi un tercio de ellas son el resultado de mutaciones nuevas siendo los padres normales (Eandi, Noguera, Calvo, Ojeda, Bragós, Pratti... y Bonduel, 2009; Corrons, 2001).

El patrón de herencia es autosómico dominante, por lo que la enfermedad se manifiesta en portadores heterocigotos y las formas homocigotas probablemente sean incompatibles con la vida. Cabe destacar que, dentro de las hemoglobinas inestables, las mutaciones espontáneas se han descrito con gran frecuencia (Corrons, 2001).

Estas variantes resultan de sustituciones de aminoácidos en la cavidad del grupo hemo; alteración de la estructura secundaria de la hemoglobina; sustituciones de un aminoácido apolar por otro aminoácido polar, alterando la estructura terciaria o alteración en la superficie de contacto alfa/ beta que provoca disociación de las cadenas globínicas. Esto puede producir alteraciones que disminuyen la solubilidad y facilitan la formación de complejos de hemoglobina precipitada y desnaturalizada (cuerpos de Heinz), que ocasionan

el daño de la membrana y, finalmente, la destrucción prematura de los eritrocitos. La tinción con colorantes supravitales da a los eritrocitos un aspecto característico, por lo que estas anemias se denominaban antiguamente anemias hemolíticas con cuerpos de Heinz positivos (Delgado y Hernández, 2015).

El cuadro clínico puede ser muy variable, desde anemia hemolítica crónica congénita, hasta la ausencia de manifestaciones hematológicas, pasando por cuadros de anemia hemolítica crónica, candidatos a la esplenectomía. El principal desencadenante de las crisis hemolíticas sobreañadidas a la hemólisis crónica son los episodios febriles y, con menor frecuencia, la ingesta de medicamentos (principalmente sulfamidas) (Loovers, Tamminga, Mulder & Tamminga, 2016).

En América Latina se ha descrito la variante Hammersmith, segunda más frecuente en el mundo. La introducción de serina en la posición CD1 de la cadena de beta globina ocurre en la cavidad del grupo hemo, debilita la unión entre éste y la globina e incrementa su pérdida de las subunidades afectadas. Los grupos hemo libres inducen la desnaturalización y posterior precipitación de la molécula de hemoglobina, lo que resulta en el daño de la membrana y, finalmente, en la destrucción prematura de los eritrocitos. En estos casos se ha observado un desplazamiento de la curva de disociación de la hemoglobina hacia la derecha, lo que explica la tolerancia a niveles bajos de hemoglobina (Eandi, et al., 2009; Loovers, et al., 2016).

Las complicaciones que pueden presentar los pacientes con hemoglobina Hammersmith son: exacerbación de la anemia secundaria a infecciones o ingesta de fármacos oxidantes, eritroblastopenia secundaria a infección por parvovirus y/o litiasis vesicular. El tratamiento de estos pacientes requiere: la suplementación con ácido fólico, la recomendación de no ingerir fármacos oxidantes y los controles seriados de ecografía abdominal (Eandi, et al., 2009).

c. Hemoglobinopatías por alteraciones en la capacidad de mantener el hierro en estado reducido

i. Metahemoglobinemia y cianosis

La metahemoglobina es un derivado de la hemoglobina obtenido por la oxidación del hierro del grupo hemo, que se convierte en ión férrico, siendo incapaz de captar oxígeno y, por tanto, de transportarlo, originándose hipoxia hística. Los eritrocitos normales contienen menos del 1% de metahemoglobina, ya que es reducida constantemente por la enzima NADH-metahemoglobina reductasa, con el citocromo b-5 como electrón transportador (Sáenz, 1976).

La metahemoglobinemia puede clasificarse según la etiología en congénita o secundaria a la acción oxidante inducida por ciertas sustancias. Para aclarar su etiología es preciso descartar episodios similares familiares y personales debidos a formas hereditarias (hemoglobinopatía, enzimopenias) y antecedentes de ingesta o exposición a productos oxidantes. Hasta el momento se han descrito cinco moléculas de estas hemoglobinas. La única alteración clínica que producen es cianosis en varios miembros de la misma familia y no requiere tratamiento (Basulto, Manera y Baladia, 2014).

Clínicamente se manifiesta con cianosis progresiva de tono gris pizarroso, de instauración rápida (30-60 minutos), más visible en mucosas, cara y extremidades, que se acentúa con el llanto y no responde a oxigenoterapia, unida a taquicardia y apolúnea. A veces se manifiesta anemia hemolítica y cuando la cifra de metahemoglobinemia es superior al 20%, policitemia compensadora. En los casos graves se llega a un estado de delirio, somnolencia o agitación psicomotriz, convulsiones y coma. Las concentraciones de metahemoglobina del 70% son letales (Sánchez, Del Moral, Rodríguez, Casso y De Guevara, 2008).

d. Hemoglobinopatías por afinidad al oxígeno alterada

i. Poliglobulia o eritrocitosis familiar por alta afinidad a oxígeno

Algunas mutaciones en la molécula de hemoglobina pueden originar cambios que generan una mayor afinidad por el oxígeno, que no es liberado de forma óptima en condiciones de hipoxia tisular. Como consecuencia, se produce un aumento de la síntesis de eritropoyetina y eritrocitosis secundaria. Rara vez el aumento de número de eritrocitos ocasiona trastornos y la única manifestación analítica de estas hemoglobinopatías es un aumento del hematocrito, que puede observarse en varios miembros de la misma familia. (Sáenz, 1976; Amaru, Miguez, Peñaloza, Torres, Vera, Velarde... y Cuevas, 2013).

La hemoglobina Chesapeake, presenta una sustitución de leucina por arginina en el residuo noventa y dos de la cadena alfa. Se asocia con niveles significativamente altos de hematocrito en portadores heterocigóticos. Aumenta la afinidad de oxígeno en sangre y se ha demostrado que esta es una propiedad que presenta esta hemoglobina (Charache, Weatherall & Clegg, 1966).

En algunos casos la carga eléctrica de la molécula de hemoglobina se altera y aparece una banda anómala en electroforesis. El estudio de la curva de disociación de la hemoglobina del oxígeno revela la anomalía. Los portadores de estas hemoglobinopatías no requieren tratamiento, aunque es aconsejable mantener el hematocrito por debajo de 0.55 L/L con flebotomías (Amaru, et al., 2013).

ii. Cianosis por baja afinidad a O₂

La cianosis puede ser central o periférica, la cianosis central resulta de la hipoxemia arterial causada por alteración de la función pulmonar (trastornos de difusión de oxígeno). La cianosis periférica aparece como resultado de la disminución del flujo sanguíneo periférico y de vasoconstricción. La cianosis central alude a un color azulado de la piel o de

las mucosas. Es secundaria a un grado importante de saturación arterial de oxígeno o a la presencia de hemoglobinas anormales, que impiden la adecuada unión del oxígeno a la hemoglobina. Para que la cianosis sea visible es necesario que los niveles de hemoglobina reducida sean superiores a 3 g/dL, o que los niveles de hemoglobina en sangre sean superiores al 15% del total de hemoglobina (Sánchez, et al., 2008).

Las variantes con baja afinidad al oxígeno pueden ser inestables o estables. Las inestables son las variantes Seattle, Freiburg y Tubinga. Las consideradas estables son la variante Agenogi, Yooshizuka, Kansas Beth Israel y Titusville. Sin embargo, casi todas hemoglobinopatías congénitas asociadas a cianosis se deben a la presencia de metahemoglobinas. Se ha observado que la hemoglobina Titusville no produce un síndrome anémico y produce una saturación de oxígeno y una presión parcial de oxígeno en la sangre arterial de 88%. Los estudios en estos pacientes no revelan síntomas ni enfermedad cardíaca (Ostrander & Green, 2011).

5. Talasemias

Son un grupo heterogéneo de alteraciones congénitas, cuya característica común es un defecto en la síntesis de una o varias de las cadenas de globina (Blinder, 2001). Donde sus nombres derivan, de acuerdo a la cadena que ha dejado de sintetizarse, así como la beta-talasemia, alfa-talasemia y delta beta-talasemia. Presentan un patrón de herencia autosómica dominante al ser trastornos hereditarios (Vives, 2001).

Hay un desequilibrio entre cadenas alfa y beta por la disminución de la síntesis de las cadenas de globina, lo que provoca una acumulación anormal de globina, siendo estos los responsables de una destrucción precoz de eritroblastos, tanto en la médula ósea como en la sangre periférica, lo que causa hemólisis (Vives, 2001, Steinberg, Forget, Higgs & Weatherall, 2009).

a. Beta-talasemia

Síntesis deficiente de las cadenas beta de globina y exceso de cadenas alfa globina, lo cual provoca la formación de tetrámeros insolubles, que precipitan y dañan la membrana de los glóbulos rojos, por lo que se presenta una eritropoyesis ineficaz y hemólisis (Hernández, Hernández, Juncá, Vives y Vega, 2004). Entre ellas se encuentran:

- Talasemia menor: estado heterocigoto de una mutación del gen beta.
- Talasemia mayor: estado homocigoto de una mutación de dos genes de la cadena beta.
- Talasemia intermedia: presencia de anemia, síndrome hemolítico y esplenomegalia, con clínica expresada de diferente intensidad (Malcorra, 2001).

La beta talasemia se ha observado asociada a las variantes de hemoglobinas S, C y a niveles elevados de hemoglobina fetal, conduciendo esto a una alta variabilidad clínica en cada grupo de pacientes (Bravo, Arends, Montilla, Velásquez, García, Álvarez, Guevara y Castillo, 2004).

b. Alfa-talasemia

La forma más frecuente de éstas, es la delección de genes de globina, existiendo diferentes formas:

- Portador silente: delección de un solo gen.
- Talasemia menor o rasgo talasémico: delección de dos genes.
- Hemoglobinopatía H o de grado intermedio: delección de tres genes.
- Hemoglobinopatía de Bart o talasemia mayor: delección de cuatro genes (Goñi, Galindo y Goñi, 2008).

c. Delta/beta-talasemia

Existencia de un defecto en la síntesis de cadenas beta y delta, puede ser de carácter heterocigoto u homocigoto (Aguilar, Solomon, Cooper, Welker, Pennycuf, Scott & Flanagan, 2013; Efremov, 1978).

d. Dobles estados heterocigotos (SC) (SD), (S-β-talasemia)

En el estado heterocigoto pueden combinarse dos variantes anormales de hemoglobina y dar lugar a síndromes drepanocíticos similares al estado homocigoto que causa la anemia falciforme (Pujadas y Viñals, 2016).

El síndrome drepanocítico por hemoglobina SC resulta de una combinación de la hemoglobina S y la hemoglobina C, razón por la que se le denomina doble heterocigota. Los síntomas más importantes suelen presentarse hasta la adolescencia y se acentúan después de los 30 años. Algunas de las complicaciones clínicas son similares a la drepanocitosis, pero en un grado más leve. La anemia hemolítica y la esplenomegalia son moderadas aunque las infecciones son frecuentes y la retinopatía proliferativa es más frecuente y grave. El crecimiento y el desarrollo sexual son normales, se ha evidenciado coriorretinitis y daño neurológico (Al Jama, Gasem, Burshaid, Rahman, Al Suleiman & Rahman, 2009).

Otros síndromes similares son causados por la hemoglobina SE y la hemoglobina S-betatalasemia, en esta última se hereda un gen de hemoglobina S y un gen de talasemia. Debido al aumento de la frecuencia de los genes, tanto de la Hb S como de la talasemia β en grupos de poblaciones similares, la herencia de ambas anomalías es relativamente frecuente. La combinación hemoglobina S-betatalasemia produce un cuadro clínico de gravedad similar al de la drepanocitosis. El trastorno produce síntomas de anemia moderada y muchas de las mismas condiciones asociadas con la anemia falciforme, en un grado más leve, aunque en condiciones particulares también podrían producirse

exacerbaciones graves. Dependiendo del patrón genético, tienen una presencia mayoritaria de hemoglobina S (90-95%), algunos casos reportados presentaron un 8.2% de hemoglobina S y un 2.4% para la hemoglobina C (CDC, 2016; Belisário, Martins, Brito, Rodrigues, Silva & Viana, 2010).

Muchos pacientes de drepanocitosis están en transfusiones crónicas para prevenir el accidente cerebrovascular y otras complicaciones. Se realizan pruebas post-transfusión de rutina que incluye electroforesis de hemoglobina, principalmente para evaluar el nivel de hemoglobina S. El objetivo en todo tipo de paciente con algún síndrome drepanocítico es mantener el hematocrito en 25% a 30% y la proporción de hemoglobina S por debajo de 30% (Swedan, Nicol, Moder & Kahwash, 2008).

6. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal

La hemoglobina fetal puede encontrarse ocasionalmente en cantidades sustancialmente altas en personas saludables. Esta condición hematológica se conoce con el nombre de persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal, correspondiendo este término a una anomalía hereditaria específica, genética pleomórfica, que se presenta a través de la vida de los pacientes sin presencia de anemia y de otras manifestaciones clínicas. La hemoglobina fetal presenta una baja afinidad al 2,3-BPG, por lo que tiene una mayor afinidad con el oxígeno. Este incremento de afinidad al oxígeno con respecto al de la hemoglobina A, se debe a que la hemoglobina F la constituyen dos α/γ dímeros, a diferencia de los α/β dímeros de la hemoglobina A. En Latinoamérica se han reportado casos en Jamaica, Curazao, Surinam, Colombia, Honduras y México (Rivera, Palencia, Espinal y Peña, 2016).

Los infantes recién nacidos poseen los genes estructurales para las cadenas beta y delta y aún para las gama, con una preferencia en la producción de cadenas gama. Durante los primeros meses de los infantes, los genes operadores interrumpen la producción de cadenas gama e inicia la producción de cadenas beta y delta. En la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal la producción de hemoglobina F continúa en la vida adulta pues el

mecanismo genético operador-represor falla y continúa según el patrón intrauterino (Sáenz, Alvarado, Arroyo y Montero, 1975).

Sin embargo, se ha observado que la hemoglobina fetal tiene un papel protector en el periodo neonatal y en los primeros meses de vida de los niños con anemia de células falciformes, en quienes, debido a que el nivel de hemoglobina fetal es ligeramente superior al de la hemoglobina falciforme revierte su efecto hasta que los niveles de hemoglobina falciforme superan a los de la hemoglobina fetal (Rivera, et al., 2016).

C. TAMIZAJE NEONATAL

La prueba de tamizaje neonatal es útil para detectar a neonatos (menos de 28 días de nacidos) portadores de alguna patología congénita endocrina, infecciosa o errores del metabolismo antes de que la enfermedad se manifieste y, de ser posible, para prevenir alguna discapacidad física, mental o la muerte, a través del tratamiento precoz. Se considera una actividad preventiva en Salud Pública. La OMS estima que aproximadamente 300,000 recién nacidos mueren dentro de las primeras 4 semanas de vida cada año en todo el mundo debido a anomalías congénitas; en muchos otros casos estas patologías pueden contribuir a la discapacidad a largo plazo que pueden tener un impacto significativo en las personas, las familias, los sistemas de atención de salud y las sociedades (Evia, 2004; OMS, 2016).

El tamizaje puede llevarse a cabo antes de la concepción, siendo útil para identificar a neonatos en riesgo de trastornos específicos o el riesgo de transmitir una enfermedad por parte de la madre a su hijo. Este cribado detecta portadores y selecciona la historia familiar, la edad materna, joven o avanzada, así como el consumo de alcohol, tabaco y otros factores de riesgo. Sin embargo, en muchos países este tipo de evaluación diagnóstica se realiza en casos específicos. De forma rutinaria, los neonatos son sometidos a pruebas de tamizaje no diagnósticas para detectar posibles anomalías tiroideas (hipotiroidismo congénito), fibrosis quística, anomalías de glándulas

suprarrenales (hiperplasia adrenal congénita), enfermedades metabólicas como fenilcetonuria y galactosemia, siendo éstas las evaluadas en un tamizaje neonatal básico (Rojas y Walker, 2012; Jane, Benson & Bradford, 2010).

Para que una enfermedad sea incluida en un programa de tamizaje, debe de cumplir con los criterios establecidos por el “Committee for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Genetic Screening: Programmes, Principles and Research. National Academy of Sciences, Washington DC” en 1975:

- La enfermedad puede conllevar a morbilidad mental o física severa y/o mortalidad al no ser diagnosticada durante el periodo neonatal.
- El examen físico no es efectivo y no identifica la enfermedad en este periodo.
- Disponibilidad de un tratamiento eficaz.
- El tratamiento temprano mejora el pronóstico.
- La enfermedad tiene una incidencia elevada: mayor a 1 recién nacido por cada 10,000-15,000.
- Existe un test de tamizaje, rápido, sencillo, confiable y de bajo costo económico (Calderón, Jiménez y Losada, 2008).

El tamizaje debe garantizar una cobertura del 100%, lo que puede ser alcanzado solamente si la extracción de la muestra se realiza antes del alta de la maternidad. En España, la Comisión de Errores Metabólicos congénitos de la Sociedad de Bioquímica Clínica y Patología Molecular recomienda que la toma de muestra debe realizarse tan pronto como sea posible a partir de las 48 horas de vida. La muestra consiste en cuatro a cinco gotas de sangre capilar obtenida mediante punción del talón del neonato impregnando un papel filtro, el cual está establecido con un volumen estandarizado de muestra (tarjeta de Guthrie) (ver Anexo 3). Esta metodología fue estandarizada por Robert Guthrie, con la prueba de inhibición bacteriana para la determinación de fenilalanina y para el hipotiroidismo congénito a mediados de los años 70’s (Calderón, et al., 2008).

El sitio de punción del talón ha sido establecido a través del estudio de Blumenfeld, Turi & Blanc; la técnica evita lesionar el hueso calcáneo a través de una toma de muestra en las áreas laterales de la superficie plantar del talón. Las recomendaciones principales del estudio son:

- La punción debe hacerse en la porción más lateral de la superficie plantar del talón.
- No exceder de 2.4 mm de profundidad.
- No debe realizarse en la curvatura posterior del talón.
- No debe hacerse en sitios anteriormente puncionados, debido a que son considerados como potencialmente infectados.

La punción debe realizarse con lancetas especiales que hacen pequeñas incisiones de 1.0 mm de profundidad por 2.5 de largo (Vela, Ibarra y Fernández, 2014).

1. Tamizaje neonatal en Latinoamérica

Durante el año 2013 se conmemoraron los 50 años de inicio del programa de tamizaje a nivel mundial y han sido muchos los avances que se han tenido, siendo implementado y ampliado por la mayoría de países que han visto sus sistemas de salud pública con más posibilidades de mejorar la salud de sus ciudadanos. Actualmente, países como Brasil, Panamá y Costa Rica tienen contemplado dentro de sus leyes el programa de tamizaje neonatal, por lo que se cubre casi el 100% de neonatos. Estos países cubren el servicio de tamizaje neonatal a través de los servicios del seguro social y los hospitales generales como un derecho y hasta obligación en algunos casos (De Céspedes, Rocafort, Montero y Porras, 2003).

En Costa Rica, actualmente, la prueba de tamizaje permite la detección temprana de 29 enfermedades que se clasifican en: defectos en el sistema endocrino, defectos en el

metabolismo, hemoglobinopatías y defectos genéticos. El Programa Nacional de Tamizaje Neonatal dio inicio en marzo de 1990 en forma masiva en este país, siendo institucionalizado por la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) cumpliendo con el Decreto Ejecutivo N° 19504-S. De acuerdo con el Decreto, es obligatorio para el personal de salud tomar la muestra al recién nacido a los cuatro días de vida. En el caso de los niños hospitalizados se les toma la muestra en el período indicado, independientemente de su condición de salud y además, de acuerdo con el Decreto Ejecutivo, los consultorios y laboratorios clínicos privados pueden realizar la toma de la muestra en forma voluntaria y gratuita. En 2005 se incorporó el análisis de anemias hereditarias con la detección de seis defectos de hemoglobinopatías (De Céspedes, et al., 2003).

En América Latina, además de Costa Rica, el tamizaje neonatal presenta gran heterogeneidad. Uruguay, Chile, Cuba y Brasil son los países con mayor cobertura, alcanzándose desde 2008, un promedio de 95.3% de los recién nacidos. En países como Colombia solo se tamiza el hipotiroidismo congénito. En Brasil durante el 2001 se promulgó una ley federal, a partir de la cual se alcanzó una cobertura del 80% para tamizaje de fenilcetonuria, hipotiroidismo congénito y hemoglobinopatías. De igual forma, en el 2009, Panamá creó el Programa Nacional de Tamizaje Neonatal a través del decreto No. 323, incluyendo entre los errores innatos del metabolismo y las hemoglobinopatías (Queiruga, Lemes, Ferola, Machado, Queijo y Garlo, 2010; Lobo, Bueno, Moura, Ogeda, Castilho & Carvalho, 2005).

2. Tamizaje neonatal en Guatemala

En Guatemala, por medio del Acuerdo 788-2002 el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, estableció como obligación la realización de la prueba de hipotiroidismo congénito en todos los recién nacidos de hospitales de la red nacional. Varias instituciones públicas tienen programas de medicina preventiva, entre ellas el Hospital General San Juan de Dios y el Hospital Roosevelt. El laboratorio de Medicina Nuclear del Hospital Roosevelt en agosto del 2004 implementó el programa de tamizaje neonatal para la detección de

hipotiroidismo congénito de los neonatos nacidos en dicho hospital. Hasta el 2011 tenía una cobertura del 70% de neonatos tamizados dentro del Hospital (Duarte, Velásquez, Coronado y Soto, 2011).

En 1999, el programa de tamizaje neonatal del Hospital General San Juan de Dios detectó 23 neonatos con hipotiroidismo congénito estableciéndose una incidencia de 1:1,350 para la ciudad Capital, Sacatepéquez y Amatitlán (Oliva, 2004).

En el 2003 se determinó una incidencia para hipotiroidismo congénito de 1:1666 a nivel nacional abarcando todos los nacimientos de los hospitales nacionales y centros de salud del país (Oliva, 2004).

a. Programa de tamizaje neonatal en el Hospital General San Juan de Dios

El Hospital General San Juan de Dios implementó el tamizaje neonatal para hipotiroidismo congénito desde 1991 hasta abril del 2005, fecha en la cual el programa quedó inhabilitado, por lo que se reinició en agosto del año 2005 el área de tamizaje neonatal del laboratorio clínico del hospital, implementando nuevas pruebas para la detección de hipotiroidismo congénito, hiperplasia adrenal congénita, galactosemia y fenilcetonuria, atendiendo únicamente a los neonatos nacidos en el hospital (Duarte, et al., 2011).

Las pruebas realizadas son:

- Tirotropina (TSH) neonatal para detección de hipotiroidismo congénito.
- 17- hidroxiprogesterona con el fin de detectar hiperplasia adrenal congénita.
- Tripsinógeno inmunorreactivo (IRT) para fibrosis quística.
- Patrón de hemoglobinas para hemoglobinopatías.

En agosto de 2006, el programa de tamizaje neonatal del Hospital General San Juan de Dios, incorporó la detección de hemoglobinopatías, específicamente de las variantes estructurales S, C, D y E (Duarte, et al., 2011).

b. Otros establecimientos en Guatemala que ofrecen tamizaje neonatal

Algunas instituciones privadas, tal como el Instituto en Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM) y Cerdón de Vida, cuentan con un perfil ampliado de pruebas de tamizaje neonatal, en las que se incluyen:

- Galactosemia
- Fenilcetonuria
- Perfil de aminoácidos y acilcarnitinas
- Acidemias orgánicas
- Defectos del ciclo de la urea
- Deficiencia de biotinidasa (Fundación Rozas-Bostrán, 2014).

D. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TAMIZAJE DE HEMOGLOBINOPATÍAS

El diagnóstico se ha basado principalmente en tres herramientas:

- Básicas: incluye hemograma donde es considerando el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, VCM, HCM y el tamaño de los glóbulos rojos, así como su morfología, recuento de reticulocitos y la cinética del hierro.
- Complementarias: permiten la separación de proteínas según la carga eléctrica y la cuantificación de los tipos de hemoglobinas. Estas son utilizadas para el tamizaje neonatal. Algunos de los métodos más utilizados son: enfoque isoelectrico (IEF) y cromatografía líquida de alta resolución.

- Confirmatorias: Estudios genéticos que permiten la identificación de mutaciones, pueden ser acompañados de algunos estudios electroforéticos específicos para determinadas variantes (Old, 2007).

1. Pruebas de tamizaje neonatal de hemoglobinopatías

En el diagnóstico de hemoglobinopatías se utilizan técnicas que difieren en las variantes de hemoglobinas detectadas: Los métodos principales son enfoque Isoeléctrico (IEF), cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico (HPLC) y los diferentes tipos de electroforesis (Rouessac, 2003) (Ver Anexo 4).

a. Electroforesis en membrana de acetato de celulosa (alcalino)

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica. En la electroforesis en membrana de acetato se utiliza una membrana de acetato de celulosa como sustrato a un pH alcalino de 8.4-8.6 y generalmente se utiliza un buffer alcalino tris-ácido etilendiaminotetraacético (Tris-EDTA) con ácido bórico. La hemoglobina, al ser una proteína cargada negativamente a pH alcalino, puede migrar hacia el ánodo (+), lo cual permite que se separen las variantes de hemoglobina y por lo tanto puedan ser visualizadas usando Ponceau S, Amidoblack y Violeta ácido, comparando con estándares. La hemoglobina y el porcentaje de sus bandas es cuantificada por densitometría. El método permite la separación rápida de las variantes A, S y C. Sin embargo, presenta limitada sensibilidad y algunas hemoglobinopatías pueden no presentar cambio de carga y por lo tanto no ser identificadas (Cela, Beléndez y Galarón, 2009; Sebia, 2015).

