

21. Salwa F, Yasser H, Hussein A, Hassaniem M. Neurological disorders in shoe-makers and the role of some trace elements. *J Am Sci.* 2011;7:145-153.
22. Somnath G, Tarannum A, Samrat D, Goutam G, Tamal D. An occupational health study of the footwear manufacturing workers of Kolkata, India. *Ethno Med.* 2011;5(1):11-15.
23. Elci O, Yene G, Uckul R. Working conditions and related neuropsychiatric problems among shoemakers in Turkey: Do child workers differ from others? *Indian J Occup Environ Med.* 2007;11(1):9-14.
24. Sánchez M. Efectos neuroconductuales en trabajadores expuestos a solventes orgánicos en la industria petrolera. Tesis para optar el título de Magister en Salud Ocupacional 2005. Universidad del Zulia. Documento disponible en línea. Consultado noviembre 2012. tesis.luz.edu.ve/tde_busca/processaArquivo.php?codArquivo=2315

Gac Méd Caracas 2014;122(3):225-229

Variantes de hemoglobina y hemoglobina fetal en pacientes con diabetes mellitus tipo 2: una nota de precaución

MSc Eloina Peñate^{1,2}, Dra. Rhaiza Olivero¹

RESUMEN

La hemoglobina glicosilada es un parámetro fundamental en la evaluación del control metabólico en el paciente diabético, sin embargo, diversos factores como la presencia de variantes de la hemoglobina o niveles elevados de hemoglobina fetal pueden dar resultados de hemoglobina glicosilada falsamente elevados o disminuidos dependiendo del método empleado. El objetivo de la presente investigación fue determinar la frecuencia de variantes de la hemoglobina y valores elevados de hemoglobina fetal en pacientes diabéticos. De los 313 individuos estudiados el

95,85 % (n=300) presentaron hemoglobina normal; 3,19 % (n=10) fueron heterocigotos para la hemoglobina S y el 0,96 % (n=3) fueron heterocigotos para la hemoglobina C. El valor promedio de hemoglobina fetal de todo el grupo fue de 0,89 % ($\pm 0,59$). Se enfatiza con este estudio que cuando los niveles de hemoglobina glicosilada no se correlacionan con los valores de glicemia o con la clínica del paciente debería investigarse entre otros factores, la presencia de variantes de la hemoglobina y los niveles de hemoglobina fetal.

Palabras clave: Hemoglobina glicosilada. Variantes de hemoglobina. Hemoglobina fetal. Diabetes mellitus tipo 2.

SUMMARY

Glycated hemoglobin is a widely used marker in the assessment of glycemic control in diabetes. Despite its usefulness glycated hemoglobin testing can be inaccurate

¹ Unidad Bioanalítica de Investigaciones Hematológicas (UBIH), Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

² Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

high or low in persons with abnormal hemoglobin or elevated amounts of fetal hemoglobin. The aim of this study was to analyze the prevalence of hemoglobin variants and the occurrence of elevated fetal hemoglobin among the diabetic subjects. Of 313 individuals analyzed 95.85 % (n=300) were normal hemoglobin; 3.19 % (n=10) were heterozygous for hemoglobin S y 0.96 % (n=3) were heterozygous for hemoglobin C. The mean fetal hemoglobin was 0.89 % (± 0.59 %). This study emphasizes that in cases when HbA1c levels do not correlate with glycemia and clinical symptoms should be investigated among other factors for hemoglobin variants and fetal hemoglobin levels.

Keywords: Glycated hemoglobin. Hemoglobin variants. Fetal hemoglobin. Type 2 diabetes mellitus.

INTRODUCCIÓN

La hemoglobina glicosilada (HbA1c) es el marcador bioquímico clave utilizado en la evaluación del control glicémico en el paciente diabético, siendo definida por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) como la hemoglobina resultante de una glicosilación irreversible, no enzimática, del grupo N-terminal de la cadena beta de la hemoglobina A (HbA) (1). Diversos estudios en grandes poblaciones de pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2, han demostrado que los niveles de HbA1c están directamente relacionados con las complicaciones diabéticas tales como retinopatía, neuropatía y nefropatía (2,3). La Asociación Americana de Diabetes (ADA) en el año 2010 recomendó la determinación de la HbA1c para el diagnóstico de la diabetes mellitus, estableciendo como punto de corte para el diagnóstico un valor $\geq 6,5$ % y el rango de referencia para definir un “riesgo aumentado de diabetes” fue establecido entre 5,7 %-6,4 % (4-6).

