



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN-MANAGUA

**RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD “LUIS FELIPE MONCADA”
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO.**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN
BIOANÁLISIS CLÍNICO.**

Tema:

**DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA “S” MEDIANTE HPLC EN
NIÑOS QUE PARTICIPARON EN INVESTIGACIÓN DE VARIANTES
DE HEMOGLOBINA, EN EL POLISAL – UNAN MANAGUA
AGOSTO–NOVIEMBRE DEL 2021.**

AUTORES

- Br. Marlon Antonio Traña Chávez.
- Br. Eliezer Alejandro Guevara Cajina

TUTOR:

MSc. Ligia Lorena Ortega Valdés/ Bioanalista Clínico.

MSc. en epidemiología.

Docente Hematología clínica.

Managua, Nicaragua. Febrero del 2023

ÍNDICE

DEDICATORIA.	3
DEDICATORIA.	4
AGRADECIMIENTOS.	5
RESUMEN.	7
I. INTRODUCCIÓN.	8
II. ANTECEDENTES.	9
III. JUSTIFICACIÓN.	12
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	13
V. OBJETIVOS.	14
VI. MARCO TEÓRICO.	15
6.1. Hemoglobina.....	15
6.1.1. Función.....	15
6.1.2. Estructura.....	15
6.1.2.1. Grupo Hemo.....	16
6.1.2.2. Globinas.....	16
6.2. Hemoglobinas anormales.....	17
6.2.1. Hemoglobina S.....	17
6.2.1.1. Estructura.....	18
6.2.2. Hemoglobina C.....	19
6.2.2.1. Estructura.....	19
6.2.3. Hemoglobina E.....	19
6.2.3.1. Estructura.....	20
6.2.4. Hemoglobina D.....	20
6.2.4.1. Estructura.....	21
6.3. Métodos diagnósticos para hemoglobinopatías.....	22
6.3.1. Hemograma.....	22

6.3.2.	Diferencial de serie roja.....	23
6.3.3.	Prueba de inducción de drepanocitos.....	25
6.3.4.	Electroforesis.....	25
6.4.	Generalidades de Bio – Rad D10.....	30
6.4.1.	Características.....	31
6.4.2.	Funcionamiento del equipo.....	31
6.4.3.	Interpretación de resultados.....	32
6.4.3.1.	Modo short program (programa corto).....	32
6.4.3.2.	Modo extended program (modo programa extendido).....	33
6.4.4.	Ventajas y desventajas.....	33
6.5.	Valores hematológicos en pacientes con HbS.....	34
6.6.	Valores estándares de hemoglobina en las regiones de Nicaragua.....	34
6.7.	Tratamientos.....	35
6.7.1.	Fármacos.....	35
6.7.1.1.	Hidroxicarbamida o hidroxiurea.....	35
6.7.1.2.	Polvo de l-glutamina.....	35
6.7.1.3.	Crizanlizumab.....	36
6.7.1.4.	Voxelotor.....	36
6.7.2.	Otras terapias.....	36
6.7.2.1.	Medicina transfusional.....	36
6.7.2.2.	Trasplante de medula ósea.....	37
VII.	PREGUNTAS DIRECTRICES.....	38
VIII.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	39
IX.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	49
X.	CONCLUSIONES.....	61
XI.	RECOMENDACIONES.....	62
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
XIII.	ANEXOS.....	66

DEDICATORIA.

A Dios:

En primer lugar y sobre todas las cosas le dedico este trabajo al supremo, quien fue el primero en estar conmigo en los momentos más difíciles en este camino. Agradezco que siempre su voluntad sea esta, la de culminar este trayecto como un gran profesional y una gran persona.

A mi madre Dalila Chávez Obando:

Dedicado a mi ángel que siempre estuvo conmigo presencialmente, apoyándome en todas las decisiones y todas las situaciones que siempre se presentaron. Además de brindarme todo el apoyo económico, emocional e intelectual. Por todos los servicios que tuvo conmigo, por todo el amor que me brindo cuando más lo necesitaba ¡Muchas gracias por todo! Te amo.

A mi abuela Luisa Obando:

Aunque yo no estés conmigo presencialmente, siempre estuviste en mi corazón, agradezco todos los buenos momentos que pase a tu lado y por siempre apoyarme cuando tuviste la oportunidad, me gustaría que vieras este otro gran logro que obtuve, pero hasta el cielo te envío un ¡Gracias por todo!

A mi familia:

Por todos los apoyos que recibí de cada uno de ellos, gracias por todo.

A mi papá Marlon Traña Escobar:

Dedicado a mi papá que a pesar de todas las dificultades siempre ha querido verme como un gran profesional, por aportar todo lo que estaba en sus disponibilidades ¡Gracias por todo!

Marlon Antonio Traña Chávez

DEDICATORIA.

Este trabajo investigativo lo dedico con profundo amor y cariño a:

Dios misericordioso por estar siempre conmigo, por ser el guía a través de toda mi vida y mi carrera universitaria.

A mi familia completa por brindarme acompañamiento amor y sacrificio. Por ser ese pilar en donde siempre estuvieron ahí para ayudarme en diferentes aspectos de mi vida, por la ayuda económica que me han brindado para poder culminar mi carrera universitaria. Por haberme forjado como persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ellos.

A todas aquellas personas que fueron el motor de motivación y porque me brindaron el apoyo monetario para poder lidiar con los gastos universitarios, por sus consejos sanos y toda la ayuda.

A mis colegas y amigos de estudio por compartir momentos de alegría, de felicidad y tristezas en la trayectoria de estos 5 años universitarios.

A mis maestros de la universidad y a los de los hospitales y centros médicos por estar siempre apoyando y compartiendo el pan del conocimiento. En especial a Msc. Lorena Ortega por ser nuestro tutor en nuestra monografía y estar siempre presente en todo el proceso.

Eliezer Alejandro Guevara Cajina.

AGRADECIMIENTOS.

A nuestro padre Dios, que nos ha acompañado durante todo este largo trayecto desde nuestros comienzos hasta el final de nuestra etapa universitaria. En la que siempre estuvo presente en las alegrías y tristezas, alumbrando siempre el camino para poder formarnos como unos verdaderos profesionales al servicio del pueblo.

De manera muy especial a los **padres de los niños** por poner su confianza en nuestras manos y ser partícipe de esta gran investigación de la cual es de gran ayuda para el avance del diagnóstico de este tipo de enfermedades en el país.

Un especial agradecimiento a nuestra tutora **MSc. Ligia Lorena Ortega** por brindarnos la confianza de poder llevar a cabo un proyecto como este, que tiene gran significado clínico en la comunidad científica de nuestro país. Por siempre estar en la disposición de enseñarnos cada día más y formar nuestro carácter de investigador científico y sobre todo brindarnos las herramientas para facilitar el entendimiento del mismo.

A **MSc. Magaly Ruiz** por brindarnos el apoyo en el muestreo, procesando muestras e impartiendo capacitación para comprender el funcionamiento de los equipos utilizados.

A los **encargados del laboratorio de Bioanálisis clínico** por apoyarnos con proporcionar los materiales y los laboratorios para el procesamiento y toma de muestras, sobre todo estar a la disposición de cualquier eventualidad.

A los trabajadores que gestionan el departamento de **Bioanálisis clínico** en especial a **Isabelita** que siempre está a la disposición de cualquier diligencia académica y por ayudar en todos los trámites de este trabajo monográfico.

A nuestra alma mater **UNAN – Managua**, en especial al **Instituto politécnico de la salud “Luis Felipe Moncada”** por permitirnos ser estudiante de este lindo recinto y permitirnos vivir tantas experiencias.

VALORACIÓN DEL TUTOR

La Enfermedad por hemoglobina S o drepanocitosis es una de las causas más frecuentes de mortalidad en el sistema de salud del mundo, las complicaciones neurológicas y sus secuelas se conocen casi desde la primera descripción de la enfermedad. La más frecuente es el accidente vascular encefálico especialmente en la primera década de la vida.

En Nicaragua se desconoce la prevalencia e incidencia de esta enfermedad a nivel departamental y nacional, por la falta de equipamiento y tecnología viable en los hospitales nacionales, sin embargo, el Instituto Politécnico de la Salud ha hecho esfuerzos por incorporar metodologías diagnósticas novedosas y se hizo posible esta investigación a través de proyectos.

Considero que esta investigación cumple los requisitos científicos y metodológicos para ser presentada ante un tribunal dictaminador, aporta de manera sustantiva a este vacío sobre el conocimiento de la drepanocitosis, pero sobre todo al diagnóstico confirmativo necesario para la evolución y tratamiento específico de los niños que la padecen.

Se extiende la presente a los nueve días del mes de diciembre del 2022.



Msc Lorena Ortega Valdés
Docente Tutora de la Monografía
Departamento de bioanálisis Clínico
UNAN-Managua.

RESUMEN.

La Hemoglobina es una proteína encargada de transportar el oxígeno a los diferentes sitios del cuerpo. Existen diferentes fracciones que componen la totalidad de la cantidad hemoglobina. Aunque no todas las personas poseen HbS, los métodos cuantitativos normales no proporcionan información sobre las hemoglobinas anormales. Por ende, esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar un método que permite conocer los porcentajes de Hemoglobina S. Para esto, se trabajó en el Instituto Politécnico de la salud POLISAL donde fueron invitados de manera abierta niños con problemas relacionados a anemias y 23 fueron seleccionados por biometría hemática completa, más extendido periférico, para ser muestreados, puesto que cumplían con los criterios establecidos. A través del método HPLC se logró confirmar la presencia de HbS en los 23 pacientes, lo cual representó una frecuencia del 8.06% de pacientes positivos con hemoglobina S. El 83% de los resultados positivos estaban dentro de un rango entre 51-88% de Hb S y un 17% en un rango de 31 – 50. Otro hallazgo encontrado fue la leucocitosis, eritropenia y trombocitosis en hemograma. En extendido periférico se encontró un promedio mayor de 5 células falciformes por campo en el 86.9% de los estudiados, además de la presencia de otras estructuras. Se logró conocer la incidencia departamental de los pacientes que acudieron voluntariamente, encontrando que Managua fue el departamento con más participantes en cuanto al número de casos con un 31%, siguiéndole Chinandega con 22% y Masaya con el 13%.

I. INTRODUCCIÓN.

La cantidad de hemoglobina es un parámetro de gran incidencia para la determinación de anemia y policitemia. Cuando esta se encuentra por debajo del límite normal el sujeto investigado es considerado como anémico. El hemograma proporciona la cantidad de manera global y esta se reporta en gramos por decilitro en todos los laboratorios de Nicaragua. Por lo tanto, una anemia se puede definir como la disminución de hemoglobina y esta comúnmente es un signo de otra patología subyacente (Boza, 2016). Una causa de deficiencia de hemoglobina en los individuos son las hemoglobinas anormales, que tiene la característica de hacer cambios estructurales en los glóbulos rojos, disminuyendo la vida promedio de esta célula.

Las hemoglobinas anormales forman parte de los trastornos hereditarios de la hemoglobina (Hb) y, por su frecuencia, son considerados en muchas regiones del mundo como problemas de Salud Pública. Aunque algunas presentan problemas clínicos, una gran proporción son inocuas y muchas veces su diagnóstico se realiza en forma casual mediante métodos altamente especializados. (Rodríguez, 2021).

Salazar R. y González M. (2004) estudiaron los haplotipos de los genes de globina en Venezuela, esto porque anteriormente han logrado caracterizar muchos sujetos en cuanto a frecuencia y reconocer los atributos fenotípicos mediante diversos métodos como la cromatografía de intercambio iónico y la electroforesis, demostrando la importancia y relevancia del método para proseguir según algoritmo a otras etapas identificativas más complejas.

La cromatografía de alta presión “HPLC”, es un método que posibilita al clínico conocer cantidades concretas de las diferentes hemoglobinas que posee cada individuo, incluyendo hemoglobinas anormales. A diferencia de otros métodos, este se destaca por precisamente esa característica. Además de que ofrece otras ventajas como el procesamiento automatizado, que disminuye los posibles errores que suelen ocurrir cuando se realiza un procedimiento manual.

Todas estas características tienen una gran incidencia en el diagnóstico y tratamiento específico para cada paciente, desde las dosis adecuadas para las terapias y el seguimiento de la enfermedad.

II. ANTECEDENTES.

Para desarrollar este trabajo monográfico y partiendo del grado de importancia de esta etapa de investigación en nuestro perfil profesional se realizó varias consultas bibliográficas y se confirmó que existen información de aspecto Nacional e internacional con el tema: **“Determinación de hemoglobina “S” mediante HPLC en niños que participaron en investigación de variantes de hemoglobina, en el Polisal – UNAN Managua Agosto–Noviembre del 2021.”**

Los reportes de investigación consultados son trabajos recientes, con menos de diez años de realización, en ellos se citan datos bibliográficos correspondientes al tema en cuestión, se señala el objetivo de cada investigación, el marco metodológico, los resultados y las conclusiones principales.

Entre los primeros antecedentes se encuentran los trabajos nacionales realizados por Quezada, García, et al (2018) con el tema: **Frecuencia de hemoglobina S en donantes del Banco Nacional de Sangre durante el período de marzo - noviembre del año 2018.** En este trabajo los autores citan el estudio que se realizó fue de tipo descriptivo de corte transversal, se pretende describir la frecuencia de los portadores de Hb S captados, con universo de 1500 Donantes voluntarios. Así mismo, se encontró:

Las edades de mayor participación estuvieron conformadas en los grupos de 17 a 27 años con 71% (1.9% Hb S), en segundo lugar, los mayores de 28 a 38 años con 17% (1.1% Hb S) de participación, como tercer lugar los de 39 a 49 años con 7.4% (0% Hb S).

En relación al sexo, se obtuvo que el masculino fue el de mayor participación con un 51% (1.8% Hb S) y el femenino con un 49% (1.5% de Hb S).

Se encontró un predominio de portadores de Hb S procedentes de la RAAS con 14 de 25 donantes equivalente al 3.5%, seguidamente de León con 1.8%, Managua 1.2%, Chontales 1.6%, Carazo 1.6% y Chinandega con 0.5%. Se detectaron 25 casos positivos con el test de solubilidad lo que corresponden a un 1.66% de frecuencia de hemoglobina S en los donantes de sangre.

Se logró confirmar el 100% de donantes que resultaron con presencia de HbS, positivos con el test de solubilidad, al aplicar la técnica de electroforesis en acetato de celulosa.

Al comparar ambas pruebas para la validación de resultados se logró evidenciar un alto desempeño del test de solubilidad el cual resultó con una excelente sensibilidad, especificidad y eficacia diagnóstica útil para la detección de hemoglobina S en donantes de sangre.

Se encontró un trabajo realizado por Barillas Gutiérrez & Villalobos (2015) denominado: **Estandarización de la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, para el diagnóstico de Hemoglobinopatías en el Politécnico de la salud, Agosto-Noviembre 2015**, El estudio se basó en la estandarización de la técnica de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa para el diagnóstico de hemoglobinopatías, en el que se utilizó como protocolo de referencia el descrito por los investigadores German Sáenz Renault y Walter Rodríguez Romero "Libro de Hematología Analítica", 4ta edición, 2003. El universo del estudio lo conformaron 44 muestras de sangre total con EDTA K3, sospechosos de anemia de células falciformes atendidos en el Hospital la Mascota .La evaluación de la técnica demostró ser 100% sensible y específica, además de ser reproducible.

Se caracterizó fenotípicamente los pacientes con drepanocitosis (HbSS y HbSC) en un 64% y se demostró que el 36% eran pacientes clínicamente sanos (HbAA y HbAS).

Así mismo en el ámbito nacional se encontró un trabajo llamado **Caracterización fenotípica de hemoglobinas en pacientes con diagnóstico clínico de anemia drepanocítica y familiares en las cabeceras departamentales de Nicaragua mediante Electroforesis de Hemoglobina en tiras de acetato de celulosa, en el período Enero - Noviembre 2016**. En donde los autores Ortiz López, Requenez & Salinas (2016) refieren que las hemoglobinopatías son un grupo de trastornos congénitos de la hemoglobina con un patrón de herencia autosómico recesivo que incluyen las hemoglobinopatías estructurales producidas por la síntesis de una cadena de globina estructuralmente anormal.

Por esta razón se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, con el objetivo de caracterizar fenotípicamente la hemoglobina en pacientes con diagnóstico clínico de anemia drepanocítica y familiares, en las cabeceras departamentales de Nicaragua mediante electroforesis de hemoglobina en tiras de acetato de celulosa. Se efectuó en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”, Hospital España de Chinandega y Hospital César Amador Molina de Matagalpa. Para el diagnóstico clínico de hemoglobinopatías se utilizan datos clínicos y pruebas de laboratorio como el test de falciformación y extendido periférico.