En todos los tipos de electroforesis, cuando hay variaciones en la hemoglobina se hacen presentes fracciones anormales, donde la sustitución de aminoácidos causada por mutaciones, provocan una movilidad electroforética diferente (Watson, Baker, Bell, Gann, Levine y Losick, 2008).

b. Electroforesis en agar citrato (ácido)

Esta metodología ocurre a un pH de 6.2 y es utilizada para la separación de algunas variantes que no son separadas en electroforesis en medio alcalino, como las variantes de hemoglobina C, E y la variante O-Arab. Así mismo permite una separación adicional de las variantes S, D y G, presenta una mayor sensibilidad para la detección de las variantes F (Cela, et al., 2009).

c. Electroforesis capilar

La técnica se basa en diferentes velocidades de migración según la carga que posea la hemoglobina, donde se utiliza un buffer alcalino (pH 9.4) para la migración de las especies de la muestra en disolución. La detección ocurre a 415 nm. Esta técnica permite separar bastante bien biomoléculas donde la cromatografía líquida se muestra menos eficaz, así como también compuestos de pequeña masa molecular, difíciles de estudiar por los procedimientos clásicos. La hemoglobina S es muy detectada con esta técnica (Osatinsky, 2007; CDC, 2015).

d. Enfoque isoelectrico (IEF)

Esta es una variante de electroforesis, la separación ocurre en un medio de gel que tiene un gradiente de pH. Cuando se aplica un alto voltaje, se crean zonas estrechas con niveles estables, pero ligeramente diferentes. Las proteínas más lentas migran a través de estas zonas y se detienen en sus puntos isoelectricos individuales, cuando el movimiento es igual a cero. La resolución es clara con la diferenciación de las variantes C de E y O, la variante S de D y G y la hemoglobina A de la variante F también se diferencia claramente. La identificación de banda se logra por comparación con patrones de migración de estándares. Este método permite una mayor precisión y cuantificación que la electroforesis estándar. Proporciona una excelente resolución además de un alto rendimiento, pero también requiere mucha mano de obra y consume mucho tiempo, así mismo la necesidad de un método

alternativo para confirmar o diferenciar variantes de hemoglobina (Barrios y Granda, 1983; Valcarcel y Gómez, 1988).

e. Cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico (HPLC – por sus siglas en inglés-)

La técnica es considerada como el estándar de oro en muchos países de Latinoamérica. Utiliza una pequeña columna o cartucho analítico que en el interior contiene una resina o material polimérico de intercambio catiónico. Se emplean dos soluciones buffer de fosfato para la elución, de distintas concentraciones, introducidas en un flujo analítico, con la capacidad de detectar variantes de la hemoglobina. Las hemoglobinas se separan mediante intercambio catiónico en base a su interacción iónica con el cartucho. Las fracciones separadas pasan a través de una celda de flujo donde la absorbancia se mide a 415 nm y de nuevo a 690 nm. Los cambios en la absorbancia se monitorean con el tiempo produciendo un cromatograma (Giménez, Chacín, Bravo, Gómez, Montilla, Merzón,... y Arends, 2009).

Cada hemoglobina tiene su propio tiempo de retención característico y se mide desde el momento de la inyección simple en el equipo hasta el punto máximo de cada pico. La identificación de hemoglobina desconocida se logra a través de la comparación con los tiempos de retención de hemoglobina conocidos. Si un pico se eluye a un tiempo de retención no predeterminado, se marca como un valor desconocido (López, Ballas, Bonini, Moura, Matos, Perez & Farias, 2013).

La HPLC consigue una buena separación y cuantificación de HbF y HbA2 además de la detección de hemoglobinas variantes junto con talasemia. Esta metodología tiene la ventaja de requerir pequeños volúmenes de muestra para el análisis, permitiendo una identificación de una mayor proporción de variantes de la hemoglobina en comparación con la electroforesis en gel. Por lo que se considera un método rápido, sensible, preciso y permite el análisis de un mayor número de muestras, obteniendo resultados confiables y en un

tiempo adecuado (Bravo, et al., 2004; Lobitz, Frömmel, Brose, Klein & Blankenstein, 2014).

Uno de los equipos más utilizados que utiliza la técnica de HPLC, es el equipo VARIANT nbs de la marca Bio-Rad ®, que tiene como principio la cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de luz visible. Este equipo identifica la presencia de hemoglobinas normales (Hb F y A) y anormales (Hb S, D, C y E) (Sorroche y Saenz, 2014; Ivo, Araujo, Barbieri, Correa, Pontes & Botelho, 2014).

2. Diagnóstico confirmatorio

Los resultados que demuestren homocigocidad para una variante de hemoglobina, doble heterocigocidad, hemoglobinas desconocidas o sospecha de transfusiones de sangre requieren una confirmación posterior. A partir de ello se debe realizar pruebas confirmatorias con métodos electroforéticos específicos, una segunda confirmación con HPLC, recuentos sanguíneos, tipificación de fenotipos de grupo sanguíneo y por último estudios genéticos. Si el diagnóstico de la presencia de hemoglobinopatía es confirmado, se debe dar seguimiento al paciente (López, et al., 2013).

Los métodos moleculares utilizados para las hemoglobinopatías generalmente son tres: Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), discriminación alélica usando datos de punto final de PCR (Polymerase Chain Reaction) en tiempo real y secuenciación de ADN (Sillero, Ruíz y Sánchez, 2012).

a. Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP)

Este método utiliza las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción que corresponden al alelo normal o al alelo mutado de un gen. Si la secuencia de reconocimiento está presente, la enzima restringirá (cortará) el ADN y la diferencia de

tamaño se puede visualizar mediante electroforesis en gel. El ADN se extrae primero de manchas de sangre seca y se amplifica utilizando PCR. Si la muestra tiene hemoglobina normal (HbAA), la enzima corta el ADN en los fragmentos 106 pb y 19 pb. La banda de 106 bp es visible, pero la banda de 19 bp es demasiado pequeña para ver en el gel. Si el único producto visto es 125 pb, ambos alelos tienen la mutación S (SS), se considerará que la muestra posee tanto un alelo A como S (AS) y se clasifica como portadora si se ven ambas bandas de 125 y 106 pb. Este método es fácil de realizar y analizar y es barato en comparación con los otros métodos moleculares (CDC, 2015).

b. Discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real

Se basa en la medición fluorescente al final de la PCR para determinar si una mutación está presente. Hace uso de un cebador delantero e inverso que abarca el área de interés, además de sondas de hidrólisis. Una sonda corresponde a la secuencia normal y otra a la secuencia mutada. El fluoróforo se unirá a cada cebador que emita fluorescencia; cuando la ADN polimerasa encuentra la sonda unida, la actividad de la exonucleasa 5'-3' de la polimerasa lo degrada provocando que la molécula fluorescente sea liberada, separándose para que ocurra la medición de la fluorescencia (Saiki, Scharf, Faloona, Mullis, Ehrlich & Arnheim, 1985; Zang & McCabe, 1992).

c. Secuenciación de ADN

La secuenciación de Sanger es el método de detección de mutaciones y determina la secuencia exacta, abarcando el área de los cebadores utilizados. Una vez que el ADN es extraído de la muestra, es amplificado por PCR. Después de la amplificación, los productos son purificados por precipitación de ADN o por separación en columna, los cuales son cargados en una electroforesis capilar que separa los productos por tamaños basados en cargas (Sanger, Nicle & Colon, 1977).

IV. JUSTIFICACIÓN

En Latinoamérica, Costa Rica, Uruguay, Chile, Cuba y Brasil son los países con mayor cobertura del programa de tamizaje neonatal, alcanzándose desde 2008, un promedio de 95,3% de los recién nacidos. Incluso países como Brasil, Panamá y Costa Rica contemplan dentro del marco legal los programas de tamizaje neonatal. Lamentablemente en Guatemala la situación es distinta y los programas de tamizaje neonatal a nivel nacional no tienen tal cobertura, y solamente existe un acuerdo ministerial que regula el tamizaje neonatal para hipotiroidismo (M-SP-788-2002) (Díaz, *et al.*, 2011). El programa de tamizaje neonatal del Hospital General San Juan de Dios, incluye el diagnóstico de hipotiroidismo congénito, hiperplasia adrenal congénita y fibrosis quística. En julio de 2016, se inició el programa de tamizaje para la evaluación de hemoglobinopatías como consecuencia de los hallazgos encontrados en pacientes adultos que asisten a ese centro hospitalario (E. Montoya y M. Díaz, comunicación personal, julio 11, 2016).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la incidencia de hemoglobinopatías en los neonatos nacidos en el Hospital San Juan de Dios durante un período de 6 meses, lo que permitió generar información sobre las enfermedades detectadas por estos programas y así respaldar la necesidad de impulsarlos a nivel nacional, pues la detección temprana puede mejorar el estado general del paciente evitando deformaciones en el eritrocito que da aspecto de hoz, disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (cianosis) y hemólisis. Además, actualmente no se cuenta con información que respalde dichos hallazgos, por lo que es de importancia la realización de un análisis para conocer a la población afectada por enfermedades de carácter hereditario.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar la incidencia de hemoglobinopatías en neonatos del Hospital General San Juan de Dios.

B. Objetivos específicos

1. Cuantificar las variantes de hemoglobina en los neonatos del Hospital San Juan de Dios a través del método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
2. Identificar la cigocidad en los neonatos con variantes anormales de hemoglobina.
3. Tipificar la hemoglobina de los padres de los neonatos con variantes anormales de hemoglobina.

VI. HIPÓTESIS

La hemoglobina S es la causa más frecuente de hemoglobinopatías y de mayor incidencia en neonatos del Hospital General San Juan de Dios.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Neonatos nacidos en el Hospital General San Juan de Dios.

B. Muestra

Todos los neonatos nacidos en el Hospital General San Juan de Dios durante un período de seis meses.

C. Recursos

1. Recursos humanos

a. Seminaristas

- Br. Angélica Sarahí Chiroy Sicán
- Br. Andrea Celeste Jacinto Rangel

b. Asesores

- Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández, M.A.
- Lic. Eliseo Josué Albanés Gómez

2. Recursos institucionales

- Unidad de Inmunología y Hematología (UDIHEMA), Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Laboratorio Clínico y áreas de Post parto y Complicaciones Neonatales del Hospital General San Juan de Dios.

3. Recursos físicos

a. Equipos

- Agitador de placas, UPS, marca Powervar
- Multiponcher 1296-081 Wallac, marca Merck
- VARIANT nbs Newborn Hemoglobin System, marca Bio-Rad®

b. Materiales de laboratorio

- Jeringas de 10 mL y 20 mL
- Lancetas de 1.0 mm de profundidad por 2.5 mm de largo
- Pipetas automáticas de volumen variable de 250 μ L y 1000 μ L
- Placas de fondo en "U" de 96 pozos
- Puntas descartables para pipeta para volúmenes de 250 y 1000 μ L
- Tarjeta de Guthrie, de papel 903 de Whatman

c. Reactivos

- Agua tridestilada estéril
- Agua desionizada estéril
- Etanol 70%
- Marcadores FAES Y FADC: Liofilizado de células rojas humanas hemolizadas Marca Bio-Rad®
- Primer: Liofilizado de células rojas humanas hemolizadas. Marca Bio-Rad®
- Reactivo 1 Buffer de elución. Marca Bio- Rad

- Reactivo 2 Buffer de elución. Marca Bio- Rad®
- Wash Solución diluyente. Marca Bio- Rad®

D. Métodos

1. Recolección de datos

- Se proporcionó información a la madre de cada neonato sobre las pruebas a realizar, el procedimiento y su importancia.
- Se recolectaron los datos de la paciente, completando el cuestionario anexo a la tarjeta de papel filtro para toma de muestra.
- Los datos incluyeron:
 - Datos de la madre: Nombre, dirección, número de teléfono y/o celular, semanas de gestación y tipo de parto.
 - Datos del neonato: fecha de nacimiento, peso al nacer y género.
- Se procedió a entregar un consentimiento informado, el cual debían leer y firmar los padres del neonato (ver Anexo 5).
- Criterios de inclusión: Neonatos nacidos en el Hospital General San Juan de Dios, de edad no mayor a 40 días de nacidos.
- Criterios de exclusión: Neonatos nacidos fuera del Hospital General San Juan de Dios, sometidos a transfusiones sanguíneas previas, muestra recolectada insuficiente y sin firma de consentimiento informado.

2. Toma de muestra

- Se procedía a recostar al neonato en las camillas especiales proporcionadas en las Areas de Post Parto o en camillas disponibles en cada servicio, verificando que se encontraran limpias. En servicios como UCIN fue necesario utilizar barreras protectoras estériles (batas, cofias, mascarillas) para tamizar a los neonatos.
- Se inspeccionó y ubicó la zona de punción en el talón y se calentó por fricción.