A pesar de la utilidad de la HbA1c, existen diferentes factores que afectan su determinación obteniéndose resultados inconsistentes con la situación clínica del paciente. Entre los factores que afectan la determinación de HbA1c están los niveles elevados de hemoglobina fetal (HbF) y la presencia de variantes de la hemoglobina o hemoglobinopatías (7-11). La HbF es la hemoglobina predominante durante la vida intrauterina representando el 70 % de la hemoglobina total para el momento del nacimiento, esta disminuye progresivamente y ya para el primer año de vida se alcanzan los valores del adulto (≤ 1 %) (8). Niveles elevados de HbF se pueden observar en ciertas condiciones patológicas (leucemias, talasemias, drepanocitosis) y en la persistencia

hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH) que es una condición benigna.

A nivel mundial se han reportado más de 1 000 variantes de la hemoglobina siendo las más frecuentes las hemoglobinopatías S, E, C y D, todas ellas tienen una mutación única a nivel de la cadena beta de la hemoglobina (12). Para el año 2000 se había estimado que 12 millones de individuos con diabetes mellitus alrededor del mundo tenían un desorden de la hemoglobina, se espera que para el 2030 este número aumente a 26 millones (8). En Venezuela las hemoglobinopatías más frecuentes son la S en forma heterocigota (rasgo drepanocítico) con una presencia de hasta un 19 % en poblaciones con un alto componente africano y la hemoglobinopatía C (13,14). Debido al número de pacientes con diabetes mellitus que podrían potencialmente ser portadores de una de estas variantes, las cuales interferirían en la determinación de la HbA1c dependiendo del método empleado, el objetivo de la presente investigación fue determinar la frecuencia de variantes de la hemoglobina y los valores de HbF en una muestra de pacientes con diabetes tipo 2 del Municipio San Diego del Estado Carabobo, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación es no experimental, descriptiva y de corte transversal. Se estudiaron 313 pacientes diagnosticados con diabetes tipo 2, de ambos sexos y en edad comprendida entre los 26 y los 88 años, que acudieron a la consulta del Programa Nacional Integrado Cardiovascular, Renal y Endocrino-Metabólico (CAREM) del Ambulatorio Urbano I San Diego, Municipio San Diego del Estado Carabobo, todos con la misma probabilidad de participar en el estudio. La investigación se condujo de conformidad con los lineamientos establecidos por las Normas de Investigación Clínica (15) y fue aprobado por el comité de ética del referido centro, los participantes fueron informados del propósito de este estudio y se les solicitó por escrito su consentimiento.

Previo a la toma de muestra se empleó una ficha para recolectar datos tales como: edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad, tipo de tratamiento, enfermedades asociadas o no, entre otros. La muestra se obtuvo por venoclisis de las venas del codo utilizando EDTA como anticoagulante. Con el paquete globular se realizó la determinación de la HbF y se prepararon los hemolizados para la caracterización de la hemoglobina los cuales se congelaron a -70 °C

hasta su procesamiento.

Las variantes de la hemoglobina se identificaron utilizando la técnica de electroforesis en acetato de celulosa a pH 8,6. Se utilizaron controles de HbFAS y HbFAC. Aquellas muestras en las que se observó la presencia de una banda en la zona de migración para la HbS se les practicó la prueba de solubilidad que es específica para esta hemoglobina (16) y aquellas que mostraron una banda en la zona de migración para la HbC se les realizó la prueba de electroforesis en agar citrato a pH 6,2 que se utiliza para diferenciar la HbC de otras hemoglobinas anormales como la E y la O (17,18). La HbF se cuantificó utilizando el método de Betke basado en la resistencia de esta hemoglobina a la desnaturalización por álcalis (16). La parte experimental de este trabajo fue realizada en la Unidad Bioanalítica de Investigaciones Hematológicas (UBIH) de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

En cuanto al análisis de los datos, la frecuencia de pacientes con hemoglobina normal y aquellos con alguna hemoglobinopatía fue expresada en porcentajes. Los valores de HbF se expresaron en términos de porcentaje como el promedio \pm la desviación estándar.