Mediante la realización de estudio se obtuvieron los siguientes datos, HbAA 45.2%, HbAS 27%, HbAC 1.6%, HbSS 23%, entre esto se destaca el diagnóstico de una familia con Síndrome Drepanocítico doble heterocigoto (HbSC 1.6%) en el departamento de Matagalpa y adicionalmente se detectó en dos pacientes una variante de hemoglobina llamada Hemoglobina Presbiteriana (1.6%), siendo los primeros casos descritos en el país.

III. JUSTIFICACIÓN.

La Hematología es una ciencia que estudia las anomalías de la sangre, tanto las enfermedades hereditarias como las no hereditarias, entre ellas se destaca la presencia de la hemoglobinopatía S la cual se distingue por crisis hemolíticas vasooclusivas en pacientes pediátricos o neonatos que son homocigotos no así en los portadores. Epidemiológicamente se desconoce en Nicaragua cifras de esta enfermedad porque no existen métodos de confirmación en los hospitales del país, es por tal razón que los investigadores han considerado determinante utilizar un método eficaz que sirva para determinar la presencia de esta enfermedad en los niños que son atendidos en las diferentes unidades de salud, debido esto se procedió a la elaboración de una investigación denominada: **“Determinación de hemoglobina “S” mediante HPLC en niños que participaron en investigación de variantes de hemoglobina, en el POLISAL – UNAN Managua Agosto–Noviembre del 2021.”**

A través de una exploración realizada por los investigadores en el hospital infantil MJR “La Mascota” durante sus pasantías académicas, encontraron que existe un problema nacional, puesto que no hay un método Gold standard que se esté utilizando en las unidades pediátricas, por lo que se propuso que se realizara una investigación que permitiera medir las fracciones de hemoglobina y poder hacer un diagnóstico más preciso/confirmativo.

El periodo que se prestó para realizar esta investigación fue en el año 2021. Debido a que un médico que se encarga de atender este tipo de patología, en ese momento hacía la observación de que el POLISAL UNAN Managua gestara un proyecto que permita poner a disposición de los hematólogos un nuevo método para la clasificación de pacientes con variantes de hemoglobina.

El estudio se realizó en niños debido a que, durante la búsqueda de información en unidades de salud y opiniones de personas expertas en el tema, se concluyó que existe un problema a nivel pediátrico, porque no hay tamizaje y es donde hay mayor sintomatología y lo epidemiológicamente importante es encontrar portadores y homocigotos a través del método HPLC lo cual orientaría el manejo diagnóstico de estas personas y su monitoreo.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La anemia de células falciformes es un trastorno hereditario, esta patología pertenece al grupo amplio de hemoglobinopatías, las cuales corresponden a un gran problema de salud. Según la OMS en la 59ª asamblea mundial de la salud, decretó la prevalencia de anemia por células falciformes, y encuentra que aproximadamente 5% de la población es portadora de genes causantes de hemoglobinopatías. Cada año nacen aproximadamente 300,000 niños con hemoglobinopatías importantes, de los cuales el 83% corresponden anemia por células falciformes, estas son consideradas por la organización mundial de la Salud (OMS) como un programa prioritario de salud en el mundo, según su comportamiento epidemiológico representan un problema de salud pública a nivel nacional y mundial. (OMS, 2012).

En Nicaragua se han realizado estudios poniendo en prácticas diferentes métodos como el test de falciformación, extendido periférico y electroforesis de hemoglobina que nos permiten conocer la prevalencia de estas patologías en la población, logrando así la identificación de portadores homocigotos y heterocigotos que son importantes epidemiológicamente para poder mitigar la aparición de estas enfermedades. Sin embargo, la necesidad de un método diagnóstico que proporcione información exacta del comportamiento de las diferentes fracciones de hemoglobina en un individuo, es de gran necesidad puesto que se necesita conocer la situación del paciente antes de comenzar las terapias correspondientes. A partir de la delimitación del problema antes expuesto, se plantea la siguiente pregunta.

¿Cuál es la Frecuencia de hemoglobina “S” mediante HPLC en niños que participaron en investigación de variantes de hemoglobina en el POLISAL – UNAN Managua, Agosto–Noviembre del 2021?

V. OBJETIVOS.

General.

- Determinar la frecuencia de hemoglobina S mediante HPLC en niños, que participaron en investigación de variantes de hemoglobina, en el Polisal – UNAN Managua, Agosto–Noviembre del 2021.

Específicos.

1. Aplicar el hemograma y extendido periférico a los niños muestreados en el POLISAL - UNAN Managua de Agosto a Noviembre 2021.
2. Interpretar los resultados de las muestras analizadas mediante HPLC.
3. Clasificar según características sociodemográficas de los niños con HbS.
4. Relacionar las concentraciones de hemoglobina “S” con el extendido periférico de los niños muestreados.

VI. MARCO TEÓRICO.

6.1. Hemoglobina.

La hemoglobina (HB) es una proteína globular, que está presente en altas concentraciones en los glóbulos rojos y se encarga del transporte de O₂ del aparato respiratorio hacia los tejidos periféricos; y del transporte de CO₂ y protones (H⁺) de los tejidos periféricos hasta los pulmones para ser excretados (Brandan, Aguirre, & Giménez, 2008).

Para Brandan Nora (2008) “La Hemoglobina es una proteína globular, que se encuentra en grandes cantidades dentro de los glóbulos rojos y es de vital importancia fisiológica, para el aporte normal de oxígeno a los tejidos”. (p2)

6.1.1. Función.

La hemoglobina es el transportador de O₂, CO₂ y H⁺. Se sabe que por cada litro de sangre hay 150 gramos de Hb, y que cada gramo de Hb disuelve 1.34 ml de O₂, en total se transportan 200 ml de O₂ por litro de sangre (Brandan, Aguirre, & Giménez, 2008). Esto es, 87 veces más de lo que el plasma solo podría transportar. Sin un transportador de O₂ como la Hb, la sangre tendría que circular 87 veces más rápido para satisfacer las necesidades corporales.

6.1.2. Estructura.

La hemoglobina es una proteína con estructura cuaternaria, es decir, está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas: dos α y dos β (hemoglobina adulta- HbA); dos α y dos δ (forma minoritaria de hemoglobina adulta- HbA₂- normal 2%); dos α y dos γ (hemoglobina fetal- HbF). En el feto humano, en un principio, no se sintetizan cadenas alfa ni beta, sino zeta (ζ) y épsilon (ξ) (Hb Gower I).

Al final del primer trimestre las subunidades α han reemplazado a las subunidades ζ (HbGower II) y las subunidades γ a los péptidos ξ . Por esto, la HbF tiene la composición $\alpha_2\gamma_2$. Las subunidades β comienzan su síntesis en el tercer trimestre y no reemplazan a γ en su totalidad hasta algunas semanas después del nacimiento. Brandan, Aguirre, & Giménez, (2008)

La biosíntesis de la Hb guarda estrecha relación con la eritropoyesis. Cada una de las cadenas polipeptídicas de la Hb cuenta con genes propios: α , β , δ , γ , ϵ . Los genes α y β son

independientes y se ubican en cromosomas distintos (cromosoma 16 y 11 respectivamente como menciona Moraleda Fuentes (2021) afirmando que:

Los polipéptidos libres forman de inmediato dímeros $\alpha\beta$ y tetrámeros $\alpha_2\beta_2$. El grupo Hem se sintetiza virtualmente en todos los tejidos, pero su síntesis es más pronunciada en la médula ósea y el hígado, debido a la necesidad de incorporarlo en la Hb y los citocromos, respectivamente. Es una molécula plana que consta de un hierro ferroso y un anillo tetrapirrólico, la protoporfirina III o IX.

La hemoglobina es un tetrámero formado de la unión de 4 cadenas polipeptídicas, 2 α y 2 β . Cada globina contiene un grupo prostético (grupo hemo) formado por un átomo de hierro y un anillo de porfirina. El tipo de porfirina de la Hb es la protoporfirina IX; contiene dos grupos ácidos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos de la estructura de la porfirina. El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (+2) y puede formar cinco o seis enlaces de coordinación. (p34)

6.1.2.1. Grupo Hemo.

El grupo hemo (del griego $\alpha\tilde{\iota}\mu\alpha$ "sangre") es un grupo prostético que forma parte de diversas proteínas, entre las que destaca la hemoglobina

Para Moreno y Castro (2004) explica que: “La formación de tetrapirroles es esencial para la producción de porfirinas, las cuales constituyen los 2+ 3+ grupos hemo (con Fe /Fe) de los citocromos y de proteínas transportadoras de oxígeno (hemoglobina), y 2+ los pigmentos (con Mg) de las clorofilas y las bacteriofilas (en el caso de bacterias)”. p99-106

Existen dos diferentes rutas para sintetizar al precursor δ - aminolevulinato a partir del cual se obtiene el grupo hemo después de siete reacciones en común. La regulación de esta vía biosintética es al parecer a través del grupo hemo, el cual tiene un efecto inhibitorio en ambas vías mediante diferentes mecanismos.

6.1.2.2. Globinas

La asociación Químicas (2020), señala que: “La globina es la parte protéica de la hemoglobina (apoproteína). El hemo es el grupo prostético de la hemoglobina” p18. Está compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas, estas son semejantes dos a dos. Los aminoácidos varían según la especie y dentro de la especie humana varían con el desarrollo del organismo, de forma que cambian según se trate de la vida embrionaria, fetal o adulta.

Clases de cadenas de globina Alfa. α , Beta. β , Gamma. γ Delta. δ , Epsilon. ϵ , Zeta. ζ ,
Las cadenas de globina presentan una estructura compleja, las cuales son:

1. Viene determinada por la secuencia de aminoácidos que componen la cadena.
2. Las cadenas así formadas se enrollan en espiral con aspecto helicoidal y algunos tramos dispuestos al azar.
3. Es la disposición que adopta la cadena en el espacio al plegarse sobre sí misma. Este plegamiento origina una conformación globular que deja un hueco cerca de la superficie donde se coloca el grupo "Hemo".
4. Resulta de la unión de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria. (Química. ES, 2020).

6.2. Hemoglobinas anormales

Las hemoglobinas anormales o hemoglobinopatías se definen como defectos de la hemoglobina que, en su gran mayoría, se transmiten con la herencia (hemoglobinopatías congénitas). Existe también un grupo reducido de hemoglobinopatías que pueden aparecer en el curso de ciertas enfermedades (hemoglobinopatías adquiridas).

Las hemoglobinopatías congénitas obedecen a mutaciones en los genes que codifican la síntesis de cadenas de globina, y su consecuencia puede ser; síntesis de una hemoglobina anómala, Disminución de la síntesis de hemoglobina normal (talasemias), Ambos defectos simultáneamente (hemoglobinopatías talasémicas), Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF).

6.2.1. Hemoglobina S.

La hemoglobina S es un tipo anormal de hemoglobina que puede heredar de sus padres. La Hg S hace que los glóbulos rojos se vuelvan rígidos y tengan una forma anormal. En lugar de tener una forma redonda normal, de disco, estos glóbulos rojos tienen una forma de hoz (falciforme) o semilunar. Estos glóbulos no viven tanto como los glóbulos rojos normales. Debido a su forma, quedan atrapados en el interior de los vasos sanguíneos pequeños. Estos problemas causan síntomas de la enfermedad de células falciformes, también conocida como anemia drepanocítica.

De la misma manera Sabrafem, Besses y Vives (2001) señalan que: “La hemoglobinopatía “S” es la primera enfermedad molecular que fue descrita por Pauling en 1949. Se halla muy extendida por todo el mundo, especialmente entre individuos oriundos de África ecuatorial, aunque se observa también con elevada frecuencia en poblaciones del área mediterránea, Oriente Medio, India y EE. UU” p227.

En su forma homocigota (HbSS), es causante de la drepanocitosis o anemia falciforme, y junto con la HbC constituye la hemoglobinopatía más frecuente y también la de mayor impacto sanitario.

Turley, (2020) nos dice que: “Si una persona hereda 1 gen normal de hemoglobina y 1 gen de Hgb S, se dice que la persona tiene el rasgo de células falciformes” p233. Si la persona hereda un gen de Hgb S del padre y uno de la madre, la persona tiene la enfermedad de las células falciformes

6.2.1.1. Estructura

La Hb S es una variante estructural de la hemoglobina A, de la cual se diferencia por presentar al aminoácido valina en lugar del ácido glutámico en la posición 6 de la cadena beta de globina, posición que se localiza en la parte externa de la molécula.

La mutación genética que dio origen a la Hb S consiste en la sustitución de timina por adenina en el sexto codón del gen estructural de la cadena beta de globina (G A G--C T G), de tal modo se codifica valina en lugar de ácido glutámico en la sexta posición de la cadena beta (González, 2015).

La hemoglobina S, a diferencia de la hemoglobina A, tiene la propiedad de que sus moléculas se unen y forman polímeros cuando se encuentran desoxigenadas (forma tensa), lo cual constituye el evento fisiopatológico primario de la enfermedad conocida como Anemia drepanocítica (González, 2015).

Cuando las moléculas de Hb S se encuentran desoxigenadas tienden a unirse unas a otras formando polímeros, pero la desoxigenación de la Hb S y la polimerización no son fenómenos simultáneos. En situaciones fisiológicas, entre ambos procesos, existe un lapso de tiempo de aproximadamente 2 segundos, esto resulta de gran importancia, ya que, en el organismo en condiciones normales, el hematíe demora un segundo en llegar a los pulmones y oxigenarse después de haber cedido su oxígeno en los tejidos, lo que impide su falciformación bajo estas únicas condiciones (González, 2015).

La estructura de los polímeros de Hb S se ha estudiado detalladamente y se ha determinado que su unidad está constituida por un filamento compuesto por anillos de 14 moléculas de Hb S superpuestos, formando una estructura helicoidal.

6.2.2. Hemoglobina C.

La Hb C fue la segunda variante de la Hb identificada electroforéticamente en 1950 en individuos de raza negra de norteamérica, luego definida estructuralmente en 1960. Sáenz y Muños (1984) menciona que: “Se acepta que la HbC ha surgido a raíz de una mutación de la HbA independiente de la ocurrida en la HbS, por un simple cambio de bases en el codón para ácido glutámico en la sexta posición de la cadena beta”. En la actualidad se acepta que esta Hb C es la segunda hemoglobinopatía más creciente en el mundo. Contrario de la creencia general, es la HbC y no la HbS, la típica Hb africana, pues salvo pocas excepciones geográficas, se localiza en la región centro-occidental de ese continente.

6.2.2.1. Estructura

Se caracteriza por la sustitución del ácido glutámico de la posición 6 de la cadena beta por lisina. Es una hemoglobinopatía propia del África Occidental, característica de la raza negra., de esta forma Brandan, Aguirre y Giménez (2008) nos dice que “El estado homocigoto (CC) se caracteriza por una ligera anemia hemolítica crónica con esplenomegalia; la vida media del eritrocito esta disminuida y en la circulación se forman microesferocitos. El estado heterocigoto (AC) no produce trastorno alguno”

Por otro lado, la sociedad española de medicina de laboratorio (2016) menciona “Se trata de una hemoglobina variante de cadena β en la que se ha producido un cambio del ácido glutámico por una lisina en la posición 6 ($\beta 6$ Lys-Glu)” p5. Es frecuente en el continente africano, especialmente en el oeste de África de donde surge, teniendo una prevalencia en algunas zonas de hasta el 50 %.

6.2.3. Hemoglobina E.

Hemoglobina E es el nombre con el que se conoce una forma anormal de hemoglobina. La enfermedad es un trastorno leve, y las personas que presentan la enfermedad pueden no tener síntomas o tener anemia leve. Es un trastorno genético que se transmite de padres a hijos. Ambos padres transmiten el rasgo para que el niño desarrolle el trastorno. En la

mayoría de los casos, la hemoglobina E no causa ningún síntoma. Sin embargo, puede causar anemia leve, que puede llevar a síntomas tales como piel pálida, cansancio y fatiga.

6.2.3.1. Estructura.

Es una hemoglobina anormal con una mutación de un solo punto en la cadena β . En la posición 26 hay un cambio en el aminoácido, de ácido glutámico a lisina (E26K). La hemoglobina E es muy común entre las personas de ascendencia del sudeste asiático.