- Se limpió la zona de punción con algodón impregnado con etanol al 70% y se dejó secar.
- La lanceta fue posicionada de forma perpendicular al pie en la zona de punción.
- Se presionó la lanceta, manteniéndola por 3 segundos sobre al área de punción, sosteniendo firmemente al pie.
- La primera gota de sangre fue descartada.
- Las gotas de 75-80 μ L de sangre fueron depositadas dentro de las áreas punteadas del papel filtro.
- Se limpió con algodón seco al área de punción y se colocó un algodón seco estéril con micropore.
- Las muestras fueron secadas y almacenadas a temperatura ambiente (20 a 22°C) para el análisis.

3. Procesamiento de la muestra

- Se extrajeron discos de 3 mm de diámetro del papel filtro con muestra utilizando el equipo Multiponcher 1296-081 Wallac o de forma manual.
Uso del equipo Multiponcher 1296-081 Wallac:
- El equipo Multiponcher 1296-081 Wallac y el software BSD 300, fueron encendidos.
- Se colocó la placa de microtitulación de 96 pocillos en la posición del test “hemoglobinopatías”.
- En el menú principal de BSD 300, se seleccionó la prueba.
- Se ingresó el código de barras de la primera muestra y automáticamente el equipo se posicionó en A3 de la placa de microtitulación de 96 pocillos (de los 96 pocillos se reservaron dos, A1 y A2, para los marcadores FADC y FAES).
- Al ingresar el código de barras de cada muestra se presionó el pedal disponible para realizar la extracción del disco de 3 mm de diámetro.
- Al finalizar se retiró la placa y apagó el equipo.
- Se agregó 250 μ L de agua tridestilada estéril a cada pocillo a partir del pocillo A3.

- Se agitó de 30 a 60 minutos, utilizando el agitador de placas.

4. Análisis

a. Mantenimiento previo

- Se encendieron los tres módulos del equipo VARIANT nbs Newborn Hemoglobin System: la estación de cromatografía Newborn Chromatography Station, el módulo de muestreo Newborn Automatic Sampler y el software de gestión de datos genéticos (Genetic Data Management).
- Manualmente se hidrató con agua desionizada estéril los pistones que se encuentran en el módulo de estación de cromatografía, utilizando la jeringa de 20 mL para los pistones de mayor calibre y la jeringa de 10 mL para el pistón de menor calibre.
- En la pantalla principal se eligió la opción de mantenimiento diario “*do start up actions*”.
- Durante el proceso de mantenimiento se verificaron los módulos, observando que la temperatura de la columna alcanzara los 34.7°C y la placa de muestras los 8°C. El funcionamiento de las bombas A y B debía estar en un 50% y las presiones de los pistones a 15 kg/cm².
- Al concluir el mantenimiento, se retornó a estado “listo o activo”.

b. Análisis de *primers*

- Se seleccionó la opción “lista de trabajo” y se eliminó la lista de trabajo anterior.
- Se seleccionó la opción “inyectar *primer*” y se definió la posición del pocillo de la placa en la que se encontraba el *primer* (al instalar una nueva columna cromatográfica, se debe inyectar el *primer* dos veces).
- El análisis de *primers* se inició.

c. Creación de lista de trabajo

- Se seleccionó a la opción de “*New worklist*”.
- Se seleccionó la opción de “*Normal Run*” y colocaron los datos de la persona que realizó el análisis para control del procedimiento.
- El número de pruebas disponibles fue verificado y se colocó nombre a la placa que se analizó.

d. Análisis de muestras

- Se ingresaron manualmente los datos de la nueva corrida de muestras, según código asignado.
- Se agregó 250 µL de los marcadores FAES y FADC a los pocillos A1 y A2, respectivamente.
- El análisis se inició.
- Al verificar y validar los resultados de los marcadores se continuó la corrida.

5. Procesamiento de resultados

- Los resultados indeterminados fueron verificados para repetir el análisis.
- Se validaron los resultados de hemoglobinas anormales, analizando el resumen del cromatograma en tiempo real, que incluye las clases de hemoglobinas encontradas en cada muestra y sus porcentajes.
- Se imprimió el resultado de los marcadores y lista de trabajo para el registro interno.
- Se imprimieron los resultados de las muestras positivas para hemoglobinas anormales. Incluyendo 3 copias, una para el registro interno, otra para el registro de resultados anormales y otro para el archivo del paciente.
- Los resultados ya verificados fueron transmitidos a la red, ingresando manualmente los datos al programa Hexa Lis.

- Posteriormente el supervisor del área o técnico asignado validó los resultados para su respectiva entrega.

6. Entrega de resultados

a. Resultados normales

- Al momento de realizar el tamizaje se llevó a cabo la toma de datos, dejando una copia a la madre, con la cual en un período de un mes debía llegar al hospital para que el programa de tamizaje neonatal hiciera entrega de su resultado, explicándole que las pruebas realizadas se encontraban normales, por lo que su hijo (a), no presentaría síntomas relacionados a dichas pruebas.

b. Resultados anormales

- A través de comunicación telefónica, se citó a los padres de familia del neonato con resultado positivo para hemoglobina anormal.
- Se realizó una breve explicación a los padres sobre el significado de una variante de hemoglobina; además se hizo de su conocimiento la necesidad de tomar muestra de sangre tanto al neonato como a ambos padres (si fuese el caso), es decir hematología y repetición de prueba de tamizaje.
- Se acordó una fecha en la que ambos padres pudieran hacerse presentes para la respectiva toma de muestras.

7. Seguimiento

- Se realizó un segundo análisis de hemoglobinas anormales al neonato y a los padres, donde se explicó con mayor detalle el significado de una variante de hemoglobina y el estudio que se llevó a cabo.
- Se entregó el resultado confirmatorio (ver Anexo 6).

- Se refirió al área de Hematología Pediátrica y se repitió el análisis de hemoglobinas anormales al neonato cada 2 meses o como lo requiriera el médico tratante.

8. Análisis de resultados

Estudio de tipo descriptivo transversal que consistió en:

- Identificar a todos los pacientes según las variables de tiempo, lugar y persona.
- Calcular la tasa de incidencia según la fórmula:

Incidencia= Número de casos nuevos / población en riesgo

Número de casos nuevos: neonatos con hemoglobinas anormales en un período de 6 meses

Población en riesgo: Neonatos tamizados nacidos en el Hospital General San Juan de Dios en un período de 6 meses

VIII. RESULTADOS

Durante los meses de enero, marzo, abril, mayo, agosto y septiembre de 2017 se llevó a cabo la prueba de variantes de hemoglobina por cromatografía líquida de alta resolución -HPLC- dentro del panel de tamizaje neonatal básico a 3006 neonatos de los servicios de Post parto, Complicaciones postnatales, Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos (UCIN), Nutrición, Espina bífida y Cunas. Los datos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Servicios hospitalarios para neonatos tamizados en el Hospital General San Juan de Dios

Servicio hospitalario	N	(%)
Post-parto	1505	50.07
UCIN	618	20.56
Complicaciones postnatales	425	14.14
Cunas	260	8.65
Nutrición	116	3.86
Espina Bífida	82	2.73
Total tamizados	3006	100

Fuente: Datos experimentales

* %: porcentaje; N: número de pacientes

De los 3006 neonatos tamizados, 23 neonatos (0.77%) presentaron patrón de hemoglobina anormal (Tabla 2).

Tabla 2. Patrón de hemoglobina detectado en neonatos del Hospital General San Juan de Dios

Patrón de hemoglobina	N	(%)
Normal (FA)	2983	99.23
Anormal	23	0.77
Total	3006	100

Fuente: Datos experimentales

* %: porcentaje; N: número de casos; FA: hemoglobina fetal y A

En la Tabla 3 se presentan los porcentajes de hemoglobina anormal respecto al sexo de los neonatos, siendo de 30.43 % para el sexo femenino (7 casos) y de 69.57 % para el sexo masculino (16 casos).

Tabla 3. Distribución de casos de hemoglobinas anormales respecto al sexo del paciente

Sexo	N	(%)
Femenino	7	30.43
Masculino	16	69.57
Total	23	100

Fuente: Datos experimentales

*%: porcentaje; N: número de casos

De los 23 casos que presentaron un patrón de hemoglobina anormal, 91% (21 casos) corresponde al patrón de hemoglobina anormal FAS (hemoglobina fetal, hemoglobina A y hemoglobina S), presentando una incidencia de 6.98 por cada 1000 recién nacidos; los casos con patrón FS (hemoglobina fetal, hemoglobina A) y FAC (hemoglobina fetal, hemoglobina A y hemoglobina C), ambos corresponden al 4% (1 caso), presentando una incidencia de 0.33 por cada 1000 recién nacidos.

La incidencia general indica que 7.65 de cada 1000 recién nacidos presentan un patrón de hemoglobina anormal (Tabla 4).

Tabla 4. Tasas de incidencia para los casos con patrón anormal de hemoglobina

Patrón de hemoglobina	N	(%)	IC 95%	Incidencia (por cada 1,000 nacidos)
FAS	21	91.30	71.96-98.93	6.98
FAC	1	4.35	0.11-21.95	0.33
FS	1	4.35	0.11-21.95	0.33
Incidencia general				7.65

Fuente: Datos experimentales

*IC: intervalo de confianza; %: porcentaje; N: número de casos; F: hemoglobina fetal; A: hemoglobina A; S: hemoglobina S; C: hemoglobina C

Los progenitores del 45% (10 casos) de un total de 22 casos positivos para variantes de hemoglobina, acudieron a la cita programada para realizar la evaluación de cigocidad correspondiente solamente a hemoglobina S, ya que no se cuenta con la metodología para detectar la variante de hemoglobina C en adultos (Tabla 5). De los 10 casos, se determinaron 8 heterocigotos, cuatro casos (40%) heredados por el padre y cuatro heredados por la madre. Un caso homocigoto (10%) y un caso indeterminado debido a que el padre no se presentó. El caso 11 no se presentó a las citas correspondientes a seguimiento, únicamente a la evaluación de cigocidad.

Tabla 5. Evaluación de cigocidad de casos con patrón de hemoglobina FAS y FS

Número de caso	Patrón de Hb del neonato	Patrón de Hb de la madre	Patrón de Hb del padre
2	FAS	AA	AS
3	FAS	AS	AA
4	FAS	AA	AS
5	FAS	AS	AA
6	FAS	AS	AA
7	FS	AS	AS
8	FAS	AA	AS
9	FAS	AA	NSP
10	FAS	AS	AA
11	FAS	AA	AS

Fuente: Datos experimentales

*Hb: hemoglobina; NSP: No se presentó; F: hemoglobina fetal; A: hemoglobina A; S: hemoglobina S

Al realizar el seguimiento de los casos con presencia de variantes de hemoglobina anormales, se evidencia que el 43% (10 casos) acudió a las citas programadas de toma de muestra para el análisis de patrón de hemoglobina por HPLC, mostrando un aumento significativo en el porcentaje de Hb S o Hb C respecto a la primer evaluación ($p < 0.05$). (Tabla 6).

Tabla 6. Seguimiento de casos con patrón de hemoglobina anormal

Caso	Patrón de Hb	Fecha de nacimiento	Fecha de tamizaje	% Hb S o C	Fecha primer seguimiento	% Hb S o C	Fecha segundo seguimiento	% Hb S o C
1	FAC	28/02/17	01/03/17	6	03/04/17	11.9	NSP	NSP
2	FAS	04/03/17	06/03/17	6.5	03/04/17	11.4	NSP	NSP
3	FAS	26/03/17	27/03/17	7.4	22/05/17	20.7	03/10/17	27.3
4	FAS	08/04/17	09/04/17	8.6	31/05/17	17.4	22/03/18	24.7
5	FAS	18/04/17	20/04/17	4.1	26/05/17	22.1	NSP	NSP
6	FAS	22/05/17	23/05/17	3.9	31/05/17	4.1	31/07/17	15
7	FS	24/05/17	26/05/17	11.7	12/06/17	27.2	22/03/18	58.8
8	FAS	24/05/17	26/05/17	6.4	12/03/18	31	NSP	NSP
9	FAS	26/05/17	28/05/17	5.6	14/06/17	14.3	NSP	NSP
10	FAS	11/09/17	13/09/17	3.6	12/03/18	27.8	NSP	NSP

Fuente: Datos experimentales

*Hb: hemoglobina; NSP: No se presentó; F: hemoglobina fetal; A: hemoglobina A; S: hemoglobina S

En el estudio se detectó un caso homocigoto para hemoglobina S. Ambos progenitores presentan un fenotipo heterocigoto para hemoglobina S (Tabla 7).

Tabla 7. Seguimiento de caso de paciente pediátrico homocigoto para hemoglobina S

Fenotipo del paciente	Fechas de tamizaje y seguimiento	% Hb S	Fenotipo de los progenitores
FS	26/05/17	11.7	Ambos AS
	12/06/17	27.2	
	22/03/18	58.8	

Fuente: Datos experimentales

*F: hemoglobina fetal; S: hemoglobina S

Al paciente homocigoto se le realizó un análisis de hematología completa al primer y décimo mes de vida. El primero reveló la presencia de linfocitosis, trombocitosis y eritrocitos normocíticos-hipercrómicos con una hemoglobina normal. El segundo análisis reveló valores disminuidos de hemoglobina, recuento de eritrocitos y hematocrito, con presencia de valores corpusculares normales (Tabla 8).