RESULTADOS

Del total de los 313 pacientes diabéticos tipo 2 evaluados, de ambos sexos y en edades comprendidas entre los 26 y los 88 años, el 95,85 % (n=300) tenían un fenotipo normal de hemoglobina (HbFA), el 3,19 % (n=10) fueron heterocigotos para la hemoglobina S (HbFAS) y el 0,96 % (n=3) heterocigotos para la hemoglobina C (HbFAC). Al dividir el grupo por sexo se observó que el 4,15 % de las pacientes femeninas (n=11) presentaron una alteración en la hemoglobina mientras que para los hombres fue en el 0,64 % (n=2). Del total de mujeres (n=195) el 4,1 % (n=8) presentó el rasgo drepanocítico (HbFAS) y el 1,54 % (n=3) presentó HbFAC, mientras que del total de los hombres (n=118) el 1,69 % (n=2) presentaron HbFAS.

En relación con los valores obtenidos para la HbF el valor promedio en el grupo de pacientes estudiados fue de 0,89 % ($\pm 0,59$). Al dividir la muestra total de acuerdo con el sexo se observó que el valor promedio de HbF en el sexo masculino fue de 0,84 % ($\pm 0,56$) y en el sexo femenino fue de 0,92 % ($\pm 0,61$) no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($P > 0,05$). Cuando se divide la muestra en relación con el fenotipo de hemoglobina

se observó que el grupo de pacientes que presentó HbFA obtuvo un promedio de HbF de 0,91 % ($\pm 0,59$), mientras que para el grupo de pacientes que presentó una variante de hemoglobina (S o C) se obtuvo un valor promedio de 0,94 % ($\pm 0,40$) no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($P > 0,05$).

Cuadro 1. Variantes de hemoglobina en pacientes diabéticos tipo 2, consulta CAREM del Ambulatorio Urbano I, San Diego, Estado Carabobo

Pacientes	HbFA		HbFAS		HbFAC		Total
	n	%	n	%	n	%	
Hombres	116	98,31	2	1,69	—	—	118
Mujeres	184	94,36	8	4,10	3	1,54	195
Total	300	95,85	10	3,19	3	0,96	313

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La diabetes mellitus es una enfermedad que además de tener una alta prevalencia tiene importantes consecuencias socioeconómicas, tanto por su elevada frecuencia como por el impacto de las complicaciones crónicas que se pueden presentar durante su evolución y que son las responsables en gran parte de la morbilidad y mortalidad que acompañan a la enfermedad. En Venezuela la diabetes ocupa la quinta causa de mortalidad en el país (19). La ADA recomienda la determinación de la HbA1c como el “estándar de oro” para evaluar el control glicémico y la eficacia del tratamiento en los pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2, siendo el tratamiento ideal para un paciente diabético aquel que le permita alcanzar un nivel de glicemia cercano al normal y un valor de HbA1c menor a 7 % y además desde el año 2010 recomendó incluirla entre las pruebas empleadas en el diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2 (4-6). Asimismo el Estudio de Control y Complicaciones de la Diabetes (DCCT) y el Estudio Prospectivo de Diabetes en el Reino Unido (UKPDS) demostraron que los niveles de la HbA1c están directamente relacionados con el riesgo de sufrir complicaciones diabéticas y establecieron la importancia de la determinación de la HbA1c como una herramienta esencial en el manejo de la diabetes (2,3), debido a ello es importante conocer los factores que pueden

interferir en sus resultados.