La mutación β E afecta la expresión del gen β creando un sitio de corte y empalme alternativo en el ARNm en los codones 25-27 del gen de la globina β . A través de este mecanismo, hay una deficiencia leve en el ARNm β normal y la producción de pequeñas cantidades de ARNm β anómalo. La síntesis reducida de la cadena β puede causar β -talasemia. Además, esta variante de la hemoglobina tiene una unión débil entre la globina α y la globina β , lo que provoca inestabilidad cuando hay una gran cantidad de oxidante. La HbE se puede detectar mediante electroforesis. (Universidad de Rochester, 2017)

6.2.4. Hemoglobina D

La hemoglobina D Punjab (HbD Punjab) es la variante mundial más frecuente de hemoglobina D. En México se tienen reportes de casos aislados. Valencia, Patricia, Georgina, & Rocío (2016) menciona que la hemoglobina D es una hemoglobina anormal que presenta diferentes variantes, la más conocida la HbD Punjab o Los Ángeles. Valencia, Patricia, Georgina, & Rocío (2016) sigue mencionando que la HbD es la variante mundial más frecuente y presenta una elevada prevalencia en el norte de la India, y en Pakistán, así como en la región china de Xinjiang, que también tiene frontera con Pakistán. También se han descrito casos de HbD en diferentes países europeos como Italia, Bélgica, Austria, o transcontinentales como Turquía.

En Latinoamérica, la HbD Punjab3 ocupa el tercer lugar en prevalencia de las hemoglobinas anormales reportadas, como ocurre en Brasil. En México, se han identificado casos de HbD en familias originarias tanto de la costa del pacífico como del Golfo de México. A nivel mundial, las hemoglobinopatías más frecuentes son la HbS, HbC y la HbE y menos común la HbD, que sola o combinada con talasemia o HbS, se identifica en cerca del 1 % con todas las hemoglobinas anormales en México, comparada con el 7.8 % observado en la población del norte de la India, donde es más frecuente esta condición.

6.2.4.1. Estructura

Se origina debido a la sustitución de una glutamina por ácido glutámico en el codón 121 del gen de la betaglobina (beta-121 (GH4) Glu→Gln, GAA>CAA). Otras variantes son HbD-Irán (beta-22 Glu→Gln), HbD-Bushman (beta-16 Gly-Arg), HbD-Ouled Rabah (beta-19 Asn-Lys), HbD-Granada (beta-22 Glu-Val), HbD-Ibadan (beta-87 Thr-Lys) y HbD-Neath (beta121 Glu-Ala). La HbD se presenta en cuatro formas: la de portador heterocigoto (HbA/HbD), HbD-talasemia, HbD/HbS y la rara condición de HbD homocigota, que es una anemia hemolítica moderada.

6.3. Métodos diagnósticos para hemoglobinopatías.

En la actualidad gracias a la tecnología moderna se han implementado diferentes métodos técnicos y automatizados para el buen diagnóstico de las diferentes hemoglobinopatías como por ejemplo el PCR o reacción de la cadena de polimerasa que consiste en la secuenciación de copias genéticas específicas con el fin de confirmar la presencia de Hb anormales. Además de eso se cuenta con la prueba de falciformación que se basa en la capacidad de formar polímeros desoxi-HbS a bajas presiones de oxígeno que deforman al eritrocito adquiriendo la forma característica de hoz. Así mismo se cuenta con la prueba de solubilidad que consiste en la detención primaria de Hb S siendo un método factible por su simplicidad y rentabilidad para el cribado de campo masivo. También se destaca la presencia de otros métodos más complejos como la secuenciación, que tiene importancia en la búsqueda del genotipo específico que ocasiona estas enfermedades, por el costo y complejidad de estas pruebas, solo se mantienen en práctica para investigaciones en algunos países.

6.3.1. Hemograma.

El hemograma es uno de los exámenes del laboratorio más solicitado con mayor frecuencia y forma parte del estudio básico requerido para orientación diagnóstica y evaluación de los pacientes.

Para Campuzano (2007) el significado de hemograma, también conocido como cuadro hemático, biometría hemática o recuento de células sanguíneas, junto con la glicemia y el citoquímico de orina (uroanálisis), es una de las pruebas más solicitadas al laboratorio clínico y uno de los estudios que mayor información aporta al médico sobre la homeostasis de un individuo.

A través del tiempo, el hemograma ha sido objeto de múltiples modificaciones en cuanto a los parámetros que lo componen, la forma de obtenerlos, los grados de precisión y de exactitud y la manera de interpretarlo. Así mismo para que exista el hemograma la sangre periférica es el principal participante para que se cumpla, esto conlleva a reunir valores absolutos y porcentuales y agrega el aspecto morfológico de las tres poblaciones celulares leucocitos eritrocitos y plaquetas” (Revista médica clínica las Condesas, 2015).

Algunos autores han sintetizado o agrupado los diferentes parámetros que el hemograma proporciona según su capacidad, el hemograma tipo IV proporciona los siguientes datos:

Hemoglobina, hematocrito, recuento de eritrocitos, índices eritrocitarios (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de la hemoglobina corpuscular media), ancho de distribución de los eritrocitos, recuento total de leucocitos, recuento diferencial de leucocitos, recuento de plaquetas y morfología de sangre periférica por métodos electrónicos y manuales. No incluye sedimentación (Campuzano, 2007, pp 215).

Para una mejor utilización de los parámetros que el hemograma aporta es de vital importancia conocer el desarrollo que ha acompañado a la prueba y el laboratorio clínico debe permanecer atento al desarrollo tecnológico para incorporar los aspectos de mayor relevancia desde el punto de vista clínico, como una herramienta de rutina que le permita tener pruebas cada vez más exactas, más precisas, a un costo razonable y, sobretodo, de mayor utilidad clínica.

6.3.2. Diferencial de serie roja.

El diferencial de la serie roja es de mucha importancia para el diagnóstico de hemoglobinopatías, los parámetros establecidos y los resultados encontrados serán un norte para el diagnóstico y vigilancia de diferentes patologías.

Anisocitosis

El término anisocitosis implica la presencia de células de diferentes tamaños en el extendido periférico donde podemos encontrar tanto como micro como macrocíticas, el esclarecimiento de la disminución o aumento en el tamaño se realiza tomando como parámetros los glóbulos blancos de un tamaño más estable, como es el caso de los linfocitos pequeños; no obstante, es necesario considerar el tamaño general de los el tamaño general de los otros leucocitos y de las plaquetas, en caso de tener una disminución de linfocitos.

Poiquilocitosis

Campuzano (2008) explica que es un término que puede aparecer en el hemograma y significa el aumento en el número de poiquilocitos circulantes en la sangre que son hematíes que poseen una forma anormal. De la misma manera existe variabilidad que pueden ser observados a través del microscopio a partir de la realización de un frotis sanguíneo, siendo ellos:

Esferocitos: eritrocitos con forma redonda y de menor tamaño que los hematíes normales.

Dacriocitos: eritrocitos con forma de lágrima o gota.

Acantocitos: eritrocitos que poseen aspecto espinoso, pudiendo ser semejante a la forma de un corcho lata (chapa) de una botella de vidrio.

Codocitos: eritrocitos en forma de "objetivo de tiro" (diana) debido a la distribución de la hemoglobina.

Eliptocitos: eritrocitos con forma oval.

Drepanocitos: eritrocitos en forma de hoz, los cuales aparecen principalmente en la anemia falciforme.

Estomatocitos: eritrocitos que poseen un área estrecha en el centro, semejante a una boca;

Esquizocitos: eritrocitos con forma indefinida (amorfo).

En la búsqueda a través del microscopio la figura de nuestro interés será los drepanocitos, en el informe del extendido, en caso de que sea determinada poiquilocitosis durante el examen microscópico, es indicada la presencia de la forma encontrada. La identificación de los poiquilocitos es importante para que el médico pueda saber el estado general de la persona y, de acuerdo con la alteración observada, pueda indicar la realización de otros exámenes para concluir el diagnóstico e iniciar el tratamiento de inmediato.

Anisocromia

En este término se describe la variabilidad del grado de hemoglobinización de los eritrocitos, cuando se presenta se observan células hipocrómicas y normocrómicas en el mismo campo microscópico

La anisocromia es una anomalía eritrocitaria que se define como la falta de consistencia y homogeneidad en el color que se presenta entre unos hematíes y otros. Se trata de un indicador importante en la hematología para la detección de enfermedades y control de salud de las personas.

En resumen, la anisocromia es una condición de la sangre, donde los glóbulos rojos no tienen su coloración normal por alguna anomalía que afecta a la hemoglobina y su correspondiente función de oxigenación en el cuerpo.

6.3.3. Prueba de inducción de drepanocitos.

Los drepanocitos son células que se forman cuando estas se desprenden del oxígeno, formando tactoides o células de forma de hoz, debido a la polimerización que realiza la HbS dentro del eritrocito. Boza (2016) menciona que el fundamento de la técnica es utilizar un agente reductor, el metabisulfito, que induce un medio pobre en oxígeno.

Los glóbulos rojos al estar sometidos en un medio escaso de oxígeno, los drepanocitos comienzan a formarse. Siendo visible en el microscopio después de un período de tiempo establecido. Con esto se puede confirmar la presencia de hemoglobina S en la muestra.

6.3.4. Electroforesis.

Las moléculas de hemoglobina en solución presentan diferente carga eléctrica a determinado pH según sus grupos ionizables citando Judith (2017) puntualiza que “pueden ser separadas en función de su movilidad. Pueden utilizarse varios soportes y soluciones amortiguadoras con diferente pH según la conveniencia de cada caso.” p333.

Electroforesis en gel.

La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN (u otras macromoléculas, como ARN y proteínas) por su tamaño y carga. La electroforesis consiste en aplicar una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés. Con base en su tamaño y carga, las moléculas se desplazarán por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con lo que se separan unas de otras.

Todas las moléculas de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa. Debido a esto, la electroforesis en gel separa los fragmentos de ADN únicamente por su tamaño. La electroforesis nos permite ver cuántos fragmentos diferentes de ADN están presentes en una muestra y cuán grandes son unos con respecto a otros. También podemos determinar el tamaño absoluto de un fragmento de ADN examinándolo junto a una "escala" estándar de fragmentos de tamaño conocido.

Procedimiento técnico.

Las muestras de ADN se cargan en pozos (ranuras) en un extremo de un gel y se aplica una corriente eléctrica para arrastrarlas a través del gel.

Los fragmentos tienen carga negativa, por lo que se mueven hacia el electrodo positivo. Puesto que todos los fragmentos de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa, los fragmentos pequeños atraviesan el gel más rápido que los grandes.

Cuando un gel se tiñe con un pigmento que se une al ADN, los fragmentos de ADN pueden verse como bandas, las cuales representan un grupo de fragmentos de ADN del mismo tamaño.

Acetato de celulosa.

Se realiza este tipo de EF a pH 8,4-8,6 usando una membrana de acetato de celulosa como sustrato, y es un método simple, rápido y sensible. Detecta las variantes de Hb más comunes, y tradicionalmente es la técnica más utilizada para la evaluación inicial. A pH alcalino, la Hb es una proteína cargada negativamente y que en un campo eléctrico migra hacia el ánodo (+). Las variantes de Hb con distintas cargas en su superficie se separan de la HbA y, por tanto, todas las detectadas son diferentes de ella. Pueden haber Hb anormales sin cambio en la carga, y por tanto no serán diferenciadas. La figura 1 muestra las variantes de Hb más frecuentes detectadas por esta técnica y puede observarse que se obtiene una separación de las HbC, S, F, A y J.

PH ácido.

Es muy efectiva en la detección inicial de variantes de Hb en combinación con la anterior. La mayoría de las Hb tiende a desplazarse igual que la HbA, y las que lo hacen de forma distinta es porque el aminoácido sustituido está relacionado con la unión al 2,3 DPG. Los factores que intervienen en la separación de las Hb son, además de la carga eléctrica, las interacciones fisicoquímicas entre la fase sólida (agar) y las moléculas de Hb, que dependen de la localización superficial de la mutación.

6.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para Econantur (2020) describe que “la cromatografía, del griego chroma (color) y grapho (escritura), comprende un conjunto de técnicas que tienen como finalidad la separación de mezclas basándose en la diferente capacidad de interacción de cada componente sobre/en otras sustancias en estado sólido o líquido”, de esta forma, consiste en pasar una mezcla de sustancias o fase móvil, sobre una fase estacionaria que retrasará el flujo de las sustancias de la mezcla haciendo que al desplazarse sobre ella la mezcla, a diferentes velocidades.

Historia.

La Cromatografía Líquida comenzó a principios del siglo XX. En 1906, un botánico ruso Mikhail Tswett inventó LC para separar varios pigmentos vegetales. Inyectó el extracto de la planta y el éter de petróleo a través de una columna de vidrio llena de carbonato de calcio.

Hay afirmaciones en donde ensayaron y aseguran que:

Hizo en una columna de vidrio, fue capaz de observar los cambios dentro de la columna. Al principio, sólo hay una capa de pigmento en la parte superior de la columna. Pero a medida que pasa el tiempo, el pigmento se separa en cuatro capas de colores diferentes. La investigación posterior descubrió que esas cuatro capas eran verde azulado; Clorofila a, verde amarillento; Clorofila b, amarillo; Xantina, y naranja; caroteno.

Todo el proceso de separación tardó varias horas y por lo tanto no era un método muy práctico. Este largo tiempo de análisis fue parte de la razón por la que LC no se convirtió en una herramienta analítica popular hasta 1970, medio siglo después de la invención de Mikhail Tswett. (A&C science, 2018)

En los años 70 en los Estados Unidos, Jim Waters fundó Waters Corporation y comenzó a vender instrumentos de HPLC. Esto promovió el uso de la HPLC en áreas de análisis práctico. Los sistemas de LC que Waters Corporation desarrolló utilizaron una bomba de alta presión que genera un flujo rápido de eluyente y, por lo tanto, dio lugar a una mejora espectacular en el tiempo de análisis. En comparación con la “cromatografía de baja presión”, los nuevos tipos se denominaron “cromatografía líquida de alta presión”.

Por lo tanto, se utilizó para pensar que la HPLC significa Cromatografía Líquida de Alta Presión, sin embargo, hoy en día es un acuerdo común que la HPLC significa Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento. Otro gran cambio fueron los métodos de adquisición de datos. En lugar de observar los cambios de las capas por los ojos, el sistema detector se acopló a la LC y la salida se registró en la carta de papel. Si tuviéramos que demostrar el resultado del análisis.

Componentes de HPLC.

Bomba

La bomba se sitúa en la corriente más superior del sistema LC y genera un flujo de eluyente desde el depósito de disolvente al sistema., ser capaz de generar la alta presión fue uno de los requisitos de sistema más importantes. Sin embargo, hoy en día, la generación de alta presión es un requisito “estándar” y lo que más preocupa hoy en día es ser capaz de proporcionar una presión consistente en cualquier condición, para proporcionar un caudal controlable y reproducible. Dado que un cambio en el caudal puede influir en el análisis en gran medida.

Miranda (2018) asegura: “La mayoría de las bombas usadas en los sistemas LC actuales generan el flujo por movimiento de vaivén de un pistón accionado por motor (bombas alternas). Debido a este movimiento del pistón, produce “pulsos”. (p34)

Ha habido grandes mejoras en el sistema para reducir esta pulsación y las bombas recientes crean mucho menos pulso en comparación con las más antiguas. Sin embargo, el análisis reciente requiere una sensibilidad muy alta para cuantificar una pequeña cantidad de analitos, y, por lo tanto, incluso un pequeño cambio en el caudal puede influir: en el análisis.

Inyector.

Se coloca junto a la bomba, el método más sencillo es usar una jeringa, y la muestra se introduce en el flujo del eluyente. Dado que la precisión de la medición LC es afectada en gran medida por la reproducibilidad de la inyección de la muestra, el diseño del inyector es un factor importante. El método de inyección más utilizado se basa en los bucles de muestreo. El uso del sistema de auto-inyector (auto-inyector) también es ampliamente utilizado que permite inyecciones repetidas en un calendario programado.

Columna.

La separación se realiza dentro de la columna; Por lo tanto, se puede decir que la columna es el corazón de un sistema LC. La teoría de la columna de cromatografía no ha cambiado desde el tiempo de Tswett; Sin embargo, ha habido una mejora continua en el desarrollo de columnas. Las columnas recientes se preparan a menudo en carcasa de acero inoxidable, en lugar de columnas de vidrio utilizadas en el experimento de Tswett. El material

de envasado usado generalmente es gel de sílice o polímero en comparación con el carbonato de calcio usado por Tswett.

El eluyente utilizado para LC varía de disolventes ácidos a básicos. La mayoría de la carcasa de la columna está hecha de acero inoxidable, ya que el acero inoxidable es tolerante a una gran variedad de disolventes. Sin embargo, para el análisis de algunos analitos tales como biomoléculas y compuestos iónicos, no se desea el contacto con el metal, por lo que se emplea en su lugar el alojamiento de la columna de poliéter éter cetona (PEEK).

Detector.

La separación de los analitos se realiza dentro de la columna, mientras que se utiliza un detector para observar la separación obtenida. La composición del eluyente es consistente cuando no hay ningún analito presente. Mientras que la presencia de analito cambia la composición del eluyente. Lo que hace el detector es medir estas diferencias. Esta diferencia se controla como una forma de señal electrónica. Existen diferentes tipos de detectores disponibles. En la lección 6 se explican diferentes tipos de detectores.

Grabador.

El cambio en el eluyente detectado por un detector está en forma de señal electrónica, y por lo tanto todavía no es visible a nuestros ojos. En los viejos días, la pluma (papel) – registrador de la carta se utilizó popular. Hoy en día, procesador de datos basado en computadora (integrador) es más común. Hay varios tipos de procesadores de datos; Ejemplos incluyen un sistema simple que consta de impresora incorporada y procesador de textos, y un tipo de computadora personal que consta de monitor de pantalla, teclado e impresora. También hay software que están diseñados específicamente para el sistema LC. Proporciona no sólo la adquisición de datos, sino características como pico de ajuste, corrección de línea de base, cálculo de concentración automática, determinación de peso molecular, etc

Degaseador.

El eluyente utilizado para el análisis LC puede contener gases como el oxígeno que no son visibles para nuestros ojos. Cuando el gas está presente en el eluyente, éste se detecta como ruido y provoca una línea de base inestable. El método generalmente usado incluye burbujeo (burbujeo de gas inerte), uso de aspirador, sistema de destilación, y / o

calentamiento y agitación. Sin embargo, el método no es conveniente y también cuando el disolvente se deja durante un cierto período de tiempo (por ejemplo, durante el análisis largo), el gas se disolverá de nuevo gradualmente.

El desgasificador utiliza tubos de membrana de polímero especiales para eliminar los gases. Los numerosos poros muy pequeños en la superficie del tubo de polímero permiten que pase el aire mientras se impide que cualquier líquido pase a través del poro. Colocando este tubo bajo el recipiente de baja presión, creó diferencias de presión dentro y fuera de la tubería (más arriba dentro de la tubería).

Esta diferencia permite que el gas disuelto se mueva a través de los poros y retire el gas. En comparación con el tipo de desgaste clásico de desgasificación, el desgasificador se puede utilizar en línea, es más conveniente y eficiente. Muchos de los nuevos sistemas de unidad HPLC contienen un desgasificador.

Calentador de columna

La separación de LC suele ser influenciada en gran medida por la temperatura de la columna. Con el fin de obtener resultados repetibles, es importante mantener las condiciones de temperatura constante. También para algunos análisis, como el azúcar y el ácido orgánico, se pueden obtener mejores resoluciones a temperatura elevada (50 ~ 80° C). También es importante mantener la temperatura estable para obtener resultados repetibles, incluso se analiza alrededor de la temperatura ambiente. Hay posibilidades de que pequeñas diferencias de temperatura causen diferentes resultados de separación. Por lo tanto, las columnas se mantienen generalmente dentro del horno de columna (Ascientific, 2017).

6.5. Generalidades de Bio – Rad D10.

El Bio-Rad D-10 Dual Program ha sido diseñado para la determinación porcentual de los niveles de hemoglobina A2, F y A1c, así como para la detección de variantes anormales de hemoglobinas en sangre humana utilizando la cromatografía líquida de alta resolución por intercambio iónico (HPLC) (Bio-Rad Laboratories Inc., 2010).

Este equipo permite conocer el área que ocupa cada fracción de hemoglobina respecto a un global, también, nos permite ver en porcentajes el espacio que ocupa cada fracción de la muestra que se obtiene.

6.5.1. Características.

El HPLC es un método que separa y determina analitos (solutos) orgánicos e inorgánicos en cualquier tipo de muestra, pues su principal ventaja es determinar cualquier compuesto disuelto en cualquier líquido. En el D10 la muestra de sangre es diluida en una serie de tampones que realiza de forma automática el equipo.

6.5.2. Funcionamiento del equipo.

Partiendo de lo mencionado según BIO-RAD (2010) La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil.

La fase estacionaria es sílica que se ha tratado con RMe_2SiCl . La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar

Por otro lado, la HPLC es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. Básicamente, en este método participan las fases móviles y estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- Las fuerzas de dispersión de London

- Las interacciones dipolo
- Las interacciones por puente de hidrógeno
- Interacciones dieléctricas
- Interacciones electroestáticas

6.5.3. Interpretación de resultados.

El D10 de Bio-Rad identifica todas las fracciones mediante los tiempos que cada fracción se une a la columna. Debido a las diferentes características de cada fracción de hemoglobina, sus interacciones con el material del cartucho son muy diferente, variando en los tiempos de retención y en el área que estas ocupan respecto a la muestra.

El equipo posee dos modos de uso, el programa corto y el extendido. Cada modo tiene diferencias en los tiempos de retención, identificando la misma fracción, pero con tiempos diferentes según el modo de trabajo.

6.5.3.1. Modo short program (programa corto).

El área normal de este modo debe oscilar entre 1.0 y 5.0 millones de μ voltios x segundo y los tiempos de retención son los siguientes:

Nombre de pico	Tiempo de retención (minutos)	Intervalo (minutos)
A1a	0.21	0.16-0.26
A1b	0.29	0.23-0.35
F	0.495	0.40-0.59
LA1c/CHb-1	0.745	0.59-0.90
LA1c/CHb-1	0.765	0.63-0.90
A1c	0.86	0.69-1.03
P3	1.38	1.29-1.47
A0	1.455	1.375-1.535
Variant	1.585	1.535-1.635
S	1.67	1.635-1.705
C	1.785	1.705-1.865

6.5.3.2. Modo extended program (modo programa extendido).

El área normal de este modo debe oscilar entre 1.0 y 5.0 millones de μ voltios x segundo y los tiempos de retención son los siguientes:

Nombre de pico	Tiempo de retención (minutos)	Intervalo (minutos)
A1a	0.21	0.16-0.26
A1b	0.30	0.24-0.36
F	0.48	0.38-0.58
LA1c/CHb-1	0.755	0.58-0.93
LA1c/CHb-1	0.795	0.66-0.93
A1c	0.87	0.70-1.04
P3	1.43	1.23-1.63
A0	1.70	1.55-1.85
A2	3.15	2.80-3.50
S	4.16	4.02-4.30
C	4.75	4.65-4.85

6.5.4. Ventajas y desventajas.

Ventajas.

- Alta precisión en sus resultados (± 0.5 % o menor)
- Fácil manipulación de los gradientes generados en la fase móvil.
- No es destructiva, es decir, los compuestos separados en la columna pueden ser recolectados, lo que permite el uso de la HPLC como una técnica de preparación o purificación de muestras.
- Tiempo de separación menor a 30 min por muestra analizada.
- Alta reproducibilidad en los análisis cuantitativos.
- Alto poder de separación con detección sensible.
- La operación es flexible, personalizable y automatizada
- No está restringida por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra.

Desventajas.

- El costo es un problema para los sistemas de salud, aunque sea una herramienta de gran utilidad, en algunos países costear los análisis para la población es un problema y es suplantado por otras técnicas.
- Aunque sea un equipo de fácil manejo, la disponibilidad de técnicos para el mantenimiento de este equipo es escasa en algunas partes.

6.6. Valores hematológicos en pacientes con HbS.

La anemia drepanocítica es un tipo de anemia de carácter hemolítico, de modo que los índices hematológicos rutinarios como hematocrito, hemoglobina, leucocitos y plaquetas se ven alterado, en la mayoría de casos disminuyendo los niveles de estos. Sin embargo, los pacientes homocigotos que sintetizan un porcentaje elevado de HbS, aumentan el número de células falciformes en el organismo, haciendo que estas se alojen en los vasos sanguíneos, ocasionando disminución del flujo de sangre, dolores articulares y en casos más severos dificultad para respirar debido a la vaso oclusión pulmonar. Esta “obstrucción” venosa ocasiona un falso aumento de algunos valores hematológicos, desencadenando otros síntomas como la formación de coágulos (trombosis).

En el extendido periférico la forma característica de la drepanocitosis es el drepanocito o la célula falciforme, sin embargo, otras estructuras como lo son los codocitos, eritroblastos, macrocitos y microcitos, son un gran indicador de esta enfermedad. Dado que se evidencia la presencia de un proceso hemolítico y que en relación a la sintomatología del paciente y sus valores de hemograma son un fuerte indicador de esta enfermedad.

6.7. Valores estándares de hemoglobina en las regiones de Nicaragua.

En Nicaragua solo existe un estudio dedicado al comportamiento de las fracciones de hemoglobinas normales en población adulta. Se ha analizado las cantidades porcentuales de sus valores de referencia. Ortega, Vanegas & Ruiz (2020) realizan un estudio pionero donde utilizan a una población aleatoria sana de entre 19 y 81 años, para encontrar los valores normales de cada fracción de hemoglobina por medio del método HPLC, encontrando que en ambos sexos la fracción normal de hemoglobina A1 es del 96.03%, 2.92% para la Fracción A2, 0.734% para la fracción menor que corresponde a la Hb Fetal y 5.32 para la Hb glicosilada o Hb A1c.

6.8. Tratamientos

6.8.1. Fármacos.

6.8.1.1. Hidroxicarbamida o hidroxiurea.

Un medicamento de prescripción, puede ayudar a manejar los casos graves de dolor causado por la anemia drepanocítica. La hidroxiurea tiene la capacidad de estimular la producción de hemoglobina fetal (Hb F), un tipo de hemoglobina que no se falciforme. Los individuos con niveles más altos de hemoglobina fetal tienden a tener un curso más leve de la enfermedad. Esto generalmente hace intervalos más largos entre las crisis de dolor y con menor severidad. (Balladares, 2018)

6.8.1.1.1. Mecanismo de acción

La hidroxicarbamida disminuye la producción de desoxirribonucleótidos a través de la inhibición de la enzima ribo nucleótido reductasa mediante la eliminación de radicales libres de tirosilo, ya que están implicados en la reducción de nucleótidos difosfatos.

En el tratamiento de la anemia falciforme, la hidroxicarbamida aumenta la concentración de hemoglobina fetal. El mecanismo preciso de acción aún no está claro, pero parece que la hidroxicarbamida aumenta los niveles de óxido nítrico, provocando la activación de la guanilil ciclase soluble con un aumento resultante en GMP cíclico y la activación de la expresión del gen de la gamma globina y posterior síntesis de la cadena gamma necesaria para la producción de hemoglobina fetal (HbF) (que no polimeriza y deforma los glóbulos rojos como la mutada HbS, responsable de la anemia de células falciformes). Los eritrocitos adultos que contienen más del 1% de HbF se denominan células F. Estas células son progenie de un pequeño grupo de precursores eritroides inmaduros (BFU-e) que conservan la capacidad de producir HbF. La hidroxiurea suprime también la producción de granulocitos en la médula ósea que tiene un efecto inmunosupresor suave en particular en los lugares de los vasos sanguíneos donde las células falciformes han ocluido el flujo sanguíneo. (The New England Journal of Medicine. 2006)

6.8.1.2. Polvo de l-glutamina.

L-glutamina se usa para reducir la frecuencia de episodios de dolor (crisis) en adultos y niños de 5 años de edad y mayores con anemia de células falciformes (un trastorno sanguíneo hereditario en el que los glóbulos rojos tienen una forma anormal [forma de hoz] y no pueden transportar suficiente oxígeno a todas las partes del cuerpo). La L-glutamina

pertenece a una clase de medicamentos llamados aminoácidos. Esta funciona al ayudar a prevenir el daño a los glóbulos rojos. (Medlineplus, 2020)

6.8.1.3. Crizanlizumab.

Crizanlizumab es un tratamiento inyectado en la vena (intravenoso o IV) que las personas con anemia falciforme pueden tomar solo o junto con hidroxycarbamida (también conocida como hidroxiurea), para prevenir episodios de dolor y algunas otras complicaciones en personas con anemia falciforme.

6.8.1.4. Voxelotor.

Es un inhibidor de la polimerización de HbS, voxelotor se une de forma reversible a la hemoglobina, estabilizando el estado de hemoglobina oxigenada y evitando la polimerización de HbS al aumentar la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Los estudios preclínicos demuestran que el voxelotor aumenta la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y disminuye la polimerización de la HbS de manera dependiente de la dosis). Voxelotor puede inhibir la formación de glóbulos rojos, mejorar la deformabilidad de los glóbulos rojos y reducir la viscosidad de la sangre entera, lo que contribuye a la anemia y la hemólisis.

6.8.2. Otras terapias.

6.8.2.1. Medicina transfusional.

Se utilizan para tratar y prevenir complicaciones, como los accidentes cerebrovasculares, en personas con la enfermedad de células falciformes.

En una transfusión de glóbulos rojos, estos se extraen de la sangre donada y luego se administran por vía intravenosa a una persona con anemia de células falciformes. Esto aumenta la cantidad de glóbulos rojos normales, lo que ayuda a reducir los síntomas y las complicaciones.

Los riesgos incluyen una respuesta inmunitaria a la sangre del donante (lo que puede dificultar la búsqueda de futuros donantes), infección y acumulación excesiva de hierro en el cuerpo. Debido a que el exceso de hierro puede dañar el corazón, el hígado y otros órganos, es posible que necesites un tratamiento para reducir los niveles de hierro si recibes transfusiones periódicas.

6.8.2.2. Trasplante de médula ósea.

Este procedimiento supone el reemplazo de la médula ósea afectada por la anemia de células falciformes por médula ósea sana de un donante. El procedimiento suele utilizar un donante compatible, como un hermano, que no tenga anemia de células falciformes.

La revista Mayo Clinic (2022) menciona los riesgos asociados al trasplante de médula ósea, entre los que se incluye la muerte, el procedimiento solo se recomienda para las personas, generalmente niños, que tienen síntomas y complicaciones graves a causa de la anemia de células falciformes. La única cura conocida para la anemia de células falciformes es un trasplante de células madre.

VII. PREGUNTAS DIRECTRICES.

- ¿Cuál es la frecuencia de hemoglobina S mediante HPLC en niños, que participaron en investigación de variantes de hemoglobina, en el Polisal – UNAN Managua, Agosto–Noviembre del 2021?
- ¿Cuántos niños muestreados presentaron resultados con alteraciones en el hemograma y en el extendido periférico?
- ¿Qué fracciones se encontraron en las muestras analizadas mediante HPLC?
- ¿Qué características sociodemográficas relevantes se observaron en la investigación?
- ¿Qué relación existe entre las concentraciones de Hb S y el extendido periférico?

VIII. DISEÑO METODOLÓGICO.

Tipo de investigación.

La investigación fue de tipo cuantitativo de corte transversal, ya que se pretendía determinar la frecuencia de hemoglobina “S” mediante HPLC en niños, que participaron en investigación de variantes de hemoglobina, en el POLISAL – UNAN Managua, Agosto–Noviembre del 2021.

Según Canales Alvarado & Pineda (1994) una investigación es transversal cuando se estudian las variables simultáneamente en determinado momento, haciendo un corte en el tiempo. En este caso, el tiempo no es importante en relación con la forma en que se dan los fenómenos.

Área de estudio

El estudio se efectuó en el laboratorio de bioanálisis clínico de la UNAN-Managua, en conjunto con el departamento de la carrera y docentes del mismo.

Según Galindo (2020) afirma qué: “El área de estudio es el proceso de selección del área de estudio, es parte de las actividades desarrolladas por el investigador. Esta descripción considera los factores, de principal incidencia que influye en la determinación del área considerada como parte del estudio”.

Universo

Son los niños que presentaron probabilidad de poseer hemoglobina “S” y que presentando anemia no han sido diagnosticados con variantes de hemoglobina, equivalente a 285.

El universo está conformado por toda la población o conjunto de unidades que se quieren estudiar y que podrían ser observadas individualmente en el estudio que concuerdan con una serie de especificaciones. Es la totalidad del fenómeno a estudiar donde las entidades de la población poseen una característica común la cual se estudia y da origen a los datos de la investigación. (Hernández, 2012).

Muestra

La muestra estuvo representada por los niños que asistieron al POLISAL en el período que se realizó el muestreo, por voluntad propia y sin costo alguno, fueron 23.

Es un subconjunto o parte del universo o población en que se llevará a cabo la investigación. La muestra es una parte representativa de la población. (López, 2018)

Criterios de inclusión y exclusión

Se utilizaron los siguientes los siguientes criterios de inclusión:

1. Niños referidos por sospecha de anemia que supieron de la convocatoria hecha por el POLISAL y que el medico les sugirió dicho análisis.
2. Niños con antecedentes clínicos relacionados con anemias que se enteraron de la convocatoria.
3. Niños con antecedentes de anemias que no mejoran con sus tratamientos.
4. Niños con valores de hemoglobina menor o igual a 11 g/dl
5. Niños con poiquilocitosis en el extendido periférico: drepanocitos 1+, 2+, 3+ y 4+.
6. Valor de hematocrito menor de 36 %.

Los criterios de inclusión son las características que deben tener los posibles participantes para considerar su participación de un ensayo, debe de especificar el tipo de análisis usado para establecer el diagnóstico de los pacientes y los requisitos específicos y factores que pueden influir en el pronóstico como la edad, el sexo o la etnia. (Norgaard, 2021).

Criterios de exclusión:

1. Niños sin sospecha de síndromes anémicos o con anemia clasificada y en tratamiento.
2. Niños con hemograma que no reflejen signos de anemia sino de otras enfermedades.

3. Niños diagnosticados con hemoglobinopatías a través de HPLC.
4. Niños que posean recuperación para búsqueda de anemia.

Operacionalización de variables

Objetivo	Variable	Variable conceptual	Dimensiones	Indicadores	Instrumentos
<p>Aplicar el hemograma y extendido periférico a los niños muestreados en el POLISAL UNAN- Managua, Agosto A Noviembre de 2021</p>	<p>Hemograma</p> <p>Extendido periférico</p>	<p>El hemograma es el recuento de células sanguíneas</p> <p>El extendido periférico es una película realizada en una lámina donde las células son expuestas al microscopio</p>	<p>→ Drepanocitosis</p> <p>→ Poiquilocitosis</p> <p>→ Trombocitosis</p> <p>→ Leucocitosis</p> <p>→ Anisocitosis plaquetaria</p> <p>→ Anisocromía.</p> <p>→ Hto: 10 - 36%</p> <p>→ HBa; 6 - 11 gr/dl.</p> <p>→ RBC: 500 000 – 3 millones GR x mm³</p> <p>→ Eritrocitos normales</p> <p>→ Leucocitos normales</p> <p>→ Plaquetas normales</p> <p>→ Hto: 36 – 48 %</p> <p>→ HBa; 12-16 gr/dl.</p> <p>→ RBC: 3-6 millones GR x mm³</p>	<p>Muestra sospechosa con Hba S</p> <p>Muestra no sospechosa con Hba S</p>	<p>Microscopio.</p> <p>Equipo automatizado para BHC.</p>

<p>Interpretar los resultados de las muestras analizadas mediante HPLC.</p>	<p>Cromatografía líquida alta presión.</p>	<p><i>High pressure liquid chromatography</i> (HPLC) es de intercambio iónico, se utiliza para la medición de las diferentes fracciones de hemoglobina para conocer el porcentaje de cada fracción del paciente.</p>	<p>Porcentaje de fracciones:0-100%</p> <p>Tiempo de retención: 0-6 min</p> <p>Espacio ocupado en columna de intercambio iónico.</p>	<p>Alto</p> <p>Bajo</p> <p>Nulo</p>	<p>Bio rad D10</p>
<p>Clasificar según características sociodemográficas a los niños con HbS</p>	<p>Edad</p> <p>Sexo</p> <p>Procedencia</p>	<p>La edad se refiere a los meses o años cumplidos desde el nacimiento.</p> <p>El sexo se describe por poseer órganos masculinos o femeninos.</p> <p>La procedencia es el lugar de origen de un individuo natural.</p>	<p>0-15 años</p> <p>Masculino</p> <p>Femenino</p> <p>Departamentos de Nicaragua.</p>	<p>Lactante: 0 - 2 años</p> <p>Pre escolar 3-5 años</p> <p>Escolar 6-10 años</p> <p>Adolescencia 11-15 años</p>	<p>Microsoft Excel</p>
<p>Relacionar las concentraciones de hemoglobina “S” con el</p>	<p>Hemoglobina S</p> <p>Drepanocitos</p>	<p>Es un tipo anormal de hemoglobina hereditaria</p>	<p>Rango porcentual de Hemoglobina S:</p> <p>→ 0-30%</p> <p>→ 31-50%</p>	<p>Enfermos leves</p>	<p>Hoja de resultados de extendido</p> <p>Gráficos.</p>

<p>extendido periférico de los niños muestreados</p>			<p>→ 51-100% Reporte en cruces de extendido periférico: → 0,1 – 1% célula falciforme: 1+ → 1 – 5% célula falciforme: 2+ → 5 – 15% célula falciforme: 3+ → Mayor de 15% célula falciforme: 4+</p>	<p>Enfermos graves</p>	
---	--	--	---	------------------------	--

Métodos técnicas e instrumentos de recolección de la información.

El instrumento de recolección de la información es una ficha en la cual se obtuvo los datos de importancia del paciente y una hoja de resultados que proporcionó el equipo y que posteriormente fueron copiados en una base de datos.

Como instrumento para el analizar las muestras se utilizó el equipo Medonic M32 para realizar todos los conteos hematológicos de cada línea celular y todos los índices hematimetricos; también se utilizó el Bio rad D10, que utiliza el método High pressure liquid chromatography (HPLC) de intercambio iónico para la medición de las diferentes fracciones de hemoglobina para conocer el porcentaje de cada fracción del paciente.

Procedimiento y métodos.

Nombre de la técnica:

1. Procedimiento de Hemograma.

Es un conjunto de pruebas de laboratorio médico realizadas a la sangre de un ser vivo con el fin de obtener información sobre el número, composición y proporciones de los elementos figurados de la sangre. Para este procedimiento se requiere tubos morados con anticoagulante EDTA para luego etiquetar el tubo del paciente con sus datos generales y de esta manera en el sistema que el equipo de biometría posee dará código de barras para colocarlo a los tubos, de esta forma el equipo reconoce la identificación de cada tubo para poder procesarlos. El proceso es rápido y preciso, ya que el instrumento realiza repetidas secuencias de lecturas de los elementos 100 o 1000 veces, según el instrumental, entregando el resultado solo si después de esas repeticiones la precisión es aceptable, dando resultados de los parámetros de las tres series, serie roja, blanca y plaquetaria.

2. Procedimiento para extendido periférico.

El extendido sanguíneo es un estudio que brinda información precisa acerca de la distribución, morfología normal y patológica de leucocitos, eritrocitos, y plaquetas. Así como la apreciación de la concentración y distribución de la hemoglobina, recuento diferencial porcentual de células blancas, además de artificios y apreciación cualitativa del número de trombocitos. El extendido sanguíneo es realizado mediante un procedimiento técnico en el que una pequeña gota de sangre es colocada en una laminilla de cristal y es arrastrada de manera

inmediata con una con una segunda laminilla para obtener un barrido de la misma, que se caracteriza por ser fino, sin burbujas y homogéneo. Luego de este procedimiento se procede a la tinción de Wright en donde consiste en cubrir las láminas con 15 a 20 gotas del colorante; dejar hacer efecto por 2 a 3 minutos, poner 20 gotas de agua destilada en la lámina y homogeneizar, Colorar durante 3 a 5 minutos y como paso final escurrir y lavar en agua corriente para que puedan Secarse las láminas. Luego observar al microscopio en 100x con aceite de inmersión con el propósito de revisar el tamaño, la forma y el número de los tres tipos de células sanguíneas: Los glóbulos rojos, Los glóbulos blancos y plaquetas.

3. Procedimiento HPLC.

Para procesar las muestras se utilizará el modelo D10 de la Marca Bio – Rad, este modelo nos permite conocer las fracciones de hemoglobina que nos interesan en nuestro estudio. Este requiere de un reactivo producido por la misma casa comercial Bio – Rad llamado D10 dual program re-order pack que posee una columna de intercambio iónico, 4 controles 2 de la fracción A1c alto y bajo, y 2 de la fracción A2 alto y bajo, soluciones buffer y wash.

El equipo requiere de una muestra de sangre con el anticoagulante EDTA, que esté tomada de la mejor manera posible y que no posea hemólisis. Este realiza todos los procedimientos de manera automatizada, solo requiere de una dilución de la muestra en caso de que el tubo no posea una cantidad suficiente de muestra.

Procedimiento para la recolección de la información.

Autorización.

Para el desarrollo de esta investigación, se contó con la autorización y el apoyo de la universidad UNAN – Managua, también se necesitó del permiso por parte de las autoridades del Instituto Politécnico de la Salud - POLISAL en autorizar esta investigación y posteriormente el apoyo del departamento de Bioanálisis clínico proporcionándonos el uso del laboratorio y el equipo, con sus reactivos y materiales sin costo alguno.

Capacitación.

Este trabajo requirió la capacitación autodidacta por parte de los investigadores y las capacitaciones de los ingenieros y profesores que hacen uso del equipo.

Recursos

Para la realización de este estudio, se contó con una serie de recursos como lo es la disposición e interés de cada integrante, la disposición de un kit reactivo para el equipo que es proporcionado por la universidad, específicamente del departamento de Bioanálisis clínico, la implicación de ciertos materiales utilizados en la recolección de datos como la reproducción de papelería, y materiales para el procesamiento de las muestras:

1. Guantes.
2. Tubos con EDTA K2.
3. Agujas.
4. Algodón.
5. Papel toalla.
6. Alcohol.
7. Mascarillas.
8. Laminas cubre porta objetos.
9. Tinción Wright.

Supervisión y coordinación.

Como personas encargados de la recolección de información, fue importante considerar con la debida atención la gestión administrativa de la investigación, apartar fondos de emergencias, compra de materiales, entre otros. Las acciones de supervisión fueron realizadas por docentes de la universidad y la directora de la carrera, para garantizar unos buenos resultados.

Proceso.

Después que se obtuvo la muestras en el área de toma de muestras del laboratorio de Bioanálisis clínico de la UNAN Managua. Antes de su procesamiento se contó con la calibración del equipo por parte del ingeniero que realiza el mantenimiento de parte de DIAMED Nicaragua y se montaron calibradores cada vez que se procesaron las muestras, además de controles de fracciones de variantes de hemoglobina. Las muestras fueron manipuladas con el procedimiento ya establecidos y los resultados se interpretaron conforme la tabla de valores del equipo y se comparó con los parámetros que se usan en el país.

Posteriormente los resultados fueron procesados estadísticamente y se realizó un informe final de acuerdo a las normativas de la universidad.

Se hizo una publicación del documento oficial omitiendo toda información que vinculara datos personales, garantizando el anonimato de los involucrados y guardando los aspectos éticos obligatorios.

Tiempo.

El periodo global de la investigación duró a partir del mes de Agosto, hasta el mes de Noviembre del año 2021.

Ética de la investigación.

En la investigación se abordó diferentes aspectos éticos que aseguraron el bienestar de los participantes. Se focalizó el interés en la consideración de los aspectos éticos de la investigación, en su naturaleza y fines (respeto a la dignidad del ser humano, a la autonomía de su voluntad, protección de sus datos - privacidad, confidencialidad y bienestar). Como otro punto clave de la investigación fue la honestidad con la que se presentó los resultados, con el fin de mostrar la realidad, en aras de mejorar la salud de los participantes y el avance hacia nuevos métodos diagnósticos. De igual forma los investigadores garantizaron la precisión y exactitud de los datos analizados durante todo el proceso de investigación.

Plan de tabulación y análisis

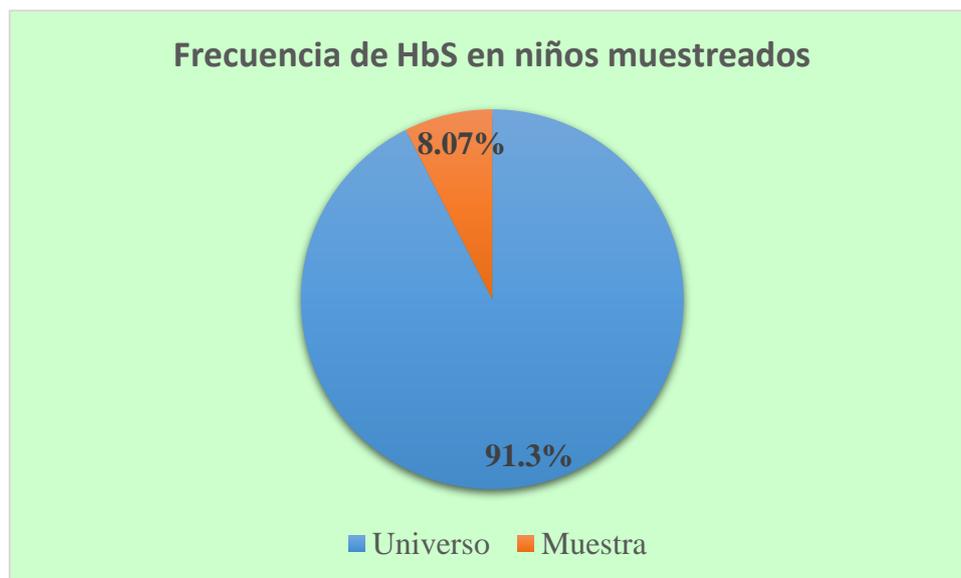
Para la realización de esta monografía se realizó el uso de los siguientes programas informáticos como son:

- **Microsoft Word**, para la elaboración y estructuración del documento.
- **Microsoft Excel**, para crear una base de datos de toda la información personal de todos los participantes y para crear gráficos con la información recolectada
- **Microsoft PowerPoint**, para la presentación de todos los resultados obtenidos y para el procesamiento de la información recolectada, elaboración de herramientas para observar resultados como son gráficos, estadísticas, los cuales permiten interpretar y discutir la información.

IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

En base a todos los criterios de aceptación y rechazo que se aplicaron, se hicieron hemograma y extendido periférico, para luego tomar decisión en base a estos resultados y confirmar por HPLC la presencia de HbS en 23 niños de los cuales se obtuvieron los diferentes resultados:

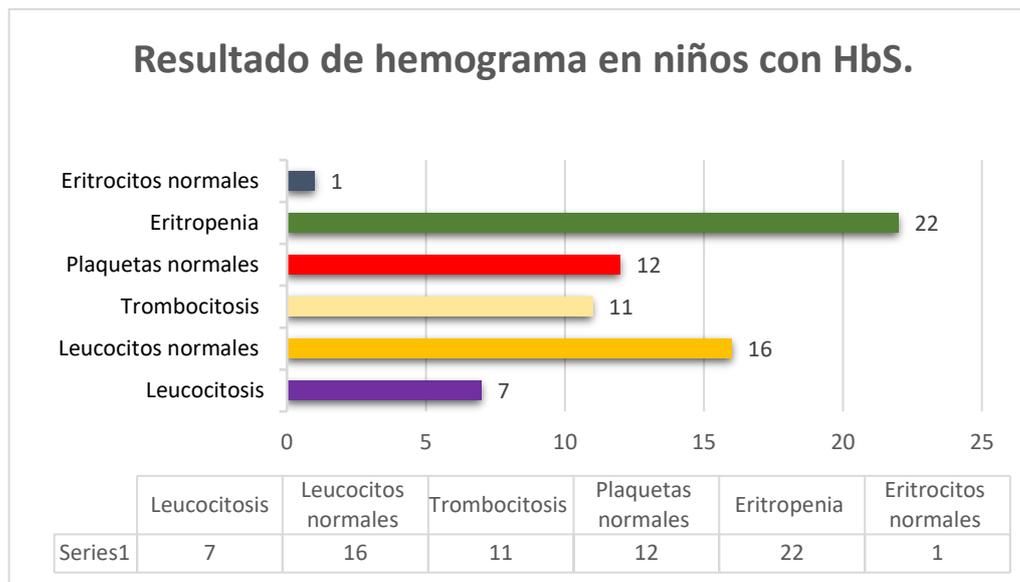
Gráfico 1. Frecuencia de hemoglobina S en niños muestreados.



Fuente: Datos obtenidos de tabla N°1.

De 285 niños que representan el universo de potenciales aspirantes al estudio, a través del método HPLC se logró confirmar la presencia de HbS en 23 niños, lo cual representa una frecuencia relativa del 8.07% de pacientes con hemoglobina S.

Grafico 2. Resultado de hemograma aplicado a los pacientes con HbS.



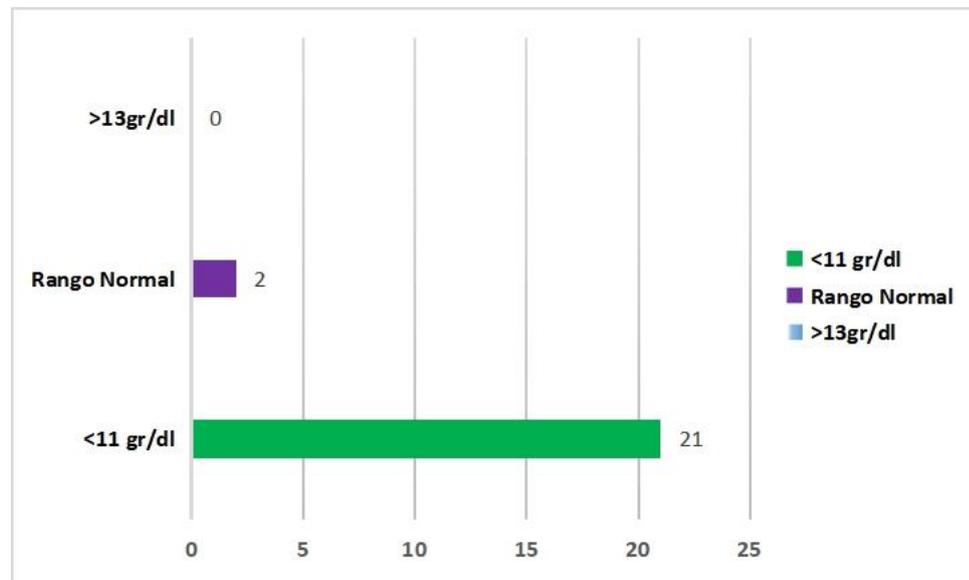
Fuente: Datos obtenidos de tabla N°2.

Los resultados de los hemogramas muestran que los niños presentaron trombocitosis, leucocitosis y eritropenia. Ortiz (2016) menciona que el hemograma proporciona una información importante en el diagnóstico del paciente puesto que en relación de la severidad, la disminución de algunos parámetros como hemoglobina, hematocrito y glóbulos rojos, el médico puede sospechar de estos tipos de hemoglobinopatías.

Moraleda (2017) menciona que los pacientes con hemoglobina “S” tienen un riesgo trombótico venoso elevado, debido a que estos poseen un estado de hipercoagulabilidad relativamente alto, especialmente los adultos, las embarazadas y los sujetos esplenectomizados. Estos pacientes también pueden estar acompañados por leucocitosis discreta. Dentro de los resultados obtenidos fuera de los valores normales se logró diagnosticar 7 niños con leucocitosis y el restante dentro de los valores normales, 11 niños con trombocitos y 12 normales, y para finalizar 22 pacientes con eritropenia el restante se mantuvieron dentro del rango normal.

Estos resultados demuestran que los pacientes se encontraban con procesos de hemólisis intravascular debido a la disminución de glóbulos rojos en su sistema, también, se puede sospechar de crisis vaso oclusivas debido al aumento de las plaquetas y los glóbulos blancos.

Gráfico 3. Valores de hemoglobina de los niños con HbS.

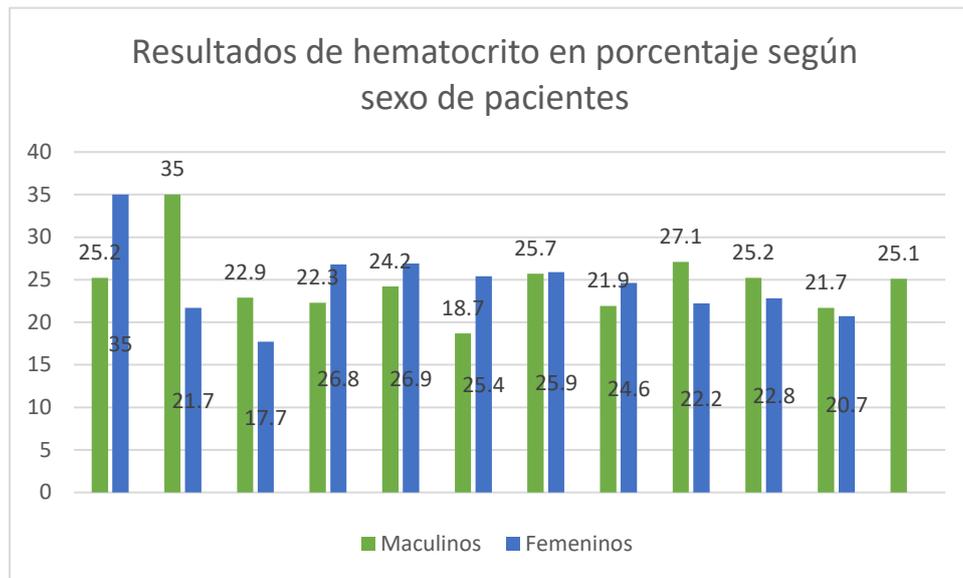


Fuente: Datos obtenidos de tabla N°3.

Se logró encontrar que el 91% de los pacientes padecen una deficiencia de la proteína hemoglobina y el 9% oscila dentro de los valores normales. La Hemoglobina es una proteína globular, que se encuentra en grandes cantidades dentro de los glóbulos rojos e importancia fisiológica, para el aporte normal de oxígeno a los tejidos.

El resultado de los valores menores del rango nos da el aporte de que los pacientes atraviesan una anemia drepanocítica severa. Braunstein (2018) menciona que los eritrocitos en forma de hoz ocluyen el vaso y son propensos a la hemólisis, lo que provoca crisis de dolor intenso, isquemia orgánica y otras complicaciones sistémicas. Las exacerbaciones agudas (crisis) pueden ser frecuentes.

Gráfico 4. Porcentaje de hematocrito según el sexo de los pacientes

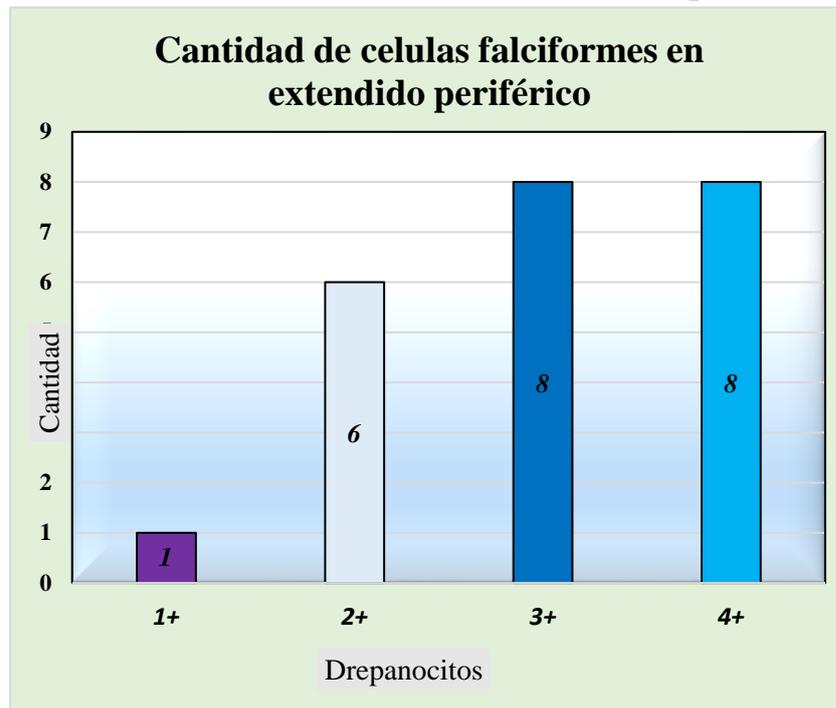


Fuente: Datos obtenidos de tabla N°4.

En las barras verdes se pueden observar los resultados de los 12 varones y en azules los 11 pacientes femeninos. Se puede observar que los resultados ninguno supera el 35% en valores de hematocrito, esto se fundamenta con la disminución que existe de glóbulos rojos y los niveles bajos de hemoglobina.

Dentro de los parámetros del hemograma se pudo encontrar los porcentajes del hematocrito de los pacientes según su sexo dando como resultado porcentajes mínimo de 18.7% para el sexo masculino y para el sexo femenino un 22.8% lo cual la literatura nos dice que los valores normales van desde el 35% hasta el 45% según Rodríguez (s.f.).

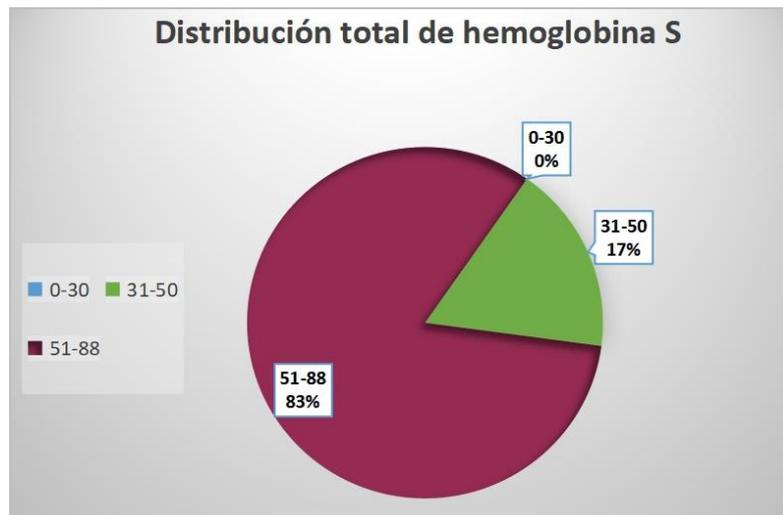
Gráfico 5. Cantidad de células falciformes en lectura de extendido periférico.



Fuente: Datos obtenidos de tabla N°5.

En la lectura del extendido periférico se obtuvo que gran parte de los pacientes en estudio presentaban un promedio mayor a 5 células falciformes o drepanocitos, representando el 69.56% frente a un 30.44% con extendidos menores de 5 drepanocitos por campo. Utilizándose el criterio de Boza (2016) que menciona se debe reportar en cruces la cantidad de células encontradas por campo, siendo 1+ de 0-1 células, 2+ de 1-5 células, 3+ de 5-15 células y de 4+ de 15 a más células encontradas por campo visible. Los pacientes con hemoglobinas S mayores a 50% presentaron un incremento significativo en la presencia de drepanocitos en el extendido.

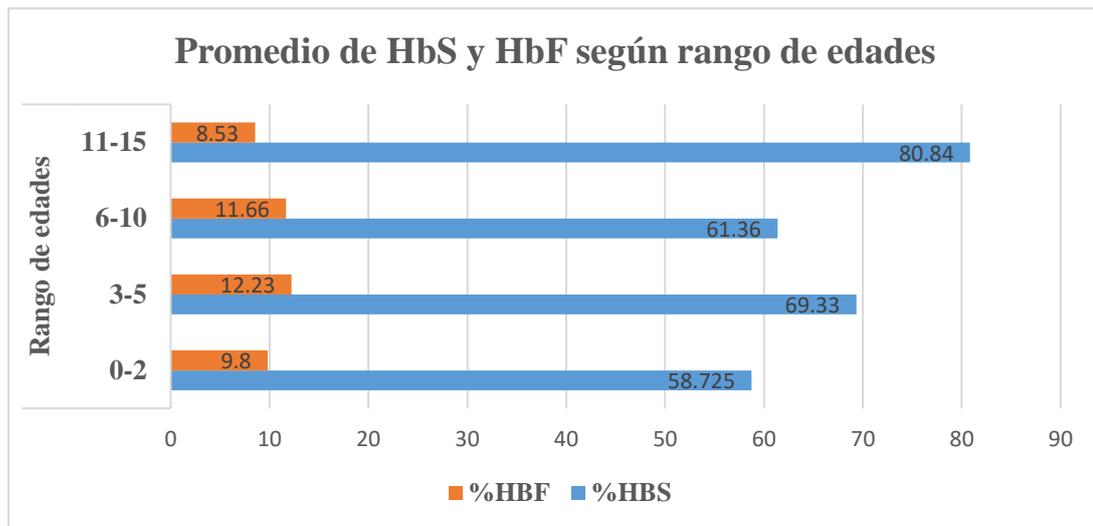
Gráfico 6. Distribución total de hemoglobina S.



Fuente: Datos obtenidos de tabla N°6.

Se encontró que el 83% de los resultados se encontraban dentro de un rango entre 51 - 88% de hemoglobina S, el 17% entre un rango de 31 - 50% y el 0% entre 0 - 30%. Estos resultados reflejan que la parte más significativa de la población es de son individuos homocigotos SS, es decir son portadores de dos genes que producen hemoglobina S, haciendo que sus niveles sean elevados. La otra parte de la población, niños que tuvieron menos de 50% de HbS, algunos pueden hasta ser asintomáticos debido que son portadores de un gen defectuoso, haciendo que la producción de esta hemoglobina anormal sea menor. Este criterio es en base a lo indicado por los fabricantes del equipo, que consideran que todo individuo mayor a 50% debe considerarse homocigoto, y cifras menores se consideran heterocigoto.

Gráfico 7. Promedio de Hemoglobina S y Fetal según Rango de edades.



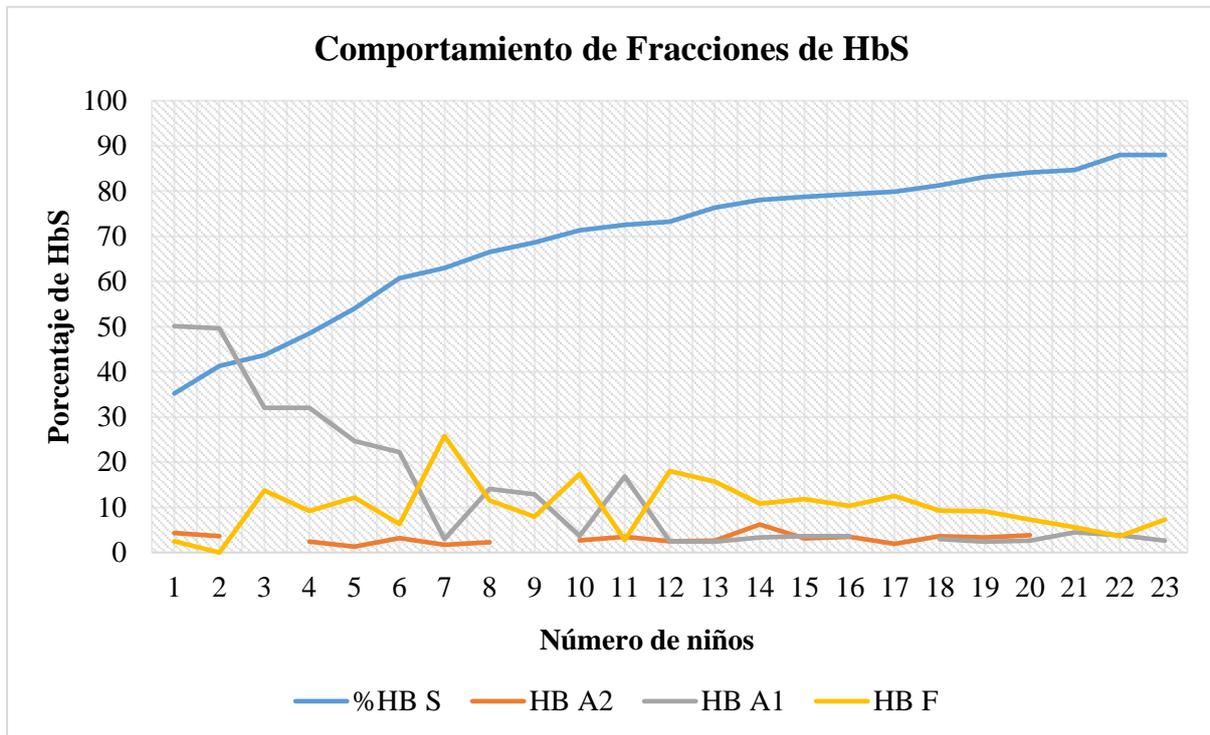
Fuente: Datos obtenidos de tabla N°7.

A través de la técnica de HPLC se logró conocer las fracciones de la hemoglobina S y la hemoglobina F partiendo de esto se logró promediar los porcentajes de éstas según los diferentes rangos de edades. Se puede observar que el porcentaje medio mayor le pertenece a los niños en las edades entre 11 – 15, con un 80.84% de HbS media, sin embargo es el rango de edad más bajo en lo que respecta a HbF con un 8.53% medio.

Dentro de los parámetros normales un individuo sano debería tener rangos menores al 1% de hemoglobina fetal. Ortega (2020) en su estudio de comportamiento de las fracciones de hemoglobina, menciona que en ambos sexos la fracción normal de hemoglobina A1 es del 96.03%, 2.92% para la Fracción A2, 0.734% para la fracción menor que corresponde a la Hb Fetal y 5.32 para la Hb glicosilada o Hb A1c.

En comparación a los resultados obtenidos, se puede observar que hay un aumento considerable de esta fracción F, lo cual es explicado por la propiedad que posee la hemoglobina fetal desde el punto de vista clínico. La HbF en estos casos aumenta debido a que sirve como protector del individuo, cumpliendo con la función de transportar oxígeno y cumple con la misma eficiencia de la hemoglobina A1, es una hemoglobina colaboradora de la oxigenación del niño esto como respuesta a la incapacidad de los eritrocitos deformados de hacer este transporte. Orkin (2011) en su artículo menciona que entre más hemoglobina fetal se encuentre en el individuo es mejor, recalando de la elevación de los niveles de la proteína fetal parecen no tener efectos secundarios tóxicos en el individuo.

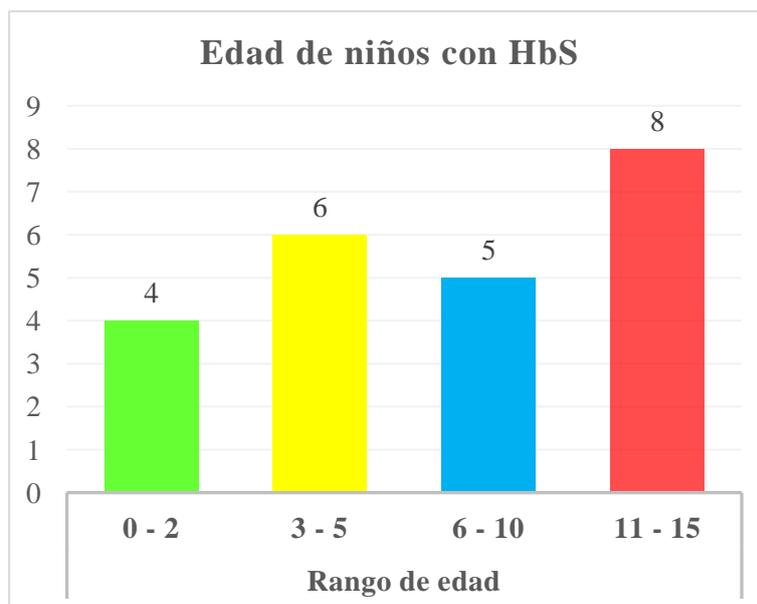
Gráfico 8. Comportamiento de las Fracciones de Hb.



Fuente: Datos obtenidos por autores de la monografía.

En el gráfico anterior se muestran los resultados de HPLC de los 23 niños muestreados. Algunas líneas que se encuentran discontinuas como la de HbA₂ se encuentran así debido a que la cantidad que detecto el D10 es muy baja o nula. En la imagen se puede observar que existe una relación de equivalencia en la fracción HbA₁ y la HbS, cuando esta última aumenta existe un descenso significativo de la HbA₁. Otro fenómeno observable es el comportamiento de la fracción HbF, cuando existe un aumento de la HbS, los niveles de HbF aumentan, esto en respuesta a la necesidad que existe en el cuerpo de transporte de oxígeno.

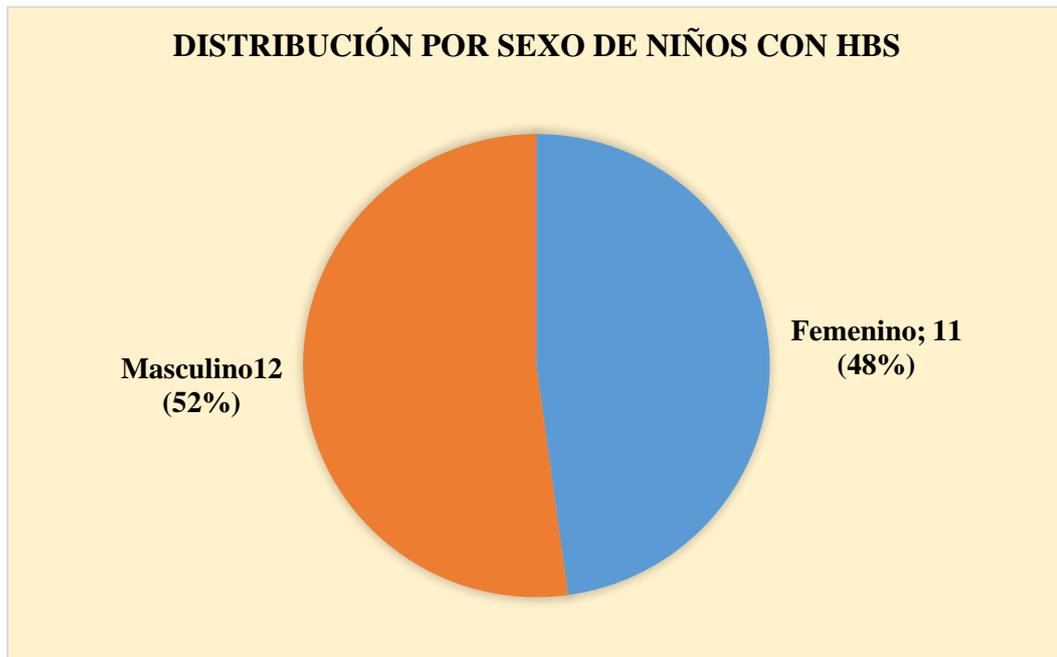
Gráfico 9. Edades de los niños estudiados con HbS.



Fuente: Datos obtenidos de tabla N°8.

Mediante el uso de la ficha de recolección de datos que se aplicó a los padres de familia de cada niño se logró clasificar las edades de los estudiados en donde se clasificaron diferentes rangos de edades y se logró concretar que dentro las edades de 0-2 años de edad tanto femenino como masculino hay una cantidad de 4 pacientes con HbS, que es el 17.39% de la muestra. En la escala de 3 - 5 años es el rango se encontraron 6 niños de ambos sexos, 26.1% de la muestra. El siguiente rango de edades es de 6 a 10 años se encontró una cantidad de 5 niños con HbS dentro de ambos sexos, siendo el 21.73% de la muestra y por ultimo rango de 11-15 años se muestrearon la cantidad de 8 niños, siendo este el rango que más casos presenta de HbS representando el 34.78%.

Gráfico 10. Frecuencia de niños con HbS según sexo.

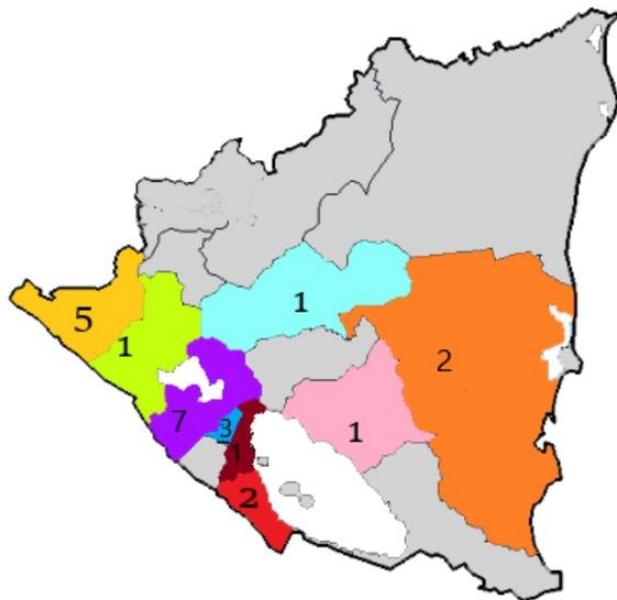


Fuente: Datos obtenidos de tabla N°9.

Se analizaron los datos según la variable sexo, obteniendo un predominio de la HbS en el sexo masculino con una cantidad de 12 pacientes con una relación del 52%, 11 para el sexo femenino con una relación del 48%. En este estudio se encontró que la hemoglobina S predomina más en niños que en niñas, lo cual coincide con la literatura, Maitland (2014) en su investigación realizada en la ciudad de San José, Costa Rica, encontró un predominio del sexo masculino con 60% relativo respecto a su población. Sin embargo, Corea (2017) en la realización de su estudio en el hospital Mario Catarino Rivas en Honduras, descubrieron que en su población de niños estudiada existía un predominio del sexo femenino con un 56%.

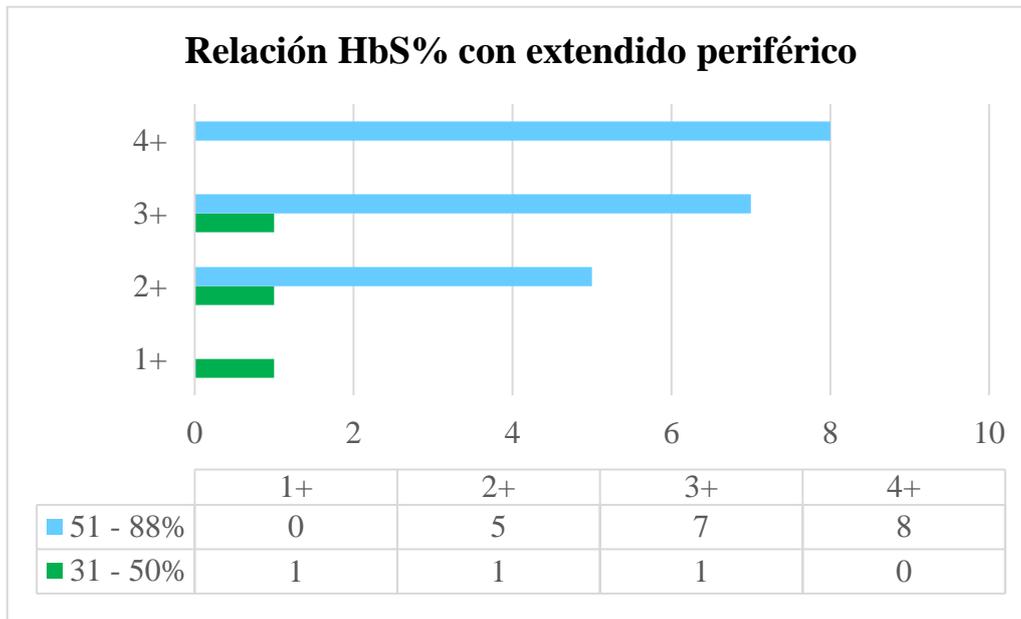
Gráfico 11. Número de niños con Hb S clasificados por departamentos de Nicaragua.

En esta investigación la distribución por departamento fue: Managua es el departamento que más casos presentó, con 7 pacientes, representando el porcentaje más alto con un 31% de los casos, en segundo lugar, Chinandega con 22%, De tercer lugar Masaya representado un 13%, seguidamente Rivas y la RAAS con 9% respectivamente para cada departamento y el 4% para Granada, León, Chontales y Matagalpa.



Fuente: Datos obtenidos de tabla N°10.

Gráfico 12. Relación HbS% con extendido periférico.



Fuente: Datos obtenidos de tabla N°11.

Este gráfico muestra que los extendidos periféricos de los niños que poseen HbS en un rango entre 51 – 88% obtuvieron cantidades mayores de drepanocitos, con 8 niños con 4+, 7 niños con 3+ es decir, se encontraron más de 5% de células falciformes en el extendido, y 5 niños con 2+, su conteo fue entre 1-5% de drepanocitos. Los demás niños entre 31 -50% de HbS como mayor numero presentaron 3+, es decir entre 5 a 15% de células falciformes en su extendido. Con estos resultados se refleja que existe una relación estrecha entre el número de células falciformes encontradas en el extendido, con la cantidad de HbS del niño.

X. CONCLUSIONES.

1. Se Aplicó el hemograma y extendido periférico a los niños participantes y se encontró que el 91.3% tenía anemia menor 11gr/dL, el 30.4% tenía leucocitosis, 47.83 % presentaron trombocitocis y el 95.65% mostraron eritropenia en sus biometría. Todos presentaron drepanocitos entre 1-4 cruces.

2. El HPLC revelo un 83% de niños con HbS entre 51-88% y 17% entre 31-50% de HbS. El rango de edad que presentó más % de HbS fue entre 11-15, con un porcentaje medio de HbS de 80.84% y también es el que presento menos HbF con un 8.53% de media.

3. Hubo un predominio del sexo masculino en los niños muestreados con un 52% y un 48% para el sexo femenino. También el predominio de niños con HbS fueron entre 11 – 15 años con 8 casos siguiéndole los niños entre 3 – 5 años con 6. El departamento que presento más casos de HbS fue Managua con un 31%, siguiéndole Chinandega con 13% y Masaya con 13%.

4. Los extendidos periféricos de los niños que poseen HbS en un rango entre 51 – 88% obtuvieron cantidades mayores de drepanocitos en su extendido periférico representando el 86.9% de niños con conteos mayores 5 células falciformes por campo.

XI. RECOMENDACIONES.

Al departamento de **Bioanálisis Clínico** a continuar impulsando investigaciones con enfoque en el diagnóstico y rastreo de los portadores de esta hemoglobinopatía; para que de esta manera se les pueda brindar la oportunidad de amenorar esta condición genética en sus futuras generaciones.

A los **estudiantes** de Bioanálisis Clínico, continuar con la presente temática investigativa; con el objetivo de conocer la magnitud de la problemática en Nicaragua de esta enfermedad.

A la **UNAN Managua** en Divulgar la información encontrada en esta investigación a través de sus diferentes plataformas, para despertar el interés científico por el tema investigado.

Al **MINSA** en impulsar nuevos proyectos en sus unidades de salud relacionados al diagnóstico temprano y oportuno de la anemia drepanocítica. Facilitando que se establezcan algoritmos.

XII. BIBLIOGRAFÍA.

- Bio-Rad Laboratories Inc. (2018). *Dual Program Analytical Cartridge Insert*. California: Clinical diagnostics groups.
- Bio-Rad Laboratories Inc. (2022). *D10 Hemoglobin Testing System - Operation Manual*. California: Clinical Diagnostics Group.
- Bio-Rad Laboratories Inc. (2010). *D10 Dual program - Manual de instrucciones*. California: Clinical diagnostics groups.
- Boza, S. (2016). *Fundamentos de Hematología*. San José: Editorial UCR.
- Brandan, N., & Victoria, A. (2008). Hemoglobina. En F. d. UNNE. UNNE.
- Campuzano. (2008). Utilidad clínica del extendido de sangre periférica. Colombia, Colombia: Editorial médica colombiana. Recuperado el 22 de octubre de 2022.
- Canales, O., López, J., & Perez, D. (2020). *Determinación de glicohemoglobina HbA1c Dual por el método HPLC en habitantes del distrito II que asistieron a la feria de la salud realizada por el POLISAL en la ciudad de Managua, Departamento de Managua*. Managua: UNAN - Managua.
- Castro, Norma, G., & Rafael. (2004). *BIOSÍNTESIS DEL GRUPO HEMO*. Mexi.
- Cela, E., & Belendez, C. (2016). Interpretación de la electroforesis de hemoglobina. *Desde el laboratorio a la clínica*, 5-8.
- Centro Nacional de genética médica. (2017). hemoglobinopatías. *Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia*, 36. Recuperado el 22 de Octubre de 2022.
- Corea, D. (2017). *Caracterización clínica epidemiológica en pacientes pediátricos con anemia drepanocítica en el hospital Mario Catarino Rivas, Honduras*. San Pedro Sula: Universidad Nacional Autónoma de Honduras en el valle de Sula.
- Erramoupe, B., & Eaudi, E. (2016). *Técnicas convencionales aplicadas al diagnóstico de las hemoglobinopatías*. Buenos Aires, Argentina.

- Herrera, E. (2013). La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *Revista Médica Hondureña*, 81(1), 40 - 45.
- Maitland, R., & Valverde, K. (2014). Análisis de pacientes drepanocíticos tratados con Hidroxiurea en el Hospital Nacional de niños. *Acta Médica Costarricense*, 56(2), 49-53.
- Marina Bayo, A., & Yusá, D. (01 de 11 de 2022). *HPLC Instrumental* . Obtenido de https://gdocu.upv.es/alfresco/service/api/node/content/workspace/SpacesStore/0fc53ce9-a267-4235-85bb-31be388412c0/TOC_0360_11_01.pdf?guest=true
- Medlineplus. (27 de Septiembre de 2020). *Ataque al corazón*. Obtenido de Medlineplus: <https://medlineplus.gov/spanish/heartattack.html>.
- Moraleda, J. (2017). *Pregrado de Hematología 4ta. Edición*. Madrid: Sociedad española de hematología y hematoterapia.
- Moraleda, Fuentes, B., Belloso, M., & Martha. (2021). Hemoglobina, estructura y trastornos, revisión bibliográfica. En R. S. INVESTIGACIÓN. RSI.
- Orkin, S. (2013). Reversion de anemia de células falciformes mediante acitvación de hemoglobina fetal. *Howard Hugher Medical Institute* Obtenido de: <https://www.hhmi.org/news/reversi-n-de-anemia-de-c-lulas-falciformes-mediante-activaci-n-de-hemoglobina-fetal#:~:text=La%20hemoglobina%20fetal%20difiere%20de,madre%20al%20feto%20en%20desarrollo..>
- Ortega, L., Ruiz, D., & Vanegas, J. (2022). Comportamiento de Fracciones de Hemoglobina en adultos sanos mediante HPLC. *Revista Torreón universitario*.
- Ortiz, M., Requenez, Y., & Salinas, J. (2016). *Caracterización fenotípica de hemoglobina en pacientes con diagnóstico clínico de anemia drepanocítica y familiares en las cabeceras departamentales de Nicaragua mediante electroforesis de Hemoglobina en tirar de acetato de celulosa*. Managua: UNAN - Managua.
- Química. ES. (Marzo de 2020). *Globinas*. Obtenido de Química. ES: <https://www.quimica.es/enciclopedia/Globina.html>

- Rodak, B., Fritsma, G., & Keohane, E. (2014). *Hematología Fundamentos y aplicaciones clínicas*. Montevideo: Medica Panamericana.
- Ruiz, E., Hernández, A., Nieva, B., García, J., Hernández, C., Salamanca, F., & Peñaloza, R. (2003). Anemia de células falciformes y niveles de hemoglobina fetal. *Revista Médica IMSS*, 41(4), 299-303.
- Saenz, G., Valverde, B., Rodriguez, W., Jiménez, R., Salazar, L., Boza, S., . . . Granados, M. (2016). *Hematología Analítica*. San José: EDNASS - CCSS.
- Sans, S., Raebel, B., & Vives, C. (2001). *Hematología clínica* (Vol. 4). Madrid, España: ELSEVIER.
- Salazar-Lugo, R. (2004). La Hemoglobina S en la población venezolana. *Investigación clínica*, 45(2), 175-183.
- Yahyaoui, R. (02 de 11 de 2022). *Importancia de la HbA1c en el control de pacientes con diabetes*. Obtenido de https://www.sanac.org/images/site/Documentos/Documentos_Comision_Cientifica/Otros_Documentos/hemoglobina_glicosilada_nuevas_perspectivas.pdf

XIII. ANEXOS.

ANEXO I: Ficha de recolección de datos de los pacientes.

Hoja de datos generales del paciente.

Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua UNAN -Managua

Instituto Politécnico De La Salud “Luis Felipe Moncada”

Licenciatura De Bioanálisis Clínico



Formulario de datos generales.

DATOS GENERALES.			
			Fecha: ___/___/___ Hora: _____ am / pm
Nombres:		Apellidos:	
Edad	Años	Diagnóstico	
Sexo:	F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>		
Procedencia.		Dirección domiciliar	

ANEXO II: Hoja de resultados de Biometría Hemática completa.



Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua Unan-Managua

Instituto Politécnico De La Salud Luis Felipe Moncada

Licenciatura De Bioanálisis Clínico

Biometría hemática completa

Nombre:

Edad:

Sexo:

Código:

Resultado:

Formula roja	Resultado	Valores de referencia
Eritrocitos.....		
Hemoglobina.....		
Hematocrito.....		
Volumen globular medio.....		
Concentración media de Hb.....		
Concentración media de Hb corpuscular.....		
Índice de distribución de eritrocitos CV.....		
Índice de distribución de eritrocitos SD.....		

Serie plaquetaria	Resultado	Valores de referencia	
Plaquetas.....			
Volumen plaquetario medio...			
Plaquetocrito.....			

Formula blanca	Resultado	Valores de referencia	
Leucocitos totales...			
Neutrófilos totales...			
Neutrófilos segmentados....			
Eosinófilos.....			
Basófilos.....			
Mocitos.....			
Linfocitos.....			
	<hr/> MSc Lorena Ortega Directora y docente /Bioanalista Clínico POLISAL UNAN Managua		
			

ANEXO 3: Hoja de resultados de extendido periférico.



Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua UNAN-Managua.

Instituto Politécnico De La Salud Luis Felipe Moncada

Departamento De Bioanálisis Clínico.

Diferencial.

Nombre:

Fecha:

Hora:

Edad

Sexo:

Resultado:

Diferencial	Resultado
Leucocitos totales	
Neutrófilos totales	
Neutrófilos segmentado	
Eosinófilos	
Basófilos	
Monocitos	
Linfocitos	
Total	

Serie roja

Poiquilocitosis	
Anisocitosis	
Cromia	
Observaciones	

ANEXO 4: Hoja de informe de HPLC.

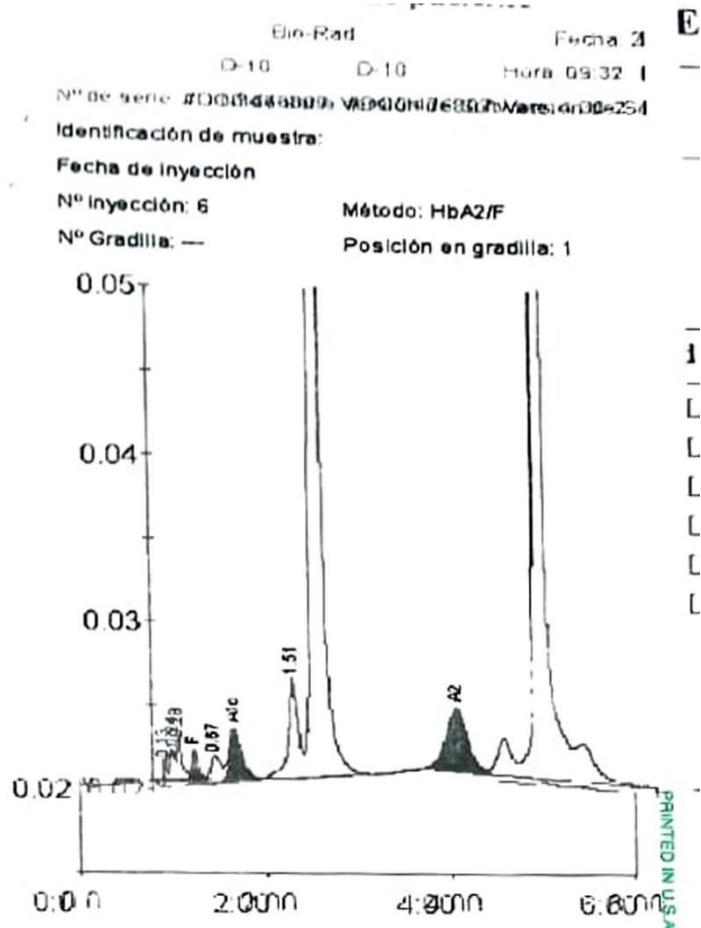


Tabla de identificación de picos:

Pico	Tª retención	Altura	Área	% Área
Unknown	0.13	1897	3303	0.2
A1a	0.24	2056	9702	0.6
A1b	0.28	2841	10572	0.6
F	0.45	2061	11533	< 0.8 *
LA1d/CHb-1	0.67	1638	12522	0.7
A1c	0.88	3125	29803	4.5
P3	1.51	5972	44768	2.6
A0	1.74	188940	870745	49.9
A2	3.28	3779	60638	3.3
S-Window	4.17	149104	692683	39.7
Área total:		1746267		

Concentración:	%
F	< 0.8 *
A1c	4.5
A2	3.3

Fuente: Equipo Bio-Rad D10

ANEXO 5: Hoja de resultados proporcionada por el departamento de Bioanálisis clínico



EXAMEN DE SANGRE. ANÁLISIS DE FRACCIONES DE HEMOGLOBINAS.

Instituto Politécnico de la Salud. Departamento de Bioanálisis Clínico

Datos Generales.

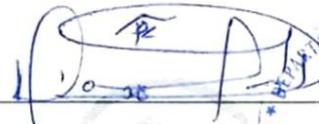
Nombre y apellidos: _____

Edad : _____ **Sexo:** F **Fecha:** 3/9/2021

Resultados

Prueba	Resultado	Unidades	Resultados
Fracciones de hemoglobina	A1	%	17.6
	A2		1.8
	A1c		6.5
	Variantes		
	S		**

**** Hemoglobina Anormal


MSc Magaly Ruiz Saldivar
Docente / Bioanalista Clínico



Fuente: Departamento de Bioanálisis clínico.

ANEXO 6: Ficha de consentimiento informado.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre de los Investigadores:

- Br. Eliezer Guevara
- Br. Marlon Traña.

Nombre del participante.

PROPÓSITO DEL PROYECTO: Nosotros, Br. Eliezer Guevara y Marlon Traña, estudiantes de la Licenciatura en Bioanálisis Clínico de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, esperamos obtener mediante este estudio, la información necesaria para conocer en la presencia de alteraciones de la hemoglobina; sustancia que transporta el oxígeno en la sangre y que cuando está disminuida causa anemia, la cual se refleja por cansancio, mareos y debilidad general.

La población de Nicaragua que acude al POLISAL en estos casos actuando como centro de investigación, que ha estudiado problemas hematológicos como anemias, algunas de las cuales pueden ser trastornos hereditarios que se transmiten de padres a hijos y que afectan a la hemoglobina.

Algunos niños con este tipo de enfermedades nacen sin presentar signos y síntomas, que se manifiestan entre los seis meses y los dos años de vida. Si no son detectados y tratados a tiempo, la mayoría puede sufrir complicaciones o enfermarse en los primeros años de vida. Nuestro estudio pretende ayudar a diagnosticar este tipo de enfermedades.

¿QUÉ SE HARÁ?: Si usted y su hijo(a) aceptan participar en este estudio, se les realizará lo siguiente:

- Una entrevista en la cual usted responderá preguntas sencillas, leerá cada punto de este documento, y si usted está de acuerdo, se procederá a sacarle 3 ml de sangre del brazo a su hijo, limpiando la vena con algodón y

alcohol, utilizando agujas y tubos plásticos estériles. Al finalizar la toma se le colocará un curita en el lugar donde se tomó la muestra.

- Una vez tomada la muestra, se procederá a su procesamiento, posteriormente se realizarán diferentes ensayos para buscar hemoglobinopatías.

RIESGOS:

La participación en este estudio puede significar cierto riesgo o molestia para el niño(a) por lo siguiente:

1. Entumecimiento o cierto dolor en el momento de la punción para la toma de muestra, además, ardor causado por el alcohol y en ciertas ocasiones, un pequeño hematoma (morete).

BENEFICIOS:

1. Como resultado de su participación en este estudio, el beneficio será obtener los resultados de laboratorio, de los porcentajes de cada fracción de hemoglobina. Con su participación en este estudio, también será posible que los investigadores aprendan más acerca de las enfermedades de la hemoglobina y éste conocimiento beneficiará a otras personas en el futuro.
2. Si los exámenes realizados a su hijo presentaran alguna alteración, usted será comunicado a fin de que conozca la situación de salud de su hijo y pueda darle seguimiento al niño.
3. Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted tiene el derecho a negarse a participar o a retirarse del estudio en cualquier momento, sin que ésta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que requiera su hijo.
4. Su participación, la información brindada por usted y los resultados obtenidos en este estudio, **son confidenciales**, los resultados podrán aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica, pero de manera anónima.
5. Usted no perderá ningún derecho legal por firmar este documento.

6. Usted se mantendrá informado de cualquier variación en este proyecto, a través de vía telefónica (89580056 Br. Marlon Traña y Br. Eliezer Guevara 84154525) o mediante visitas personales realizadas por los investigadores o colaboradores en el estudio.

CONSENTIMIENTO He leído o se me ha leído, toda la información descrita en ésta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a que mi hijo(a) participe como sujeto de investigación en este estudio

Nombre y firma Del padre o tutor. _____

Nombre y firma de los investigadores. _____

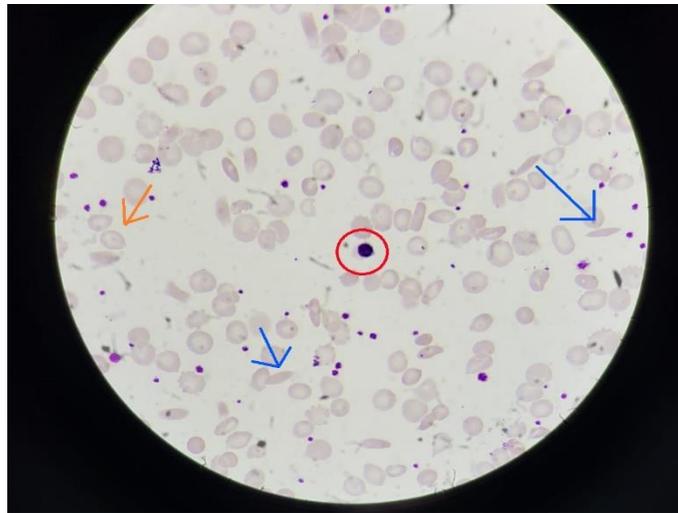
Fecha. _____

Correo de investigadores.

Marlon Antonio Traña Chávez: marlontrana2018@gmail.com

Eliezer Alejandro Guevara Cajina: guevaraeliezeralejandro@gmail.com

ANEXO 7: Células falciformes (flecha azul), codocitos (flecha naranja), eritroblasto (círculo rojo), se puede notar una marcada anisocitosis con macrocitos y microcitos, trombocitosis con anisocitosis plaquetaria.



Fuente: Fotos tomadas por autores de la monografía en durante muestreo.

Tabla número 1. Frecuencia de HbS en niños.

Universo	Muestra
285	23

Fuente: Datos recopilados por los autores de la monografía.

Tabla número 2. Resultado de hemograma aplicado de los pacientes con HbS.

	Leucocitosis	Leucocitos normales	Trombocitosis	Plaquetas normales	Eritropenia	Eritrocitos normales
Cantidad	7	16	11	12	22	1
Porcentaje	30%	70%	48%	52%	96%	4%
Total	100%		100%		100%	

Fuente: Datos recopilados por los autores de la monografía.

Tabla número 3. Valores de hemoglobina.

Rango	<11 gr/dl	11 gr/dl-13gr/dl	>13gr/dl
Cantidad	21	2	0
Suma total de pacientes	23		

Frecuencia porcentual	91%	9%	0%
Total	100%		

Fuente: Datos recopilados por los autores de la monografía.

Tabla número 4. Porcentaje de hematocrito según el sexo de los pacientes

		Rango		
		< 35.0%	35.0%-46.0%	> 46.0%
SEXO	Masculino	12	0	0
	Femenino	11	0	0
Total de pacientes		23	0	0
Frecuencia porcentual		100%	0%	0%
Frecuencia porcentual total		100%		

Fuente: Datos recopilados por los autores de la monografía.

Tabla número 5. Cantidad de células falciformes en lectura de extendido periférico.

Numero de drepanocitos	Cantidad de pacientes
1+	1
2+	6
3+	8
4+	8

Fuente: Resultados obtenidos por los autores de la monografía en lectura de extendido periférico.

Tabla número 6. Distribución total de hemoglobina S.

	Rango de distribución de Hb S %		
	0-30	31-50	51-88
Cantidad de pacientes con HbS	0	4	19
Total	23		
Frecuencia porcentual	0%	17%	83%
Frecuencia porcentual total	100%		

Fuente: Datos recopilados por los autores de la monografía.

Tabla número 7. Promedio de Hemoglobina “S” y Hemoglobina F según Rango de edades.

	Rango de edades			
	0-2	3-5	6-10	11-15
%HBS	58.725	69.33	61.36	80.84
%HBF	9.8	12.23	11.66	8.53

Fuente: Datos recopilados por los autores de la monografía.

Tabla número 8. Clasificación de las edades de los pacientes estudiados con HbS.

Rango de edades	Cantidad de pacientes con HbS	Porcentaje
0-2 años	4	17%
3-5 años	6	26%
6-10 años	5	22%
11-15 años	8	35%
Total	23	100%

Fuente: Datos recopilados por los autores de la monografía.

Tabla número 9. Porcentaje y cantidad total de pacientes con HbS según sexo.

Sexo	Cantidad	Porcentaje
Masculino	12	52%
Femenino	11	48%
Total	23	100%

Fuente: Datos recopilados por los autores de la monografía.

Tabla número 10. Número de pacientes con HbS clasificados por departamentos de Nicaragua.

Departamento	Frecuencia de portadores	Frecuencia porcentual
Rivas	2	9%
Chinandega	5	22%
Masaya	3	13%
Managua	7	31%
RAAS	2	9%
León	1	4%
Matagalpa	1	4%
Granada	1	4%
Chontales	1	4%
Total	23	100%

Fuente: Datos recopilados por los autores de la monografía.

Tabla 11. Relación HbS% y extendido periférico.

	1+	2+	3+	4+
Menor de 30%	0	0	0	0
31 - 50%	1	1	1	0
51 - 88%	0	5	7	7

Fuente: Datos recopilado por los autores de la monografía.