Tabla 8. Datos de análisis hematológico realizado a paciente homocigoto al primer y décimo mes de vida

Análisis	Valor al primer mes de vida	Valor al décimo mes de vida	Valor de referencia
Serie Eritrocitaria			
Eritrocitos (M/ μ L)	4.37	2.12*	4.04-6.13
Hemoglobina (g/dL)	15.14	6.26*	12.20-18.10
Hematocrito (%)	41.44	19.50*	37.70-53.70
V.C.M. (fL)	94.63	91.79	80-97
M.C.H. (pg)	34.58*	29.48	27-31.2
M.C.H.C. (g/dL)	36.54*	32.11	31.80-35.40
Serie Plaquetaria			
Plaquetas (K/ μ L)	469.80*	134.90*	142.0-424.0
Serie Leucocitaria			
Recuento total leucocitario (K/ μ L)	22.09*	13.01*	4.60-10.20
Neutrófilos (%)	25.47	51.16	37-80
Linfocitos (%)	60.29*	31.06	10-50
Monocitos (%)	8.56	16.36*	0-12
Eosinófilos (%)	2.69	0.15	0-7
Basófilos (%)	2.99*	1.27	0-2

Fuente: Datos experimentales

* Fuera del valor de referencia

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Durante los meses de enero, marzo, abril, mayo, agosto y septiembre de 2017 se llevó a cabo el tamizaje neonatal para hemoglobinopatías a 3006 neonatos de los servicios de Postparto, Complicaciones postnatales, Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos, Nutrición, Espina bífida y Cunas del Hospital General San Juan de Dios (Tabla 1).

Para establecer la incidencia de hemoglobinopatías, se realizó la prueba de detección de hemoglobinas anormales a través de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por el equipo VARIANT nbs Newborn Hemoglobin System en el panel de tamizaje neonatal básico.

De las 3006 muestras de sangre analizadas se detectó la presencia de variantes anormales de hemoglobina en 23 (0.77%) (Tabla 2). Según el patrón de hemoglobina anormal, respecto al sexo del paciente (Tabla 3), se encontró que el sexo masculino es mayormente afectado (n=16) que el femenino (n=7), sin embargo no hay datos recientes que atribuyan tener una variante de hemoglobina en relación al sexo (García, Cañedo y Pita, 2017). Cabe mencionar que en un estudio realizado en Cuba, se mostró un patrón de comportamiento en el que el sexo femenino predominó en presentar anemia de células falciformes o hemoglobina S homocigota (Borrego, Velázquez, Pérez y Torres, 2015).

Los 23 casos detectados (Tabla 4) de recién nacidos con patrón anormal de hemoglobina, en su mayoría (95.65%) corresponden a alteraciones estructurales de tipo hemoglobina S (HbS). Esta mutación se encuentra distribuida amplia y heterogéneamente por todas las Américas como resultado del flujo genético proveniente del África y una pequeña fracción aportada por inmigrantes europeos. En poblaciones de origen africano-caribeño se ha calculado una frecuencia de 6.1% a 18% para HbS y de 0 a 5% para HbC (Abarca, et al., 2008). Según la OMS, Costa Rica es el país centroamericano con mayor tasas de incidencia, 0.034 por cada 1000 nacidos (Cossio, et al., 2011; Modell & Darlison,

2008; Rodríguez, Sáenz y Chaves, 1998). Para la población estudiada en Guatemala la incidencia del fenotipo heterocigoto de este estudio fue de 6.98 por cada 1000 nacidos (Tabla 4).

Para el patrón FAC este estudio encontró una tasa de incidencia de 0.33 por cada 1000 nacidos (Tabla 4). No se han obtenido datos relevantes de esta mutación en la región de Centroamérica, su alta frecuencia en raza negra es indicativa de su origen africano centro occidental. Se conoce que en las islas y regiones que conforman la cuenca del Caribe, la prevalencia de la hemoglobina C oscila entre el 1.2% y el 6.4%. En Costa Rica se ha determinado que para el fenotipo AC hay una frecuencia de 0.14% en raza caucásica, 0.40% en híbridos y 3.72% en raza negra. El caso de patrón FAC determinado corresponde a un estado heterocigoto asintomático, sin embargo, es de importancia clínica porque este fenotipo puede interactuar con estados heterocigotos de hemoglobina S generando estados dobles heterocigotos favoreciendo la deformación falciforme, aunque con un curso más benigno que la anemia falciforme (Sáenz, Ramírez y Chaves, 1982; Sáenz, 2005).

Al ser las hemoglobinopatías de carácter hereditario y causadas por la sustitución de un aminoácido en una de las cadenas polipeptídicas de la hemoglobina, se consideró necesario determinar la cigocidad en los neonatos por parte de los padres, a través del análisis de la fracción de hemoglobina glicosilada por HPLC, permitiendo la identificación de variantes de hemoglobinas en el 45% (n=10) de los padres y madres que acudieron a la evaluación. En 5 de los 10 casos, la madre presentó un patrón de hemoglobina anormal y en 5 casos fue el padre quien presentó el patrón anormal (Tabla 5), es decir rasgo drepanocítico, lo cual corresponde al estado portador heterocigoto para hemoglobina S, quienes no desarrollan signos clínicos ni anemia ya que más del 50% de su hemoglobina es normal (hemoglobina A), siendo la morfología eritrocitaria normal y no se observan drepanocitos (células en forma de hoz) en el frotis sanguíneo (Rodríguez, et al., 1998).

Se consideró de importancia dicha evaluación ya que estudios han demostrado que ocasionalmente en algunos casos, pueden sufrir hematurias e infartos esplénicos al

exponerse a hipoxia prolongada, como al encontrarse a grandes alturas o ejercicios de alta demanda física, por lo que deben tomarlo en cuenta en su historial clínico, al ser sometidos a condiciones de anestesia general, así como al momento de procrear nuevamente. Cabe mencionar que en 1 de los 10 casos no pudo determinarse el patrón de hemoglobina por parte del padre ya que no se pudo contactar al mismo y por lo tanto no asistió a la cita.

Los casos heterocigotos para hemoglobina de tipo S, son conocidos como rasgo drepanocítico donde se presenta un gen que sintetiza una cadena β normal y un gen que sintetiza una cadena β S. Los individuos sintetizan la mitad de globina β con ácido glutámico y la otra mitad con valina, por tanto la Hb S en estas personas constituye un máximo de 35-45%, el resto corresponde a la hemoglobina normal A y A2. En la Tabla 6 se observan las variaciones a lo largo de los primeros meses de vida de los pacientes, mostrando un aumento significativo en el porcentaje de Hb S o Hb C respecto a la primer evaluación ($p < 0.05$). Por ejemplo, en el caso 5 a aproximadamente un mes de la realización del tamizaje la hemoglobina S ha variado de 4.1 a 22.1%, al igual que en los demás casos presentados en la tabla. En estos pacientes el porcentaje de hemoglobina fetal (HbF) seguirá disminuyendo, las concentraciones se estabilizarán en torno al 25%, y los pacientes no presentarán fenómenos de polimerización ni patología. Aunque el estado heterocigoto para hemoglobina S es considerado como una condición benigna, se han presentado casos en los que la disminución de oxígeno hasta un 2% provoca la deformación de los eritrocitos provocando hipoxia, acidosis, deshidratación e incluso fenómenos vasooclusivos (Agramonte, Expósito, Morales y Zamora, 2015). Los casos heterocigotos para hemoglobina C presentan un porcentaje similar ya que uno de los genes de globina β sintetiza cadenas con una sustitución de un residuo de ácido glutámico por un residuo de lisina (Rubio, García y Carrasco, 2004).

Los portadores, en su mayoría, desconocen que han heredado el gen, transmitiéndolo a sus descendientes y haciendo posible otras interacciones que generan el estado homocigoto, causante de la anemia falciforme, tal es el caso 7 de la Tabla 6. El caso FS es de suma importancia y es un dato revelador, ya que es el único caso que corresponde a una

hemoglobinopatía, anemia falciforme (Tabla 7). En la Tabla 4 se observa que en el estudio se ha determinado una tasa de incidencia de 0.33 por cada 1000 nacidos. Según la OMS Costa Rica posee una tasa de incidencia de 0.127 por cada 1000 nacidos. Estudios de incidencia en Panamá indican tasas de incidencia de 0.008 por cada 1000 nacidos para este fenotipo, definitivamente el dato determinado en el estudio es mucho más alto que en países aledaños. En nuestro país no existen datos de incidencia, el estudio más reciente (1999) realizado en Guatemala determinó una prevalencia de 3.6% en población de raza negra de Izabal (Modell & Darlison, 2008; Zúñiga, 1999). De hecho, uno de los progenitores del paciente es procedente de Izabal, Guatemala.

La anemia de células falciformes, la cual está ligada a la hemoglobina S (HbS), es una enfermedad autosómica dominante, que al presentar el estado homocigoto puede interaccionar con otras formas de hemoglobina, en particular con la hemoglobina fetal (Hb F) (Chaves, Amador y Sánchez, 2014). Al estar presente la Hb F hay una reducción de la polimerización de HbS, lo que explica, en el caso FS, la ausencia de anemia falciforme durante el período neonatal.

Por otro lado el paciente con hemoglobina FS presentó leucocitosis, trombocitosis y eritrocitos normocíticos-hipercrómicos, en la hematología realizada durante el primer mes de vida (Tabla 8). La leucocitosis durante la edad pediátrica es común debido a que el sistema inmunológico lo utiliza como un medio para el reconocimiento y eliminación de agentes extraños del organismo, habiendo un aumento de los linfocitos de manera natural, tal como en este caso, lo cual se mantendrá hasta los 2 a 4 años de vida aproximadamente (Guinea, 2012). La trombocitosis es un hallazgo frecuente en pacientes pediátricos, aunque se ha reportado trombocitosis secundarias relacionado a anemias hemolíticas (Caro, et al., 2014). El paciente presenta una elevada concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), que es el cálculo de la cantidad de hemoglobina que es transportada por el glóbulo rojo (Ribes y Ros, 2010), lo que se asocia a anomalías estructurales eritrocitarias como en la anemia falciforme y a la enfermedad de hemoglobina C homocigota (Rifkind & Cohen, 2002). Aunque no es posible estimar su asociación, pero de forma prematura estos

hallazgos ya son indicativos que en un futuro posiblemente este paciente presentará problemas estructurales eritrocitarios.

Aunque los resultados aún no indican manifestaciones clínicas clásicas, puesto que la expresividad aguda de los signos y síntomas se inicia a partir de los 4 años de edad aproximadamente (Ramos, 2016), se debe dar el seguimiento correspondiente tanto con un especialista hematólogo, como con los estudios de laboratorio, pues según la gravedad del caso podría presentar signos y síntomas antes de lo que la literatura indica. Además conforme la intensidad que demuestre la enfermedad, podría conllevar a la aparición de fenómenos de vasooclusión que ocurren por la polimerización de las moléculas ante la falta de transportar el oxígeno adecuadamente, aumentando la viscosidad de los glóbulos rojos, dando lugar a cambios en la membrana y deformación del eritrocito (células falciformes o de hoz), así como otras complicaciones relacionadas a infecciones, infartos mesentéricos con dolor abdominal, hipertensión pulmonar, insuficiencia respiratoria grave, entre otras.

El paciente homocigoto fue citado nuevamente el 22 de marzo de 2018, a los 10 meses de edad para realizar un seguimiento del caso. Se obtuvo una muestra para hematología y la tercera prueba de tamizaje neonatal para hemoglobinopatías. El paciente presentaba un aumento significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de hemoglobina S del 27.2 al 58.8% en un aproximado de 9 meses desde la última evaluación (Tabla 8). En estos pacientes el porcentaje de Hb S puede llegar incluso al 95%, por lo que como tratamiento de estas complicaciones los pacientes precisan transfusiones con frecuencia, incluso de modo profiláctico, para mantener el porcentaje en torno al 25%, e impedir fenómenos de polimerización.

A su ingreso el paciente presentaba un cuadro clínico sugestivo de crisis vasooclusiva. No es posible determinar la asociación y significancia estadística de la clínica del paciente con un cuadro de anemia falciforme debido a la limitada cantidad de datos recolectados. En la Tabla 8 se detalla que hay una disminución en todas las series de células sanguíneas (pancitopenia) con aumentos en la serie leucocitaria, específicamente de monocitos y

neutrófilos, que corresponde con el cuadro gripal que el paciente presentaba. Este tipo de infecciones pueden desencadenar crisis vasooclusivas en pacientes con anemia falciforme. Las crisis vasooclusivas se caracterizan por la obstrucción de vasos sanguíneos de pequeño calibre y por lo tanto la complicación en el paso del flujo sanguíneo, causando fiebre, ictericia, debilidad y malestar general (Rojas, Calderón, Vidal, Arroyo, García y Torres, 2015), cuadro clínico que coincide con el estado del paciente, presentando disminución en el recuento de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito (tabla 8). En pacientes con anemia falciforme, el recuento de eritrocitos suele ser entre 2 y 3 M/ μ L con reducción proporcional de la hemoglobina, como sucedió en el presente caso (Lichtin, s.f.).