Para la mayoría de los pacientes diabéticos la determinación de la HbA1c constituye una excelente medida del control glicémico, sin embargo, la presencia de variantes de la hemoglobina y niveles elevados de HbF pueden interferir, entre otros factores, con alguno de los métodos utilizados en su cuantificación, obteniéndose resultados no confiables (20,21). En la población diabética estudiada se observó que la variante de hemoglobina más frecuentemente encontrada es la HbS siguiéndole en frecuencia la HbC, lo cual coincide con los resultados obtenidos en estudios de poblaciones no diabéticas realizados en otras regiones del Estado Carabobo y de Venezuela (13,22). Estas variantes usualmente, en su estado heterocigoto HbFAS (rasgo drepanocítico) o HbFAC pasan desapercibidas porque son clínicamente asintomáticas, pero las mismas pueden ser clínicamente importantes ya que algunas de ellas causan alteraciones bioquímicas que pueden interferir en los resultados de la HbA1c, tales interferencias pueden dar valores falsamente elevados o disminuidos dependiendo del método empleado y de la variante de hemoglobina presente.

En este estudio se encontró que el 4,15 % de los pacientes presentaba una variante de hemoglobina clínicamente silenciosa lo cual puede interferir en los niveles de la HbA1c por algunos métodos. Existen más de 30 métodos para la determinación de la HbA1c, entre los más frecuentemente utilizados están los métodos de intercambio iónico (IC- HPLC) basados en la carga molecular lo que permite separar la HbA1c de la HbA. La HbS y la HbC tienen mutaciones en la posición 6 de la cadena beta de la hemoglobina siendo sustituido el ácido glutámico por valina en la HbS y por lisina en la HbC, estas sustituciones afectan la carga iónica de la molécula de hemoglobina. La mayoría de los métodos empleados permiten la separación de la HbS y la HbC de la HbA1c basándose en su diferencia de cargas eléctricas, sin embargo, no con todos se obtiene dicha separación pudiendo causar estas variantes de hemoglobina un falso aumento en los niveles de la HbA1c lo cual puede llevar a un control glicémico más riguroso con la consecuente hipoglicemia (9). En presencia de estas variantes se recomienda emplear métodos que no se vean afectados por ellas. Existen varios estudios donde se reportan los efectos de estas hemoglobinas en los resultados de la HbA1c encontrándose un resumen de los mismos en la página oficial del *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) (12).

Otro de los factores que interfiere con la determinación de la HbA1c son los valores elevados de HbF; en el presente estudio los valores de HbF en la población estudiada fueron $\leq 1\%$. Concentraciones inferiores al 5 % no tienen efectos significativos en la mayoría de los métodos utilizados para evaluar la HbA1c. La interferencia es evidente cuando los valores de HbF son superiores al 5 %, causando una disminución artificial de la HbA1c del 1 %, lo cual representa un cambio de 25 %-35 mg% en el promedio de la glucosa sanguínea. Estos resultados pueden conducir a un tratamiento inadecuado del paciente aumentando significativamente el riesgo de presentar complicaciones (10,11,20). Los pacientes con persistencia hereditaria de HbF pueden tener hasta 30 % de HbF y debido a que son generalmente asintomáticos ni ellos ni el médico tratante pudieran estar enterados de esta condición. Ha sido demostrado que niveles elevados de HbF no solo interfieren con ciertos métodos basados en intercambio iónico sino también con métodos basados en afinidad por boronato e inmunoensayo (11).

Desde el punto de vista clínico una disminución falsa de los valores de la HbA1c del 1 % o más en pacientes con niveles de HbF de 20 % es de gran importancia. El DDCT demostró que una reducción del 1 % de la HbA1c se corresponde aproximadamente con una reducción del 30 % de los riesgos de las complicaciones diabéticas. Esta disminución artificial del 1 % o más en los valores de la HbA1c puede llevar a un tratamiento inadecuado de la hiperglicemia que resultaría a su vez en un aumento en el riesgo de las complicaciones diabéticas (2).