Así mismo al realizar el frote periférico (Anexo 7) se determinó la presencia de células falciformes o en hoz, alteración morfológica que causa fenómenos de vasooclusión.

No es posible extrapolar los resultados obtenidos en este estudio a la incidencia real de la población Guatemalteca debido a la limitada cobertura y a que no se contemplan las diferentes regiones del país; sin embargo, estos resultados indican que las hemoglobinopatías son un problema importante de salud pública.

X. CONCLUSIONES

1. La incidencia general de hemoglobinas anormales encontradas en este estudio fue de 7.65 por cada 1000 recién nacidos. Los patrones de hemoglobina FS y FAC presentaron una incidencia de 0.33 por cada 1000 recién nacidos y el patrón de hemoglobina FAS presentó una incidencia de 6.98 por cada 1000 recién nacidos.
2. Durante las evaluaciones y cuantificación de hemoglobina S en los primeros meses de vida de los pacientes heterocigotos se determinó que presentaron un aumento significativo de concentraciones respecto a la primer evaluación ($p < 0.05$). En el paciente homocigoto hubo un aumento en el porcentaje de hemoglobina S al 58.8%, presentando complicaciones clínicas, tales como fiebre, ictericia, debilidad, malestar general y la presencia de células falciformes.
3. El 95% de los casos con patrón anormal de hemoglobina corresponden a alteraciones de tipo S. El 91% (21 casos) corresponde a patrón heterocigoto (FAS) y el 4% (1 caso) corresponde a patrón homocigoto (FS).
4. Se tipificó la hemoglobina de los progenitores de los neonatos con hemoglobina anormal S en el 45% ($n=10$) de los casos evaluados, en donde se determinaron 8 heterocigotos, cuatro casos (40%) heredados por el padre y cuatro heredados por la madre. Un caso homocigoto (10%) y un caso indeterminado debido a que el padre no se presentó. No fue posible tipificar la hemoglobina de los progenitores del caso FAC.
5. La variante de hemoglobina de tipo S fue la causa más frecuente de hemoglobinopatías y de mayor incidencia en neonatos del Hospital General San Juan de Dios, comprobando la hipótesis del estudio.

XI. RECOMENDACIONES

1. Establecer protocolos con un abordaje multidisciplinario, para la atención integral de los pacientes que presenten variantes de hemoglobinas en sus formas heterocigota u homocigota, proporcionando diagnóstico, seguimiento médico y tratamiento, en conjunto con la Unidad de Hematología, Pediatría y área de Tamizaje Neonatal del Hospital.
2. Se recomienda el establecimiento de programas de consejería en salud reproductiva para el control de hemoglobinopatías, tanto en pacientes ya diagnosticados, como en la población en general, a manera de prevención.
3. Realizar estudios demográficos para la determinación de la epidemiología de portadores de variantes de hemoglobina.
4. Dar seguimiento al estudio y realizar determinación de incidencia de síntomas y características clínicas tanto en población homocigota como heterocigota.

XII. REFERENCIAS

- Abarca, G., Navarrete, M., Trejos, R., de Céspedes, C. y Saborío, M. (2008). Hemoglobinas anormales en la población neonatal de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(3), 995-1001.
- Agramonte, O., Expósito, D., Morales, M. y Zamora, Y. (2015). ¿Es realmente asintomático el portador de hemoglobina S. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(2), 195-199.
- Aguilar, E., Solomon, R., Cooper, J., Welker, G., Pennycuf, C., Scott, D., & Flanagan, B. (2013). Physical and Mechanical Properties of the Human Red Blood Cells with Different Hemoglobin Types. *National Conference on Undergraduate Research*, 1(2), 534-540.
- Al Jama, F., Gasem, T., Burshaid, S., Rahman, J., Al Suleiman, J., & Rahman, R. (2009). Pregnancy outcome in patients with homozygous sickle cell disease in a university hospital, Eastern Saudi Arabia. *Archives of Gynecology and obstetrics*, 280(5), 793-7.
- Amaru, R., Miguez, H., Peñaloza, R., Torres, G., Vera, O., Velarde, J., et al. (2013). Eritrocitosis patológica de altura: caracterización biológica, diagnóstico y tratamiento. *Revista Médica La Paz*, 19(2), 5-18.
- Ariza, I.M. (2011). Niveles hemáticos como indicador del estado nutricional en una población de estudiantes de la UV (Tesis de Pregrado). Universidad Veracruzana. México. Recuperado de <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/29560/1/ArizaMorales.pdf>
- Azpiazu, J. (2001). Prevalencia de hemoglobinopatías en mujeres gestantes en el área sanitaria de Lanzarote. *Anales de medicina interna*, 23(5), 199-212.
- Barrios, G.B. y Granda, I.H. (1983). Variantes de alfa-1-antitripsina. *Revista Cubana*, 55, 384-6.

- Basulto, J., Manera, M., y Baladia, E. (2014). Ingesta dietética de nitratos en bebés y niños españoles y riesgo de metahemoglobinemia. *Revista Pedriatría de Atención Primaria*, 16, 65-69.
- Belisário, A.R., Martins, M.L., Brito, A.M., Rodrigues, C.V., Silva, C.M., & Viana, M.B. (2010). β -globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or $S\beta^0$ -thalassemia and their association with clinical and hematological features. *Acta hematológica*, 124(3), 162-70.
- Bereciartúa, M., Bartolomé, A., Llamas, E., Asenjo, J., y García, P. (2008). Necrosis aséptica bilateral de cabeza femoral. *Trauma (Majadahonda)*, 19(2), 85-87.
- Bernadette, M., & Darlison, M. (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*, 86(6), 480-487.
- Blanes, Y., y Ruiz, M. (2015). Criterios de severidad de los pacientes con anemia falciforme según sus cuidadores. *Panorama Cuba y Salud*, 6(4), 21-25.
- Blinder, M. (2001). *Anemia y terapia transfusional*. Washington: Editorial Mc Graw hill Interamericana.
- Blumenfeld, T.A., Turi, G.K., & Blanc, W.A. (1979). Recommended site and depth of newborn heel skin punctures based on anatomical measurements and histopathology. *Lancet*, 3, 230-3.
- Borrego, D., Velásquez, A., Pérez, O. y Torres, J.E. (2015). Caracterización clínico epidemiológica de niños tuneros con sickleemia. *Revista Dr. Zoilo Marinello Vidaurreta*, 40(5), 1-5.
- Brandan, N., Aguirre, M.V., y Giménez, C.E. (2008). Hemoglobina. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina UNNE, Argentina.
- Bravo, M., Arends, A., Montilla, S., Velásquez, D., García, G., Álvarez, M., Guevara, J., y Castillo, O. (2004). Ventajas de la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC-CE) en el estudio de hemoglobinopatías en Venezuela. *Investigación clínica*, 45(4), 203-213.
- Calderón, G., Jiménez, F., y Losada, A. (2008). Screening neonatal. *Protocolos diagnósticos terapéuticos de la AEP: Neonatología*, 423-33.

- Caro, G.L., García, A., Iglesias, M., Guillén, M., Cañedo, E., Martínez, I.,... Casado, J. (2014). Trombocitosis extrema reactiva en un niño sano de 6 años. *Anales de Pediatría*, 81(5), 318-321.
- Cela, E., Beléndez, C., y Galarón, P. (2009). Tratamiento de la púrpura trombocitopénica. *Anales de pediatría continuada*, 3(7), 156-70. doi:10.1016/S1696-2818(09)71120-5
- Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. (2015). Hemoglobinopathies: Current Practices for Screening, Confirmation and Follow-up. EEUU: Association of Public Health Laboratories.
- Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. (2016). *Anemia drepanocítica o de células falciformes: Rasgo drepanocítico*. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/sicklecell/traits.html>
- Charache, S., Weatherall, D., & Clegg, J.B. (1966). Polycythemia associated with a hemoglobinopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 45(6), 813.
- Chaves, W., Amador, D. y Sánchez, J. (2014). Anemia de células falciformes. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 23(3), 221-225.
- Corrons, J. (2001). Anemias por defectos congénitos de la hemoglobina: Hemoglobinopatías estructurales y talasemias. *Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 8(51), 2684-2693.
- Cossio, G., Chávez, T., González, D. y Delgado, M. (2011). Estudio preliminar de incidencia de hemoglobinopatías, en neonatos tamizados en el Hospital del Niño de Panamá de Agosto-diciembre 2009. *Revista Pediátrica de Panamá*, 40(1), 15-18.
- De Céspedes, C., Rocafort, M., Montero, T., y Porras, T. (2003). *Prevención de retardo mental y otras discapacidades por tamizaje neonatal masivo en Costa Rica*. Recuperado de: http://www.siiis.net/docs/ficheros/200406230001_24_0.pdf
- De Haro, T. (2008). Desarrollo de un método para la detección simultánea de las mutaciones más frecuentes de la beta-talasemia en España (Tesis Doctoral). Universidad de Granada. España.
- De la Torre, E., y Pelayo, E. (2007). *Pediatría*. Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- Delgado, A., y Hernández, J. (2015). Glaucoma de células fantasmas: reporte de caso. *Revista Médica MD*, 6(3), 214-217.

- Duarte, A., Velásquez, D., Coronado, C., y Soto, C. (2011). Evaluación del funcionamiento del área de tamizaje neonatal del Hospital San Juan de Dios (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Eandi, S., Noguera, N., Calvo, K., Ojeda, M., Bragós, I., Pratti, A., et al. (2009). Anemia hemolítica grave causada por hemoglobina Hammersmith. *Archivos argentinos de pediatría*, 107(4), 347-349.
- Efremov, G. (1978). Hemoglobins Lepore and anti-Lepore. *Hemoglobin*, 2(3), 197-233.
- Evia, J. (2004). Tamiz neonatal. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 51(3), 130-144.
- Forrellat, M., du Défaix, G., Gómez, H., y Fernández, N. (2000). Metabolismo del hierro. *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16(3), 149–60.
- Franco, L. (2010). La Hemoglobina: Una molécula prodigiosa. *Revista de La Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 104(1), 213–232.
- Fundación Rozas-Bostrán. (2014). *Tamizaje neonatal*. Recuperado de: <http://www.invegem.org/>
- Fundación para la Investigación y Apoyo a la Persona con Drepanocitosis y otras Hemoglobinopatías. (2014). *Hemoglobinas Anormales*. Recuperado de: <http://www.fundrepa.org/hemoglobinas-anormales/>
- García, R.G.; Cañedo, I.M., y Pita, J.A. (2017). Electroforesis de hemoglobina en hijos de madres portadoras de hemoglobinopatías SS y SC. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 22(1), 1-4.
- Gay, J., Garçon, L., y Coppo, P. (2016). Anemia hemolítica no inmunitaria. *EMC-Tratado de Medicina*, 20(4), 1-7.
- Giménez, G., Chacín, M., Bravo, M., Gómez, G., Montilla, S., Merzón, R., et al. (2009). Diagnóstico de hemoglobinopatías a partir de sangre del talón de recién nacidos en diferentes centros hospitalarios de Venezuela. *Anales de Pediatría*, 71(4), 314-318.
- Gómez, M., Puigbert, J., y Aramburu, J. (2003). Drepanocitosis: experiencia de un centro. *Anales de Pediatría*, 2(58), 95-99.
- Goñi, M.C., Galindo, C.V., y Goñi, A.M. (2008). Talasémicas. *Semergen*, 34(3), 138-42.
- Guinea, J.M. (2012). *Interpretación del hemograma en pediatría*. España: Hospital Universitario de Álava.

- Hegde, D., Bagalkot, P., & Prashanth, G. (2011). Hemoglobin J-as a cause of congenital hemolytic anemia. *The Indian Journal of Pediatrics*, 78(10), 1284-1286.
- Hernández, D., Sánchez, D., y García, M. (2017). Comportamiento de las alteraciones renales en pacientes pediátricos con drepanocitosis. *Acta Médica del Centro*, 11(1).
- Hernández, N., Hernández, M., Juncá, P., Vives, J., y Vega, M. (2004). *Enfermedades del sistema eritrocitario: Anemias*. Barcelona: Elsevier.
- Ivo, M., Araujo, O., Barbieri, A., Correa, R., Pontes, E., & Botelho, C. (2014). Scope and efficiency of the newborn screening program in identifying hemoglobin S. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 36(1), 14-18.
- Jane, M., Benson, B., & Bradford, L. (2010). History and current status of newborn screening for hemoglobinopathies. *Elsevier*, 34, 134-144.
- Jarrett, K., Williams, M., Horn, S., Radford, D., & Wyss, J. (2016). “Sickle cell anemia: tracking down a mutation”: an interactive learning laboratory that communicates basic principles of genetics and cellular biology. *Advances in physiology education*, 40(1), 110-115.
- Lichtin, A. (s.f.). Drepanocitosis: enfermedad de la HbS. Recuperado de <https://www.msdmanuals.com/es/professional/hematolog%C3%ADa-y-oncolog%C3%ADa/anemias-causadas-por-hem%C3%B3lisis/drepanocitosis>
- Lobitz, S., Frömmel, C., Brose, A., Klein, J., & Blankenstein, O. (2014). Incidence of sickle cell disease in an unselected cohort of neonates born in Berlin, Germany. *European Journal of Human Genetics*, 22(8), 1051-1053.
- Lobo, C., Bueno, L., Moura, P., Ogeda, L., Castilho, S., & Carvalho, S. (2005). Neonatal screening for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 13(2-3), 154-159.
- Loovers, H., Tamminga, N., Mulder, A., & Tamminga, R. (2016). Clinical Course of Two Children with Unstable Hemoglobins: The Effect of Hydroxyurea Therapy. *Hemoglobin*, 40(5), 341-344.
- Lópes, C., Ballas, S., Bonini, A., Moura, P., Matos, E., Perez, G., & Farias, S. (2013). Newborn Screening Program for Hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatric Blood Cancer*, 1-6, doi: 10.1002/pbc.24711

- López, C., De Julián, E., Bravo, C., y Gómez, C. (2005). Protocolo de anemia de células falciformes o drepanocitosis. *Boletín de la Sociedad Vasco-Navarra de pediatría*, 38, 20-38.
- Machín, S., Martínez, A., Gutiérrez, A., Svarch, E., Menendez, A., Gil, M., et al. (2016). Evaluación clínica y hematológica de pacientes con drepanocitosis esplenectomizados en el Instituto de Hematología e Inmunología de Cuba: 30 años de experiencia. *Acta Pediátrica Española*, 74(11), 233-238.
- Malcorra, J. (2001). Hemoglobinopatías y talasemias. *Canarias Pediátrica*, 25, 265-76.
- Martínez, G., y Colombo, B. (1985). Hemoglobinopatías en Cuba. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 1, 32-36.
- Medina, J. y Ramos, N. (2016). *Estudio de hemoglobinopatías*. Recuperado de: http://www.catlab.cat/uploads/20160122/CI_66_Hemoglobinopatias.pdf
- Mendal, M. (1965). Anemia de Células falciformes. *Revista Honduras pediátrica*, 2(1), 3-126.
- Modell, B., & Darlison, M. (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(6), 480-487.
- Nelson, D., y Cox, M. (2011). *Principios de Bioquímica de Lehninger*. <https://doi.org/10.1002/14651858>
- Núñez, A., Hondal, N. y Ayllón, L. (2011). Alteraciones renales en la drepanocitosis. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 27(2), 168-178.
- Old, J. (2007). Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. *Scand Journal Clinical and Laboratory Investigation*, 67(1), 71–86.
- Oliva, M. (2004). Frecuencia de hipotiroidismo congénito en Guatemala. (Tesis de Licenciatura) Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Organización Mundial de la Salud. (2006). Talasemia y otras hemoglobinopatías: informe de la Secretaría. Recuperado de: http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/EB118/B118_5-sp.pdf

- Organización Mundial de la Salud. (2011). *Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad*. Recuperado de: http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglob_in_es.pdf
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Hoja informativa: Anomalías congénitas*. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/en/#>
- Osatinsky, R. (2007). ¿Qué es la electroforesis capilar? *Bioquímica y Patología Clínica*, 71(2), 60-66.
- Ostrander, R., & Green, N. (2011). Neonatal cyanosis from a hemoglobin variant. *New England Journal of Medicine*, 365(4), 378-378.
- Peñaloza, R., Buentello, L., Hernández, A., Nieva, B., Lisker, R., & Salamanca, F. (2008). Hemoglobin S frequency in five Mexican populations and its importance in public health. *Salud Pública de México*, 50(4), 325-329.
- Peñuela, O. (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Revista Colombia Médica*, 36(3), 215-225.
- Pérez, D., Reyes, E., Rodríguez, N. y Torres, Y. (2017). Hemoglobinopatías en gestantes y parejas de riesgo de Las Tunas. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 42(2).
- Planas, M., Fernández, A., Cutiño, I., Navarro, Z. y Pascau, A. (2015). Alteraciones de la microcirculación en pacientes con anemia drepanocítica según técnicas fotopletismográficas. *Medisan*, 19(7), 845-851.
- Pocock, G. (2005). *Fisiología humana: la base de la medicina*. Barcelona: Editorial Masson.
- Pujadas, X., y Viñals, L. (2016). Enfermedad de células falciformes en el embarazo. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 42(2), 239-253.
- Queiruga, G., Lemes, A., Ferola, C., Machado, M., Queijo, C., y Garlo, P. (2010). *Pesquisa Neonatal: lo que puede prevenir una gota de sangre*. Montevideo: BPS, Centro de Estudios en Seguridad Social, Salud y Administración.
- Ramos, A.G. (2016). Anemia Drepanocítica. España. Recuperado de <http://www.iqb.es/institut/home.htm>

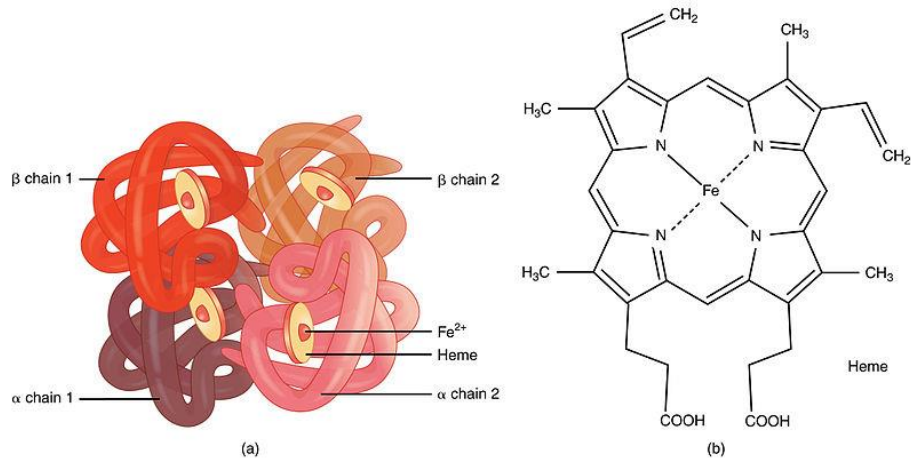
- Ranjana, H., & Sadhna, S. (2015). Detection of haemoglobin J in an asymptomatic diabetic patient-a case report. *Indian Journal of Pathology and Oncology*, 2(1), 53-56.
- Renaldo, M. (1974). *Gases en sangre: oxígeno y curva de disociación de hemoglobina*. Argentina: Editorial La Médica.
- Ribes, R. y Ros, P. (2010). *Inglés Médico*. España: Editorial Médica Panamericana.
- Rifkind, D. & Cohen, A. (2002). *The Pediatric Abacus*. USA: Informa Healthcare.
- Rivera, E., Palencia, E., Espinal, A., y Peña, A. (2016). Anemia de células falciformes con persistencia de hemoglobina fetal como factor protector: reporte de caso. *Revista Mexicana de Pediatría*, 83(2), 55-59.
- Rodak, B. (2004). *Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Rodríguez, W., Sáenz, G., y Chaves, M. (1998). Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica. *Revista Panameña de Salud Pública*, 3(1), 1-8.
- Rojas, M., y Walker, L. (2012). Malformaciones congénitas: aspectos generales y genéticos. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1256-1265.
- Rojas, M., Calderón, E., Vidal, M.A., Arroyo, F., García, R., y Torres, L. (2015). Crisis drepanocítica y tratamiento del dolor. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 22(4), 165-167.
- Rouessac, F. (2003). *Análisis Químico: Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. España: McGraw Hill.
- Ruano, R. y Jato, D. (2004). *Cribado neonatal de hemoglobinopatías*. Santiago de Compostela: Servicio Galego de Saúde, Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, avalia-t. Serie Avaliación de tecnoloxías. Informe de evaluación: INF2004/004.
- Rubio, F., García, B. y Carrasco, M. (2004). *Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos*. España: Editorial Paraninfo.
- Sáenz, G. (1976). Clasificación topográfica de las hemoglobinas anormales. *Revista de Biología Tropical* 24(1), 57-68.
- Sáenz, G. (2005). Hemoglobinas anormales. *Acta Médica Costarricense*, 47(4), 173-179.

- Sáenz, G., Alvarado, M., Arroyo, G. y Montero, G. (1975). Persistencia hereditaria de Hb fetal en Costa Rica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Saenz Herrera"*, 10(2), 135-150.
- Sáenz, G., Ramírez, V. y Chaves, M. (1982). Enfermedad por hemoglobina SC y patología ocular (a propósito de un caso). *Acta Médica Costarricense*, 25(3), 249-254.
- Sáenz, G., Altafulla, M., Sancho, G., y Salgado, M. (1988). Hemoglobinas anormales y talasemias en Costa Rica, otros países de Centroamérica y Panamá. *Bol of Saint Panamá*. 105(2), 101-119.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, K., Mullis, K., Ehrlich, G. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354.
- Sánchez, M., Del Moral, C., Rodríguez, C., Casso, S. y De Guevara, M. (2008). Crisis aguda de cianosis en un lactante. *Boletín de Pediatría*, 48, 124-127.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5467.
- Sarnaik, S. (2005).Thalassemia and related hemoglobinopathies. *The Indian Journal of Pediatrics*, 72(4), 319-324.
- Scarff, C., Patel, V., Thalassinis, K., & Scrivens, J. (2009). Probing Hemoglobin Structure by Means of Traveling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(4), 625–631.
- Sebia. (2015). *Hemoglobinopatías*. Recuperado de: <http://www.sebia.com/es/produits/hemoglobinopat%C3%ADas>
- Sillero, C., Ruíz, M. y Sánchez, J. (2012). *Hemoglobinopatías y talasemias, diagnóstico por el laboratorio*. España: Fesitess Andalucía.
- Smith, E., & Conley, C. (1959). Sickle cell-hemoglobin D disease. *Annals of internal medicine*, 50(1), 94-105.
- Sorroche, P. y Saenz, M. (2014). Electroforesis capilar en el estudio de las hemoglobinopatías y talasemias. *Hematología*, 18(3), 272-276.

- Steinberg, M., Forget, D., Higgs, D. & Weatherall, J. (2009). *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. EE.UU.: Cambridge University Press.
- Swedan, N., Nicol, K., Moder, P. & Kahwash, S. (2008). An “acquired” hemoglobin J variant in a sickle cell disease patient. *Therapeutics and clinical risk management*, 4(3), 649.
- Valcarcél, M. y Gómez, A. (1988). *Técnica analíticas de separación*. España: Editorial Reverté, S.A.
- Vela, M., Ibarra, I., y Fernández, C. (2014). Fundamentos teórico-prácticos para la toma correcta de la muestra de sangre del talón para el tamiz neonatal. *Acta Pediátrica de México*, 33(6), 273-278.
- Vives, J. (2001). Anemias por defectos congénitos de la hemoglobina: hemoglobinopatías estructurales y talasemias. *Medicine*, 8, 2684-2693.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. (2008). *Biología Molecular del gen*. España: Médica Panamericana.
- Weatherall, D. (2004). The Thalasseemias: the role of molecular genetics in an evolving global health problem. *Archieve of American Journal of Human Genetics*, 74(3), 385-392.
- Yang, E., Voelkel, E., Lezon-Geyda, K., Schulz, V., & Gallagher, P. (2017). Hemoglobin C trait accentuates erythrocyte dehydration in hereditary xerocytosis. *Pediatric Blood & Cancer*, 00: e26444.
- Zang, Y. & McCabe, E. (1992). RNA analysis from newborn screening dried blood specimenes. *Human Genetics*, 89, 311-314.
- Zúñiga, C. (1999). Prevalencia de Anemia de células falciformes en niños de 5 a 10 años de raza negra. (Tesis de Licenciatura) Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.