Se concluye que es necesario que los laboratorios clínicos y el personal médico conozcan los factores que afectan a los métodos empleados en la determinación de la HbA1c, para interpretar adecuadamente los resultados en caso de existir discrepancias entre los valores de la HbA1c y los niveles de glucosa en sangre o los niveles de la HbA1c y la clínica del paciente, y pensar entre otros factores en la posibilidad de la presencia de una variante de Hb y/o de valores elevados de HbF, a fin de emplear un método alternativo como por ejemplo la cromatografía por afinidad, cuyos resultados no se vean afectados por dichos factores de manera de poder asegurar valores confiables en este tipo de pacientes diabéticos.

Agradecimientos

Las autoras agradecen la valiosa colaboración del personal que labora en el Programa Nacional Integrado

Cardiovascular, Renal y Endocrino- Metabólico (CAREM) del Ambulatorio Urbano I San Diego, Municipio San Diego del Estado Carabobo.

REFERENCIAS

1. Weykamp C, Garry W, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson J, et al. The IFCC reference measurement system for Hb A1c: A 6-year progress report. *Clin Chem.* 2008;54(2):240-248.
2. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329:977-986.
3. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet.* 1998;352:837-851.
4. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2010. *Diabetes Care.* 2010;33(Suppl 1):11-61.
5. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2012;35(Suppl 1):64-71.
6. The International Expert Committee. International Expert Committee Report on the Role of the A1c Assay in the Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-1334.
7. Gunton J, McElduff A. Hemoglobinopathies and Hb A1c measurement. *Diabetes Care.* 2000;23(8):1197-1198.
8. Little R, Roberts W. A Review of variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement. *J Diabetes Sci Technol.* 2009;3(3):446-451.
9. Mohd N, Thevarajah M, Yee Ch. Hemoglobin variants detected by hemoglobin A1c (Hb A1c) analysis and the effects on Hb A1c measurements. *Int J Diabetes Dev Ctries.* 2010;30(2):86-90.
10. Rohlfing C, Connolly S, England J, Hanson S, Moellering C, Bachelder D, et al. The effect of elevated fetal hemoglobin on hemoglobin A1c results: Five common hemoglobin A1c methods compared with the IFCC reference method. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(5):811-814.
11. Bry L, Chen P, Sacks D. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem.* 2001;47(2):153-163.
12. HbVar [Base de datos en línea]. A database of human hemoglobin variants and thalassemias [fecha de acceso 26 de marzo de 2012]. Disponible en: <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>
13. Arends A, Chacín M, Bravo-Urquiola M, Montilla S, Guevara JM, Velásquez D, et al. Hemoglobinopatías en Venezuela. *INCI.* 2007;32(8):516-521.
14. Salazar-Lugo R. La hemoglobina S en la población venezolana. *Invest Clin.* 2004;45(2):175-183.
15. De Abajo F. La declaración de Helsinki VI: una revisión necesaria, pero ¿suficiente?. *Rev Esp Salud Public.* 2001;75(5):407-420.
16. Beutner E, Lichtman M, Collier B, Kipps T. Williams Hematology. 5ª edición. United States of America: McGraw Hill, Inc; 1995.
17. Clarke G, Higgins T. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. *Clin Chem.* 2000;46(8):1284-1290.
18. Wajcman H, Préhu C, Bardakjian-Michau J, Promé D, Riou J, Godart Ch, et al. Abnormal hemoglobins: Laboratory methods. *Hemoglobin.* 2001;25(2):168-181.
19. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de mortalidad 2010. [fecha de acceso: 14 de octubre de 2013]. Disponible en: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915
20. National Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP. HbA1c assay interferences [fecha de acceso: 17 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.ngsp.org/index.asp>
21. Sacks D. Hemoglobin variants and hemoglobin A1c analysis: Problem solved? *Clin Chem.* 2003;49(8):1245-1247.
22. García O, Chacín M, Bravo M, Gómez G, Montilla S, Merzón R, et al. Diagnóstico de hemoglobinopatías a partir de sangre de talón de recién nacidos en diferentes centros hospitalarios de Venezuela. *An Pediatr.* 2009;71(4):314-318.

Correspondencia: MSc Eloina Peñate

E-mail: epenate07@yahoo.es

Tlf 0414-4256188