XIII. ANEXOS

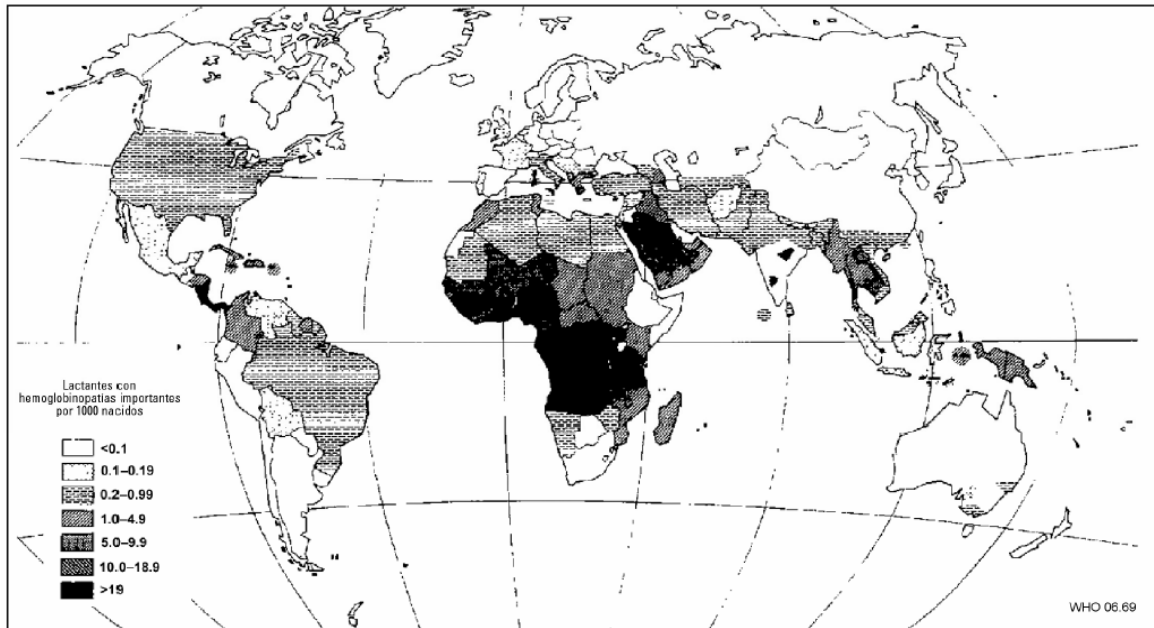
Anexo 1. Esquema general de estructura de la molécula de hemoglobina



Fuente: Rodak, 2004

La hemoglobina está conformada por una estructura cuaternaria constituida por cuatro subunidades proteicas cada una de ellas, denominadas cadenas de hemoglobina (a), están formadas por una cadena polipeptídica denominada globina que se encuentra unida de forma no covalente a un grupo prostético, el grupo hemo (b).

Anexo 2. Distribución mundial de las hemoglobinopatías (talasemia y anemia drepanocítica) número de lactantes afectados por cada 1000 nacidos



Fuente: Organización Mundial de la Salud. (2006). Talasemia y otras hemoglobinopatías: informe de la Secretaría. Recuperado de: http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/EB118/B118_5-sp.pdf

Anexo 3. Boleta de recolección de muestra para tamizaje neonatal

Programa de Tamizaje Neonatal Boleta de Recolección de la Muestra

HOSPITAL GENERAL "SAN JUAN DE DIOS"
Laboratorio Clínico

Primer Apellido _____ Sexo M F

Segundo Apellido _____ Parto Normal Cesáreo

Nombre del Niño _____ Peso al nacer _____

Lugar de Nacimiento _____

Fecha de Nacimiento: Día _____ Mes _____ Año _____ Semanas de Gestación _____ Fecha de Obtención de Muestra: Día _____ Mes _____ Año _____

Dirección Exacta _____

Nombre de la Madre _____

Médico Referente _____

Pruebas Solicitadas: TSH PKU 17-OH Progesterona Galactosa Total

Ha recibido alguna transfusión el niño: SI NO

Teléfono de Domicilio _____

Teléfono Celular _____

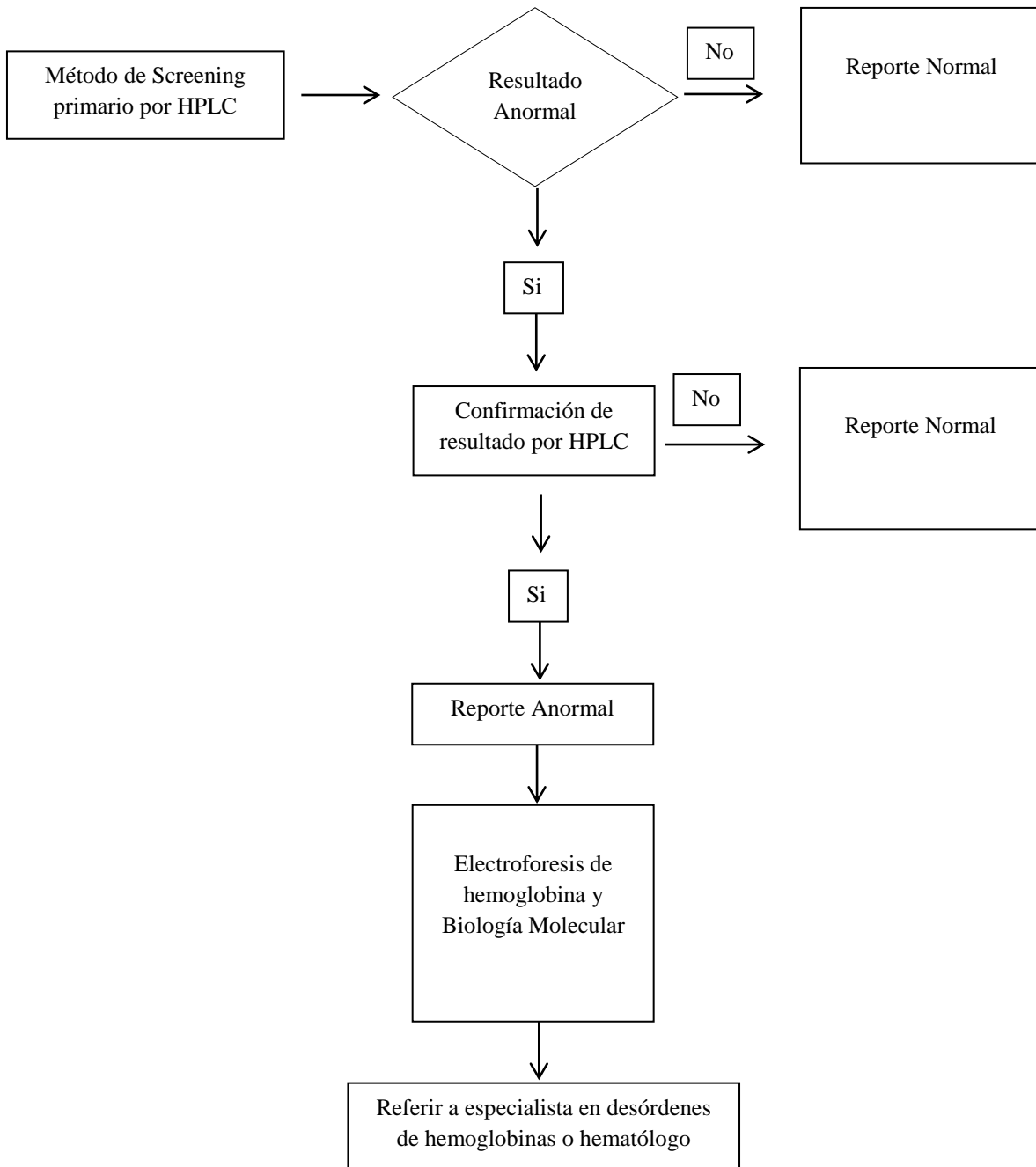
LABORATORIO INSTRUCCIONES AL DORSO SN 0031345

FEF 102530078 Rev/VAC 2019-09-30 Este es un producto de la Fundación Biomédica San Juan de Dios, S.A. Guayaquil, Ecuador. Tel: 2366711

7057116M151 903TM

Papel filtro con un volumen estandarizado de muestra, cuatro gotas de sangre capilar. Adicional cuenta con una parte para agregar datos.

Anexo 4. Flujograma diagnóstico neonatal de hemoglobinopatías



(CDC, 2015).

Anexo 5. Consentimiento informado



Hospital General San Juan de Dios

Guatemala, C.A.

INCIDENCIA DE HEMOGLOBINOPATÍAS EN RECIÉN NACIDOS DEL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS (HGSJDD)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Hago constar que he sido informado(a) de manera sencilla y clara sobre el estudio de tamizaje neonatal para hemoglobinopatías que se llevará a cabo durante un período de 6 meses del año 2017, por lo que recibí las siguientes explicaciones:

1. Las hemoglobinopatías son defectos de carácter hereditario, donde la hemoglobina es afectada y por lo tanto hay una alteración en el transporte de oxígeno. Únicamente se dan cuando ambos progenitores son portadores de los genes causantes de dicho trastorno. Esta enfermedad puede controlarse si se da un diagnóstico oportuno, sencillo y un tratamiento adecuado.
2. El objetivo del estudio es determinar la incidencia de hemoglobinopatías en neonatos nacidos en el Hospital General San Juan de Dios.
3. La realización de la prueba implica la toma de muestra del talón del neonato, a través de una lanceta y papel filtro.
4. Se dará un seguimiento en caso de que el neonato presente una hemoglobina anormal del tipo S, C, D ó E.
5. A los padres se les pedirá muestra de sangre venosa, con el fin de evaluar quién de ellos es el portador del gen defectuoso.
6. La realización de las pruebas no tiene ningún costo y no producirá ningún daño al niño (a); únicamente se referirá con un especialista hematólogo para la evaluación pertinente e inicio del tratamiento si fuese necesario.

Por lo anterior, estoy conforme con la información proporcionada y autorizo voluntariamente para que a mi hijo(a) _____ de _____ de edad le sea realizada la prueba.

Nombre y firma del padre: _____

Nombre y firma de la madre: _____

Nombre encargados del estudio: Andrea Celeste Jacinto Rangel y Angélica Sarahí Chiroy Sicán. Para mayor información o dudas, puede comunicarse a los números: 5578-4097/5291-2799

Guatemala, _____ de 2017

Anexo 6. Reporte de estudio por hemoglobina anormal



Hospital General San Juan de Dios

Guatemala, C.A.

RESULTADOS ESTUDIO POR HEMOGLOBINA ANORMAL

DATOS DEL NIÑO CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINAS POR CROMATOGRFÍA HPLC

Nombre:		
Sexo: Masculino		Fecha de nacimiento:
No. de muestra	Fecha de toma	Resultado
Muestra 1:		El patrón de hemoglobinas en HPLC sugiere un patrón portador heterocigoto para hemoglobina S(FAS)
Muestra 2:		

DATOS DE LA MADRE Y EL PADRE CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINAS POR CROMATOGRFÍA HPLC

DATOS DE LA MADRE	DATOS DEL PADRE
Nombre:	Nombre:
Resultado: Resultado: El patrón de hemoglobinas en HPLC sugiere un patrón normal (AA)	Resultado:--
Dirección:	
Teléfono:	

Químico Biólogo Responsable

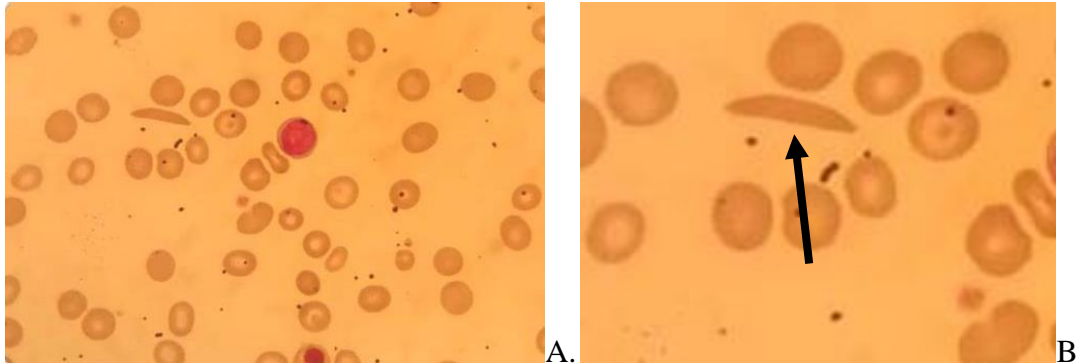
Centro de recolección donde se envía el resultado: Área de Tamizaje Neonatal, Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios

Fecha de realización del reporte: 22 de agosto de 2016

-FAVOR COLOCAR EN EL EXPEDIENTE DEL NIÑO-

Es obligatorio que el centro de recolección contacte a la familia y les explique el resultado y sus implicaciones genéticas a través del Pediatra según la facilidad de su área.

Anexo 7. Frote periférico de paciente pediátrico homocigoto para hemoglobina S a los 10 meses de edad.



Fuente: Datos experimentales.

Junto a los análisis hematológicos de rutina, a los 10 meses de edad del paciente homocigoto se realizó un frote periférico, como se observa en la Figura A, evidenciando: neutrófilos 52%, linfocitos 31%, monocitos 16%, eosinófilos 1%, presencia de leve granulación tóxica, serie eritrocitaria disminuida, presencia de células drepanocíticas o en forma de hoz, anisocitosis y plaquetas disminuidas. En la figura B se presenta un acercamiento de la célula drepanocítica.

Andrea Celeste Jacinto Rangel
Autora

Angélica Sarahí Chiroy Sicán
Autora

M.A. Isabel Cristina Gaitán Fernández
Asesora

Lic. Eliseo Josué Albanés Gómez
Asesor

M.A. Keila Mariana Guerrero Gutiérrez
Revisora

MSc. Osberth Morales Esquivel
Director
Escuela de Química Biológica

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto
Decano
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia