

31

29/04

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIOS DE LABORATORIO EN PACIENTES
CON ANEMIA DE CELULAS FALCIFORMES.**

Experiencia Acumulada en diez años.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

CLEMENTE CELEDONIO MEZA CORIA

Q U I M I C O

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

<u>CAPITULO</u>	<u>PAGINA</u>
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
III. GENERALIDADES	3
Estructura de la Hemoglobina	
Estructura del Hem	
Estructura de la Globina	
Significado del tetramero	
Características específicas de la molécula de Hemoglobina	
Características de la Hemoglobina S	
IV. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y FISIOPATOLOGI CAS	23
Significado de la Hemoglobina Fetal	
V. CARACTERISTICAS CLINICAS	26
Rasgo drepanocítico AS (heterocigoto)	
Anemia drepanocítica SS	
Diagnóstico diferencial	
VI. FISIOPATOLOGIA	35
Hemólisis e intervalo de vida del eritrocito	
Hemodinamia y transporte de oxígeno	
VII. DISTRIBUCION GEOGRAFICA	42
Anemia drepanocítica leve	
Anemia drepanocítica benigna	
Distribución en la República Mexicana	
Estudios realizados en grupos indígenas no mezclados	
Costa Occidental	

Costa Oriental

Consideraciones finales

VIII.	MATERIAL Y METODOS	49
	Métodos hematológicos	
	Inducción de drepanocitos con metabisulfito de sodio	
	Determinación de Hemoglobina Fetal	
	Electroforesis	
	Método electroforético de Smithies	
IX.	RESULTADOS	65
	Distribución por sexo	
	Edad	
	Cuadro clínico	
	Edad de inicio aparente de las manifestaciones clínicas	
	Signos y síntomas más frecuentes	
	Datos de Laboratorio	
X.	CONCLUSIONES	71
XI.	APENDICE	72

CAPITULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCION:

Los desórdenes genéticos de la síntesis de hemoglobina (Hemoglobinopatías) pueden agruparse de acuerdo a la naturaleza de la alteración de la molécula de la globina.

En el primer grupo se encuentran los casos en que un aminoácido de una de las cadenas polipeptídicas substituye al aminoácido presente en forma normal. El efecto de esta substitución depende de dos factores: tipo de aminoácido y posición del mismo en la molécula. En muchos casos la substitución no produce efectos clínicos, pero en algunos es responsable de severas manifestaciones clínicas y cambios fisicoquímicos que afectan tanto a los glóbulos rojos como a la molécula de la hemoglobina. Estos cambios son: inestabilidad de la hemoglobina, formación de metahemoglobina, incremento de afinidad por el oxígeno, eritrocitosis, cambios en la solubilidad de la hemoglobina y cambios en la membrana de los glóbulos rojos.

Existe un grupo heterogeneo de desórdenes hematológicos caracterizados por la ausencia o disminución de producción de una o más cadenas polipeptídicas. En estos desórdenes, llamados colectivamente Talasemias, no existe defecto estructural de las cadenas de globina, pero si una disminución en su rango de producción. Las Talasemias son de gran importancia porque afectan a grandes nucleos de población o pueden combinarse con defectos estructurales de la cadena de globina.

El tercer grupo incluye la alteración denominada Persistencia de hemoglobina fetal, en la cual se continúa la síntesis de hemoglobina fetal hasta la vida adulta.

El último grupo está constituido por los "accidentes genéticos", tales como la pérdida de uno o más aminoácidos de una cadena de globina, la inserción de material genético adicional en una cadena, o la prolongación de una de las cadenas de globina a un área crítica.

CAPITULO II

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

Habiéndose diagnosticado clínicamente la enfermedad de células falciformes, se tomaron como objetivos los siguientes:

1. La aplicación de métodos de laboratorio habituales que confirmen con seguridad el diagnóstico de anemia hemolítica - de células falciformes, como son:
 - La fórmula roja de la biometría hemática
 - La prueba del metabisulfito de sodio
 - La determinación de hemoglobina fetal, y
 - La electroforesis de hemoglobina
2. Debido a que se trata de una enfermedad hereditaria, utilizar estas pruebas servirá tanto para diagnosticar a los enfermos como para reconocer a los portadores de la anomalía genética.
3. Con los resultados obtenidos por medio de estas pruebas, - tratar de reducir la frecuencia de la enfermedad, orientando a los familiares portadores para obtener consejo genético.
4. Analizar los resultados obtenidos en todos los enfermos de Anemia hemolítica de células falciformes obtenidos durante diez años, de 1974 a 1983, en el Instituto Nacional de Pediatría (originalmente IMAN) y correlacionarlos con diversos aspectos clínicos característicos de la enfermedad, y con su procedencia geográfica.

CAPITULO III

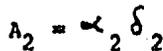
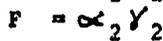
GENERALIDADES

GENERALIDADES:

Estructura de la Hemoglobina

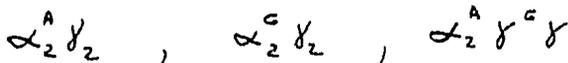
Las hemoglobinas humanas, a semejanza de las de los otros mamíferos, están formadas por cuatro cadenas de polipéptidos enlazados cada uno de ellos con un hem. Estas cadenas de polipéptidos se entrelazan para formar un helipsoide de dimensiones 64 x 55 x 50 Å y un peso molecular de aproximadamente 68, 000.

Las cadenas polipeptídicas de la hemoglobina humana han sido denominadas alfa α , beta β , gamma γ , delta δ , épsilon ξ y zeta ζ . Las hemoglobinas fisiológicas halladas después del nacimiento son:



Las hemoglobinas A, F y A₂ contienen dos cadenas alfa iguales en una mitad, y difieren en la otra mitad. La hemoglobina A representa alrededor de un 97 % de la hemoglobina total del adulto; la hemoglobina A₂ representa alrededor de un 3 %. En tercer lugar se halla la hemoglobina F, que constituye más de la mitad de la hemoglobina del recién nacido, pero que desaparece casi totalmente durante la infancia. Una décima parte de ella es químicamente distinta, por el hecho de que una de las cadenas gamma puede tener ácido acético ligado al residuo glicina- N - terminal. Se trata de una variante más metabólica que genética de la cadena gamma normal y puede ser de importancia fisiológica. El extremo N-terminal libre de la cadena alfa se necesita para la combinación con β y δ difosfoglicerato si se ha formado desoxihemoglobina. La incapacidad para esta combinación desviará el equilibrio oxi desoxihemoglobina hacia la izquierda, facilitando quizá posteriormente el

transporte de oxígeno a través de la barrera placentaria. Además de la cadena gamma acetilada se ha demostrado que también esta cadena puede poseer un residuo alanina o bien un residuo glicina en la posición 136, lo cual sugiere que deben existir por lo menos dos genes estructurales para la cadena gamma de la hemoglobina F humana. Así pues, existen por lo menos tres tetrámeros de ésta:



En el momento del parto la proporción de las dos distintas cadenas polipeptídicas es $3^C \gamma : 1^A \gamma$ y después de la infancia experimenta una alteración $1^C \gamma : 3^A \gamma$ de esto se deduce claramente que la desconexión selectiva de la producción de cadena gamma en la primera infancia debe ser muy compleja para alterar de esta forma dicha proporción. La hemoglobina embrionaria representa la estructura $\alpha_2 \epsilon_2$ (Gower 2); algunos de la cadena épsilon forman tetrámeros independientes (Gower 1), incluso en sangre embrionaria normal (Fig. 1).

La hemoglobina Portland posee dos cadenas épsilon y presenta la estructura $\xi \gamma_2$. Se halla en mayor cantidad en ciertos niños cuando la síntesis de cadena alfa está retardada; parece ser que en estas circunstancias la cadena épsilon sustituye a la cadena alfa. Es posible que alguna hemoglobina que ha sido denominada Gower 1 sea en realidad épsilon 2, gamma 2.

Estructura del Hem

En principio se pensaba que la hemoglobina llevaba cuatro grupos Hem a modo de rótulos prendidos en el exterior de una masa. Este concepto se vio alentado por la facilidad con que el Hem podía ser separado de la globina mediante sencillos procedimientos químicos.

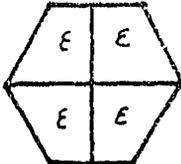
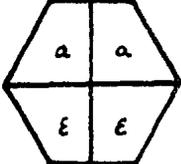
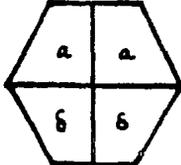
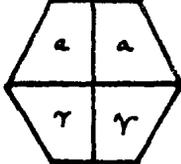
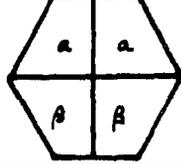
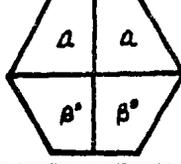
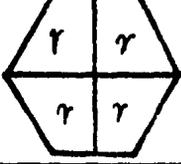
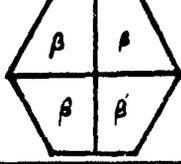
HGBN GOWER-1		(ϵ_4)
HGBN GOWER-2		(a, ϵ)
HGBN A ₂		(a, β_2)
HGBNF		(a, γ_2)
HGBN A		(a, β_1)
HGBN S		(a, β_2°)
HGBN BART'S (Bartolomeo)		(γ_4)
HGBN H		(A)

Fig. 7

FIGURA 1

Combinaciones de la molécula de hemoglobina encontradas en la vida embrionaria, fetal y neonatal. Cada tetramero está formado por asociaciones divalentes. Cada una de las cuatro cadenas en cada molécula está asociada con un grupo hem. La denominación de los tetrameros está en la columna de la izquierda y la denominación convencional a la derecha.

En el año de 1951 St. George y Pauling demostraron que la capacidad de combinación del Hem con las alquilosociamidas depende del tamaño del grupo alquilo. Se había sugerido que los Hemes estaban sepultados en la mitad de la globina y que existía un impedimento estérico para que las grandes moléculas alcanzaran los grupos Hem. La naturaleza de esta barrera se aclaró con el trabajo de Kendren y Perutz acerca de la estructura de la mioglobina y hemoglobina (2). El Hem se encuentra firmemente insertado en el interior de una hendidura de la globina, de suerte que las cadenas laterales de los aminoácidos son capaces de sostener el anillo porfirina mediante fuerzas hidrofóbicas. El agua se desaloja del depósito, lo cual confirma las experiencias anteriores de Wong en 1958, quien demostró que el Hem se puede oxigenar cuando se encuentra cercado por un material hidrófobo.

En la actualidad se sabe que la adición de una molécula de oxígeno al átomo de hierro de la desoxihemoglobina, origina una modificación del giro del hierro, produciéndose una concentración del átomo de hierro. Este átomo oxigenado es así capaz de deslizarse al interior del anillo porfirina, mientras que los contactos Hem-globina son enlaces hidrofóbicos leves entre moléculas vecinas; el propio átomo de hierro se encuentra químicamente vinculado a una histidina, la histidina proximal o Hem-vinculada. En el lado opuesto del depósito se encuentra otra histidina, la histidina distal, pero aquí existe espacio suficiente para que una molécula de oxígeno penetre entre ella y el átomo de hierro. La hendidura es crítica, así por ejemplo, el dióxido de carbono no puede penetrar pero sí puede hacerlo el monóxido de carbono. El movimiento del átomo de hierro en la oxigenación que impulsa a la histidina Hem-vinculada, constituye el principio de la modificación de la configuración molecular de la hemoglobina a partir del estado desoxi al estado oxi.

Estructura de la globina

Para que la globina funcione con eficiencia deben satisfacerse tres condiciones (Fig. 2):

1. Libre acceso de agua a la superficie de la globina para mantenerla en solución. Así pues, el exterior de la molécula es rico en cadenas laterales hidrofílicas polares, algunas de ellas llevando una carga. El interior del hematíe está formado por una tercera parte de la hemoglobina disuelta. Debe subrayarse que en la elevada concentración de hemoglobina normal, esta es totalmente soluble en los estados oxi y desoxi.
2. El interior de la molécula debe seguir siendo hidrofóbico, pues la entrada de agua es la vía común final de desnaturación de la globina en las hemoglobinas inestables. Un interior hidrofóbico se mantiene por su contenido de cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos que repelen el agua. Los escasos residuos polares interiores disminuyen sus propiedades hidrofóbicas al formar enlaces hidrógeno con átomos vecinos (3).
3. La forma de la globina debe mantenerse razonablemente rígida, lo que se consigue gracias a una proporción extraordinariamente alta de aminoácidos en disposición helicoidal, que es una forma de manifestarse de las globinas que jamás han sido separadas por ninguna otra proteína de las estudiadas hasta el momento.

Significado del tetrámero

Diversos compuestos químicos pueden combinarse satisfactoriamente con oxígeno molecular; el problema que debía resolverse durante la evolución consistía en el desarrollo de una sustancia química capaz de liberar oxígeno de las tensiones fi

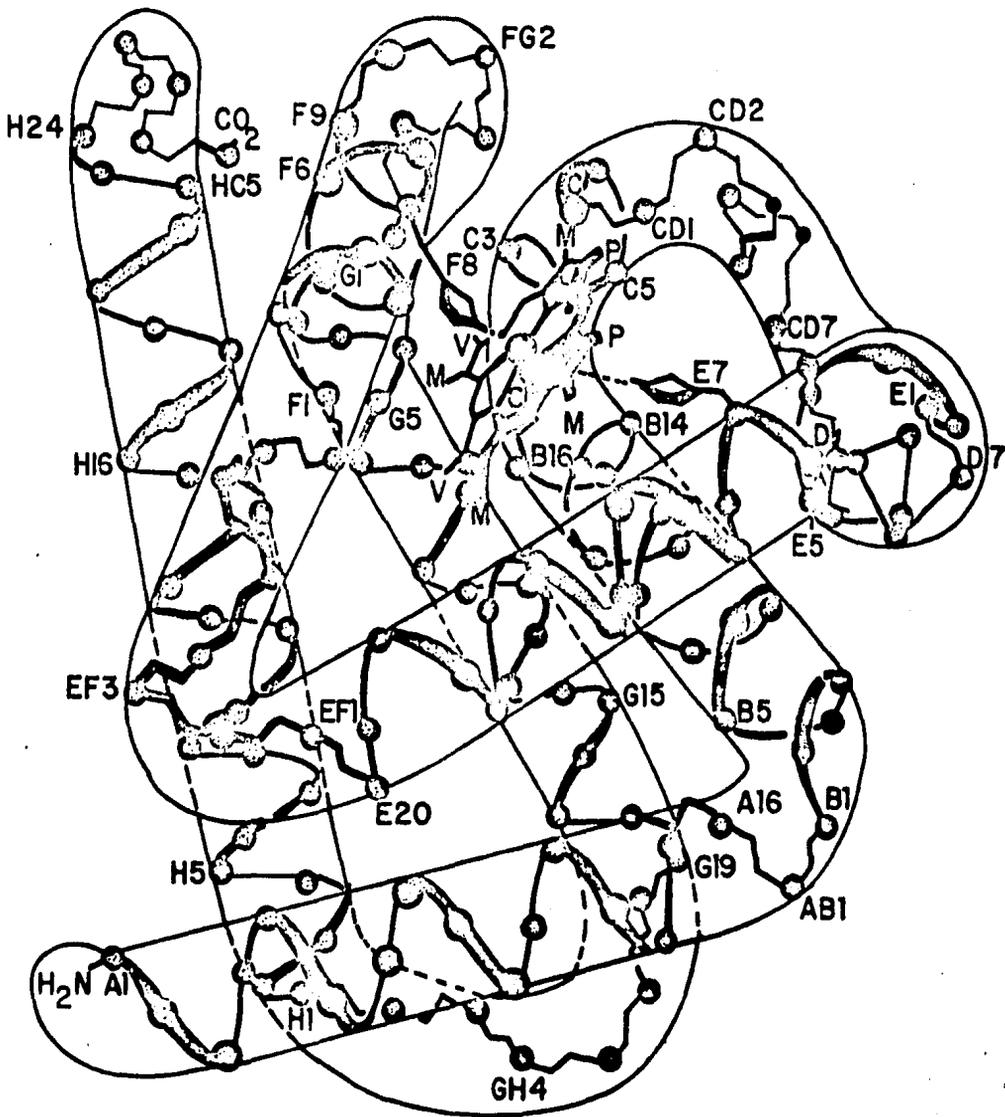


Fig. 2

FIGURA 2

Figura en la que se demuestra que aproximadamente un 80 % de los aminoácidos en la mioglobina presentan una estructura helicoidal. Las partes helicoidales están marcadas con una letra. Las no helicoidales están marcadas con dos letras, una precedente y una subsiguiente a la porción helicoidal (ej. A1 A16=helicoidal; EF1 EF8=no helicoidal).

siológicas requeridas. La figura 3 muestra la curva hiperbólica de disociación de oxígeno del monómero mioglobina comparada con la ventajosa curva sigmoide de disociación producida por el tetrámero hemoglobina. Esta curva sigmoide tiene su origen en el hecho de que la oxihemoglobina y desoxihemoglobina poseen una estructura tetramérica diferente, por lo que estructura y función están íntimamente relacionadas.

La desoxihemoglobina, que es la forma T (tensa) del tetrámero, posee una carga elástica y las cuatro cadenas individuales de globina se mantienen aparte por puentes salinos entre los dos dímeros que forman conjuntamente el tetrámero (4). Por consiguiente, existe el suficiente espacio en la configuración desoxi para permitir al 2,3 difosfoglicerato actuar a modo de extensor, y se encuentra en la hendidura entre las dos cadenas beta que se separan.

El impulso sobre la histidina Hem-vinculada cuando el hierro Hem se oxigena, inicia un movimiento que rompe los puentes salinos y convierte la desoxihemoglobina tensa y con carga elástica en oxihemoglobina relajada (R), en la que los dos dímeros alfa-beta se colapsan uno en el interior del otro. Un fenómeno resultante es el de la salida del 2,3 difosfoglicerato del espacio comprendido entre las dos cadenas beta por ser un espacio inadecuado (5).

La llegada sucesiva de moléculas de oxígeno determina la fractura acumulativa de los puentes salinos limitantes, lo cual altera la actividad del tetrámero de hemoglobina para el bióxido de carbono y para los iones hidrógeno. El transporte de oxígeno resulta tan eficiente que a menudo pasa inadvertida la importancia de la hemoglobina como una protección contra la acidez que acompaña el metabolismo activo.

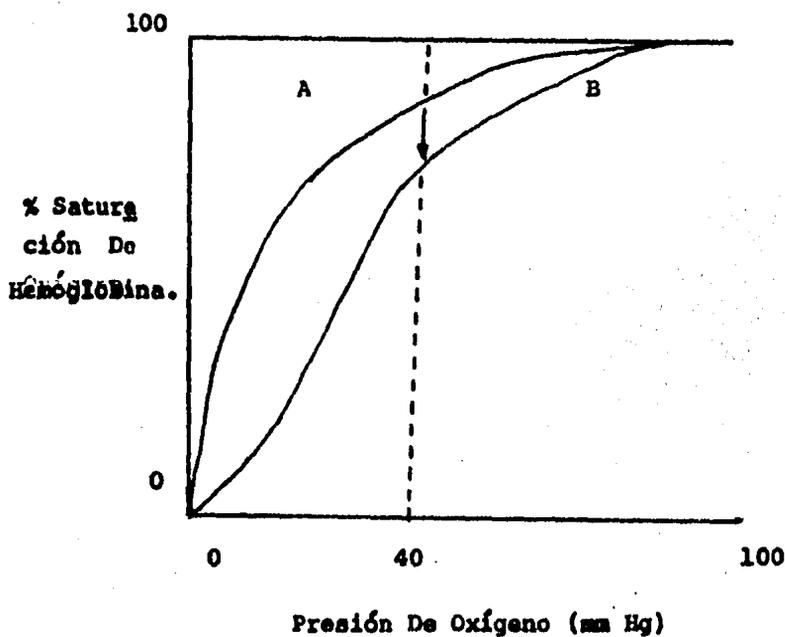


Fig. 3

Presión de oxígeno (mm Hg)

Curvas de disociación de oxígeno de la hemoglobina y mioglobina mostrando curvas de disociación hiperbólicas (A) y sigmoideas (B). Si el pigmento opera entre una presión de oxígeno de 100 y 40 mm Hg. la longitud de la flecha representa la eficacia aumentada de una curva sigmoide.

La llegada de una molécula de oxígeno al interior de un tetrámero hemoglobina permite una aceptación más fácil de las siguientes moléculas de oxígeno. Si se oxigenan dos grupos Hem, la tercera molécula de oxígeno se acomoda incluso más fácilmente, y esto sucede todavía de manera más acentuada con la cuarta molécula, es decir, la oxigenación progresiva tiene por resultado una serie de moléculas de hemoglobina distintas en cuanto a sus propiedades típicas. La manifestación externa de esta unión Hem-Hem es más clara y más importante cuando se comporta como proteína liberadora de oxígeno y absorbadora de bióxido de carbono.

La hemoglobina es un compuesto tetramérico formado por dos dímeros alfa y beta y son numerosos los contactos entre las subunidades alfa y beta que forman un dímero: los contactos diméricos $\alpha_1 \beta_1$. Estos son los contactos viscosos que permiten movimientos en la interfase. En contraste, los contactos entre los dos dímeros son menos numerosos; estos contactos tetraméricos permiten un cambio en la configuración de la molécula de la hemoglobina bajo oxigenación y desoxigenación. No se producen contactos entre cadenas idénticas, es decir, no hay contactos $\alpha_1 \alpha_2$ o $\beta_1 \beta_2$, y los contactos tetraméricos deben ser marcados $\alpha_1 \beta_2$ o $\alpha_2 \beta_1$.

La secuencia de aminoácidos a lo largo de los contactos de los tetrámeros $\alpha_1 \beta_2$, es de gran importancia, ya que cualquier substitución de algún aminoácido diferente puede repercutir en su afinidad por el oxígeno.

La clave para la estructura y función tetramérica debe ser la cadena alfa. Una disminución en la producción de cadenas alfa afecta a las hemoglobinas A_2 y F, así como también a la hemoglobina A. Cuando la producción de cadenas alfa es inadecuada, los sobrantes de cadenas alfa y gamma forman los homotetrámeros β_4 (hemoglobina H) y δ_4 (hemoglobina Bart).

Para formar un tetramero funcional es necesario combinar cadenas alfa y beta o cadenas alfa y gamma; de aquí que las hemoglobinas H y Bart parecen tener importancia desde el punto de vista fisiológico pues son sumamente avidas de oxígeno y además no son capaces de convertirse en transportadores eficientes de iones hidrógeno y de bióxido de carbono.

Una diferencia importante entre la cadena alfa y las otras cadenas del polipéptido de globina, radica en la ausencia de la hélice D en la cadena alfa. Quizá esta sea la razón por la cual la cadena alfa es capaz de combinarse en forma tan efectiva con tantas otras cadenas distintas. La estructura de la cadena alfa parece ser mucho más limitada y en verdad las cadenas alfa parecen tolerar las substituciones de aminoácidos mucho menos que las cadenas beta.

Caracteres específicos de la molécula de hemoglobina.

La mejor forma de resumir la función especializada de la molécula de hemoglobina es compararla con otras proteínas - Hem. En primer lugar, la hemoglobina muestra una construcción simple que tiene por objeto proteger al hierro del agua, pero permitiendo su pronta oxigenación y desoxigenación. Esta característica es compartida por la mioglobina y la hemoglobina y se manifiesta en la similitud de los depósitos Hem de todas las cadenas globina. En particular, la fenilalanina es en posición CDI, como lo muestra la figura 2, y la histidina - Hem-vinculada son comunes a todas las globinas conocidas. Las únicas excepciones las constituyen algunas hemoglobinas humanas anormales con función y estructura notablemente alteradas. Por el contrario, el citocromo que funciona más bien por oxidación-reducción que por oxigenación-desoxigenación, no parece necesitar esta cuidadosa protección frente al átomo de hierro. El contenido helicoidal del citocromo es menos de la mitad de la hemoglobina,

lo que sugiere que la rigidez es menos importante. En razón de su función diferente, la estructura monomérica de la mio--globina parece haber sido cuidadosamente preservada gracias a a la formación de residuos con carga invariable, tales como --ácido glutámico y glicina en posiciones que son contactos $\alpha_1 \beta_1$ en la hemoglobina y en la mioglobina parece poseer un "cinturón de castidad" como protección; sus residuos carga dos advertirían a las otras moléculas de mioglobina que la naturaleza las hecho aisladas, sin permiso para unirse entre si.

Las hemoglobinas primitivas de cadena única, tales - como las encontradas en los peces lamprea y bruja, son capaces de formar complejos laxos, y están en condiciones de alterar - correspondientemente su potencial de amortiguador. Pero para apreciar plenamente la hemoglobina, es preciso compararla con el monómero mioglobina (6).

La hemoglobina tiene la única propiedad de una eleva da afinidad por el oxígeno a presión elevada de éste, tal como ocurre también con la mioglobina, pero en la hemoglobina esta propiedad se acompaña de una facilidad para liberar oxígeno de una manera controlada, en el sentido de liberar una mayor cantidad cuando desciende la presión de oxígeno y se hacen mayores las necesidades de los tejidos. Al propio tiempo, la hemoglo bina absorbe los metabolitos potencialmente nocivos producidos por la utilización de su oxígeno, tal como Bacrof: "sin hemo globina no se hubiera conseguido ninguna actividad que la lan--gosta posea".

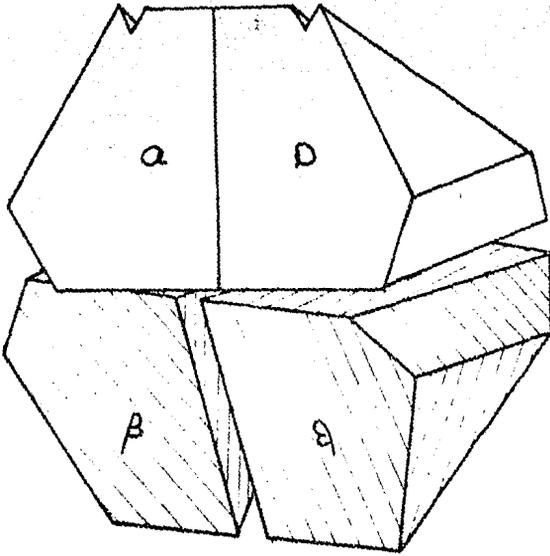
Características de la hemoglobina S

Pauling y H. Otano (7) han demostrado que la hemoglo bina aislada de eritrocitos de pacientes que padecen anemia de células falciformes es diferente de la hemoglobina normal o A (de adulto). En la anemia de células falciformes los eritrocí tos tienden a adoptar forma de "hoz" a presiones bajas de oxígeno

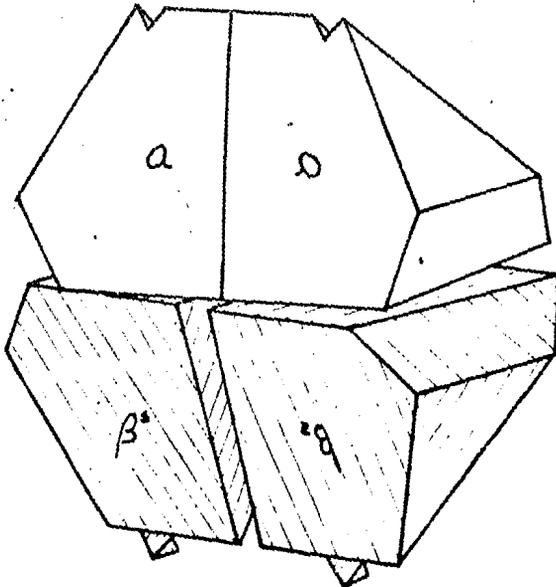
no; es decir, adquieren forma de cuarto de luna, en lugar de la conformación plana, en disco bicóncavo de los eritrocitos normales. La movilidad electroforética de la hemoglobina de células falciformes resulta ser ligeramente diferente de la hemoglobina A.

Posteriormente Ingram (8) descubrió que la hemoglobina de células falciformes solo difiere de la hemoglobina normal en un aminoácido; encontró que las cadenas alfa de las dos formas son idénticas, pero que el resto de ácido glutámico en posición 6 de la cadena beta de la hemoglobina normal está substituida por un resto de valina en la hemoglobina falciforme (Fig. 6). Puesto que el ácido glutámico posee un grupo R ácido y la valina tiene un grupo R sin carga. La hemoglobina de las células falciformes posee una carga eléctrica algo diferente a pH neutro. La anemia falciforme resulta ser, por tanto, una "enfermedad molecular" de origen genético. La substitución del aminoácido es resultado de la mutación de la molécula de DNA que codifica la síntesis de la cadena beta de la hemoglobina.

En conjunto, se han encontrado en la especie humana cerca de 150 clases de hemoglobinas mutantes. Existe una hemoglobina anormal en uno de cada 10, 000 individuos, y se pone de manifiesto habitualmente por método electroforético.



HEMOGLOBINA A



HEMOGLOBINA S

Fig.6

FIGURA 6

Representación en forma de tetraedros truncados de las hemoglobinas A y S derivadas del modelo a escala del Dr. Makio Murayama. Los picos en la base de las cadenas beta representan una valina substituida por -- ácido glutámico en posición 6 de la terminación N-terminal.

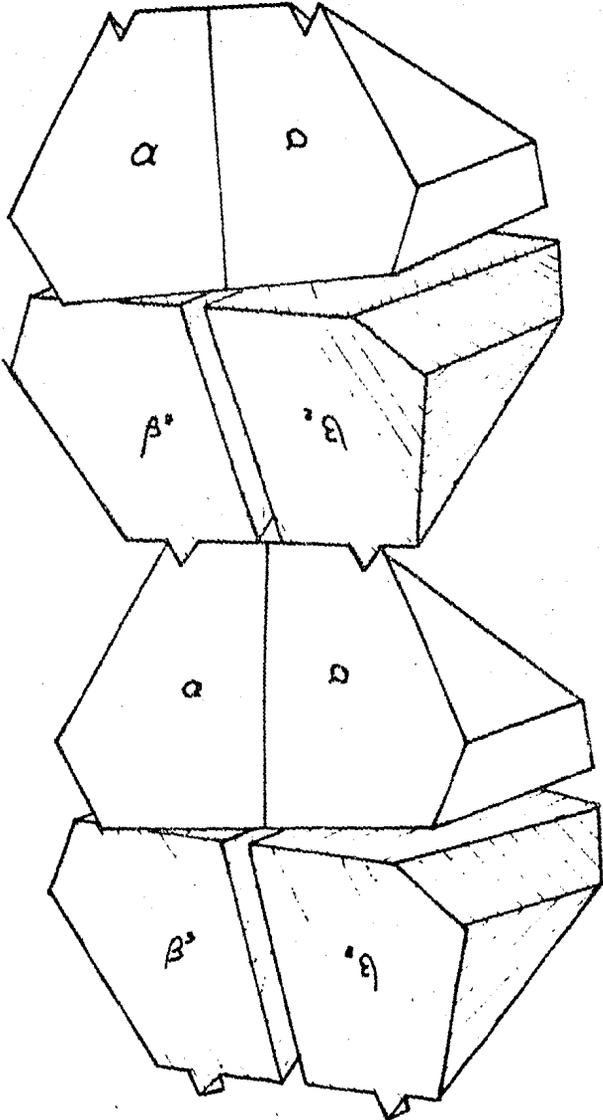
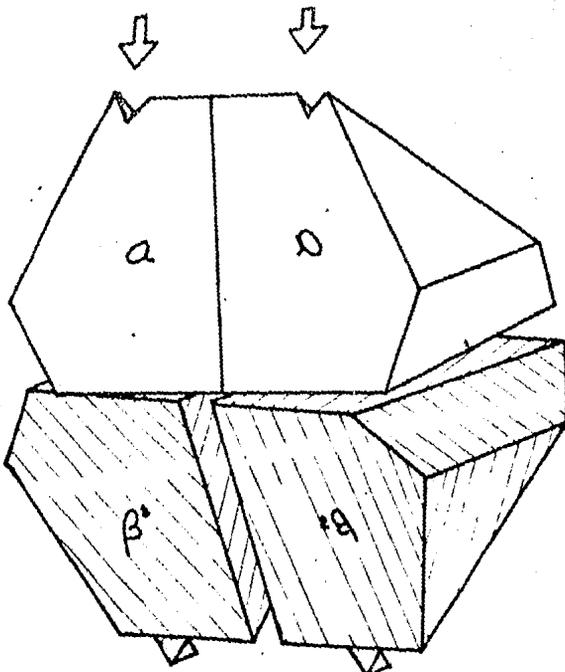
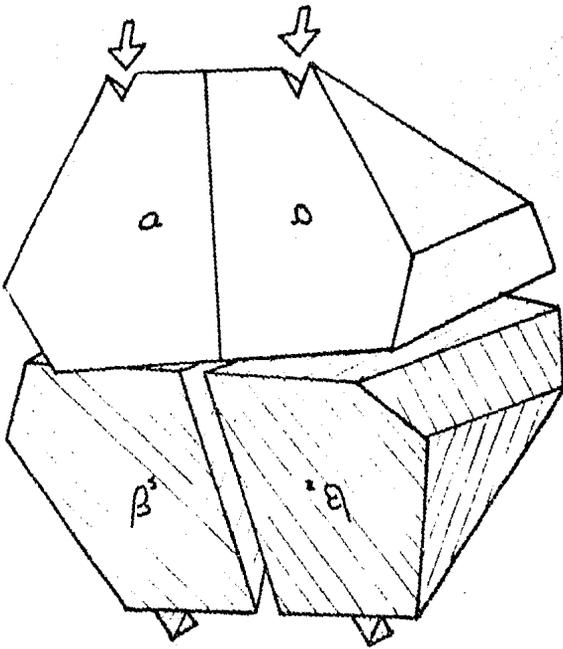


Fig.7

FIGURA 7

Tetrámeros interactuando de moléculas de hemoglobina S desoxigenada. Se hace notar que las cadenas beta se muestran desplazadas laterales y que los picos representan valina en las cadenas beta que -- llenan las muescas en las cadenas alfa de una segunda molécula.



Co-factor

Fal iforme

Fig.8

FIGURA 8

Unión tetramero-tetramero de hemoglobina S
mediada por un cofactor dializable capaz
de inducir interacciones hidrofóbicas en-
tre las moléculas desoxigenadas.

CAPITULO IV

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y FISIOPATOLOGICAS

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y FISIOPATOLOGICAS

En los trastornos falciformes se incluyen todos los cuadros hereditarios en los que los eritrocitos adquieren la forma de hoz cuando se ponen en ausencia de oxígeno y puede demostrarse hemoglobina S mediante electroforesis y otras técnicas bioquímicas. En la actualidad se empiezan a conocer los factores genéticos responsables de esta expresión variable de los trastornos falciformes y en especial de la anemia falciforme, pero todavía no se han comprendido con claridad los factores fisiológicos y ambientales que condicionan la variación de la expresión química de un genotipo.

Perutz y Mitchison (9) descubrieron que la hemoglobina S desoxigenada era insoluble, y llegaron a la conclusión de que la formación en hoz de los eritrocitos era solamente el resultado de la cristalización de las moléculas desoxigenadas. En aquella época estos autores especularon con la posibilidad de que la modificación de forma sería forzada en la célula, en parte por la formación de los cristales y en parte por la pérdida de agua que cabe esperar que acompañe a la cristalización. Mientras que los eritrocitos contienen un 34 % de hemoglobina los cristales contienen entre un 50 y 60 %. El exceso de agua no incluido en los cristales se encuentra casi libre de proteínas y tendería a difundirse fuera de la célula debido a una pérdida de presión osmótica, dando lugar al colapso de la membrana celular.

El estudio de glóbulos rojos en forma de hoz efectuado en el microscopio electrónico tanto in vitro (10) como in vivo (11) reveló la presencia de fibras paralelas constituidas ostensiblemente por moléculas de hemoglobina. Esta agregación molecular en las fibras tubulares largas, que tienen un diámetro de alrededor de 170 Å, se produce también en soluciones desoxigenadas de hemoglobina S en elevadas concentraciones (12):

con diagramas de difracción de rayos X y fibras orientadas (13) han demostrado una periodicidad de 64 Å (cerca de la longitud de una molécula de hemoglobina a lo largo del eje de la fibra). Estudios con el microscopio electrónico sobre delgadas secciones de células falciformes y de desoxihemoglobina S (14) han demostrado la disposición general, sugiriendo una estructura helicoidal en forma de cuerda de seis filamentos enrollados alrededor de un núcleo hueco, con una elevación de alrededor de 3,000 Å (aproximadamente 45 anillos de moléculas de hemoglobina). Cada uno de estos seis filamentos está compuesto de moléculas de hemoglobina a modo de cuentas de rosario sobre un cordón, y los filamentos se encuentran enrollados; la fibra es, en efecto, como una pila de monedas, cada una de las cuales está constituida por seis moléculas en un hexágono planar (Fig. 7). Con la oxigenación o en concentraciones y temperaturas bajas, esos procesos son fácilmente invertidos, lo que indica que se encuentran sometidos al control de ligeras fuerzas físicoquímicas determinantes de apilamiento, enlaces hidrógeno, enlaces hidrofóbicos y fuerzas de Van der Waals, operando todas ellas sobre distancias muy pequeñas. Finalmente, la presentación de unas fibras y filamentos cortos de forma similar a los de la S desoxihemoglobina en eritrocitos desoxigenados normales (15), sugiere que el cambio de ácido glutámico a valina en beta 8 sirve únicamente para mejorar y estabilizar una tendencia normal en el ordenamiento o solubilidad reducida de la hemoglobina desoxigenada (16).

Significado de la hemoglobina fetal

En la anemia falciforme y algunos otros síndromes hemolíticos congénitos, la síntesis de hemoglobina fetal persiste hasta la edad adulta. Los factores fisiológicos o genéticos que dan por resultado proporciones sumamente diferentes de las dos hemoglobinas entre una célula y otra, a pesar de la distribución casi igual de hemoglobinas totales, no son comprendidas todavía, pero en la anemia falciforme el resultado se traduce en la presencia de algunas células con elevada pro-

porción de hemoglobina F que se encuentran protegidas contra la drepanocitosis, y otras en una proporción escasa o nula que se encuentran expuestas a un mayor riesgo.

Los eritrocitos de sujetos doblemente heterocigotos para hemoglobina S y los genes para la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal contienen aproximadamente un 80 % de hemoglobina B y un 20 % de hemoglobina F (encontrándose la hemoglobina F uniformemente distribuida). En estas personas la supervivencia de los eritrocitos es probablemente normal (17) y los síntomas de enfermedad son raros. De una manera similar, los niños homocigotos para hemoglobina S comienzan a presentar signos clínicos evidentes de la enfermedad cuando la proporción de la hemoglobina fetal (desigualmente distribuida en los eritrocitos) ha descendido por abajo del 35 % y el resto es hemoglobina S. Resulta interesante que el síntoma clínico más precoz sea resultado del funcionamiento anormal más que de una hemólisis. Estudios clínicos sugieren que cuando el nivel de la hemoglobina fetal se encuentra por encima de un 10 % del total, los pacientes presentan menos síntomas y un curso clínico más discreto. En los casos poco frecuentes en los que el nivel alcanza o rebasa 20 % (distribución desigual) de la hemoglobina fetal, la hemólisis se encuentra atenuada y existen pocos síntomas, si los hay. Por desgracia, en el promedio de casos de anemia drepanocítica la hemoglobina fetal representa solo alrededor de un 5 % de la hemoglobina total.

CAPITULO V

CARACTERISTICAS CLINICAS

CARACTERISTICAS CLINICAS: (18)

Rasgo drepanocítico AS (heterocigoto)

Los individuos con rasgo drepanocítico son normalmente asintomáticos. Pueden, sin embargo, mostrar hipostenuria y en raras ocasiones desarrollar hematuria. Estos dos síntomas se originan a consecuencia del medio que se encuentra en las papilas de la médula renal. El mecanismo de concentración renal a contracorriente produce una alta osmolaridad en la médula renal y esto puede originar formación de drepanocitos (eritrocitos en forma de hoz), dando como resultado la producción de infartos papilares y hematuria consecuente. Existen otras situaciones especiales bajo las cuales los individuos con rasgo drepanocítico pueden desarrollar síntomas, que incluyen los vultuosos en aparatos no presurizados, la hipoxia durante la anestesia y la neumonía grave.

Anemia drepanocítica SS

Los drepanocitos suministran un testimonio elocuente de que el organismo puede adaptarse a la anemia crónica grave. El diagnóstico debería considerarse en pacientes jóvenes de raza negra que poseen mucosas pálidas y una ligera ictericia conjuntival. Estos pacientes son generalmente asténicos y pueden retrasarse en el desarrollo físico o tienen una apariencia delgada y de desnutrición.

Úlceras en las piernas.- Son frecuentes las úlceras crónicas en las piernas o cicatrices de úlceras, generalmente en el área que circunda el tobillo. Esta complicación puede representar uno de los aspectos más exasperantes de la enfermedad. Es poco probable que las úlceras sean debidas por completo a la presencia de la hemoglobina S (Hb S), ya que individuos -

con talasemia pueden tenerlas también. El factor determinante puede ser la hipoxia crónica en estas áreas, combinada con la baja temperatura. Las úlceras suelen curar efectuando transfusiones de sangre normal a estos pacientes y manteniendo su hemoglobina por encima de 10 mg/ 100 ml. Puede ser también preciso en algunos casos el injerto de piel.

En la drepanocitosis puede presentarse también edema de las manos (dactilitis por drepanocitosis) o de los pies.

Alteraciones óseas.- La anemia hemolítica crónica con hiperplasia eritroblástica puede dar como resultado el ensanchamiento de los espacios medulares, adelgazamiento de los corticales y engrosamiento de las trabéculas. Puede producirse desmineralización de los cuerpos vertebrales que se volverán bicóncavos debido a la presión de los núcleos pulposos sobre la debilitada estructura ósea. Hacia el final de la infancia puede observarse un depósito característico de nuevo tejido óseo en el interior de las corticales de los huesos largos, lo que da como resultado el estrechamiento de los espacios medulares. Las crisis con dolores óseos pueden ser seguidas por la aparición de reacción perióstica y pueden verse áreas irregulares de osteoesclerosis que representan áreas de infartos óseos. Hay una creciente frecuencia de osteomielitis por Salmonella en estos pacientes.

Alteraciones cardiopulmonares.- En el corazón es donde con mayor frecuencia se efectúan hallazgos clínicos en la drepanocitosis, lo que es especialmente cierto durante las crisis debidas a los eritrocitos en forma de hoz. A causa de la combinación de fiebre y anemia, hay una gran taquicardia y el choque de la punta del corazón se hace muy aparente. El corazón se dilata tanto a expensas de las cavidades derechas como de las izquierdas. Se oyen soplos sistólicos y diastólicos. La combinación del incremento en la velocidad de la circulación de la san

gre y las oclusiones de vasos pulmonares conducen a un aumento de la presión pulmonar. El electrocardiograma muestra comunmente arritmia sinusal y también prolongación del intervalo PR. Los infartos pulmonares son probablemente comunes en las drepanocitosis y pueden ocasionar episodios repetidos de dolor torácico, disnea inexplicable, neumonías atípicas y eventualmente cor pulmonale.

Alteraciones oculares.- Es posible observar tortuosidades en los vasos de la retina pero esto no es característico de la drepanocitosis. El examen de las conjuntivas con una lámpara de hendidura o un oftalmoscopio puede revelar muchos segmentos capilares en forma de coma o de sacacorchos que al parecer están aislados de la red vascular porque sus arterias aferentes y eferentes se han vaciado de sangre. Estos sitios de acumulación intravascular transitoria de eritrocitos se encuentra junto a la conjuntiva bulbar en las zonas cubiertas por los párpados. Este aspecto difiere del flujo capilar en forma de rosario consecuente a un grado benigno de lentitud circulatoria, que puede observarse en otras condiciones, tales como la diabetes mellitus.

Alteraciones en el Sistema Nervioso Central.- Se han descrito muchas complicaciones neurológicas, que incluyen somnolencia, convulsiones, cefalea, hemiplejía, afasia, ceguera temporal o permanente, parálisis de los nervios craneales y parestesias de las extremidades.

Crisis drepanocítica.- La expresión se refiere a todo nuevo síndrome que se desarrolla rápidamente en los pacientes por drepanocitosis, debida a la anomalía básica genética y no explicable por cualquier otra base. Solc hay, en general, dos clases de crisis: la dolorosa y la aplástica. Un tercer tipo, hiperhemolítico, puede presentarse en los niños mientras el bazo es aún grande, pero probablemente no existe en los adultos

o es consecuencia de otras complicaciones. Por ejemplo Diggs ha observado 747 crisis en 166 pacientes y no ha encontrado ninguna alteración significativa en el recuento de reticulocitos; en la bilirrubina, o en la excreción de urobilinógeno durante o después de dichas crisis. Esto coincide con la experiencia de otros autores. Un estudio de los pigmentos bencidina positivos en el suero de 22 pacientes con crisis drepanocítica, no evidenció tampoco hiperhemólisis, con la excepción de una mujer embarazada de 30 años que presentó aborto fetal con hemorragia uterina anormal y falleció. Su sangre mostró un notable incremento de pigmentos bencidina positivos. Cuatro individuos con crisis hemolíticas dolorosas poseían deficiencia asociada de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Crisis de dolor.- Pueden acontecer espontáneamente o ser precipitadas por un stress de cualquier tipo, incluyendo infección o exposición al frío. El dolor tiene a menudo su inicio por la mañana y se sitúa en los huesos, en las articulaciones de las extremidades o en la parte baja de la espalda. Puede ser muy fuerte o de naturaleza migratoria. Los dolores abdominales no son raros, y puede inducir a la cirugía abdominal, a menos que se reconozca la drepanocitosis. Existe habitualmente una elevación asociada de la temperatura (38-40° C); y leucocitosis. A pesar de que el dolor puede persistir durante varias semanas, los ataques duran en general de cuatro a seis días con desaparición espontánea y gradual del mismo.

Crisis aplásticas.- Se observa cuando una infección u otra causa de stress precipitan una disminución importante en la velocidad de la eritropoyesis. Esto en combinación con la hemólisis, ocasiona una dramática exacerbación de la anemia. Los reticulocitos son muy escasos o totalmente ausentes y el examen de la médula ósea en los estadios primarios muestra pocos eritroblastos como único remanente de la otrora activa eritropoyesis.

En las crisis aplásticas de la drepanocitosis está indicada la transfusión como medida terapéutica de elección.

Rasgo drepanocítico.- Con la excepción de ocasionales células en blanco de tiro, el frotis de los pacientes con rasgo de hemáties falciformes es normal. Se puede demostrar la formación de células en hoz dejando la sangre bajo cubreobjetos tapado herméticamente durante 24 a 48 horas, o añadiéndole un agente reductor, como por ejemplo, una gota de metabisulfito de sodio al 2 % recién preparado.

La electroforésis del hemolizado de los individuos con rasgo drepanocítico demuestra que la hemoglobina S constituye menos del 50 % de la hemoglobina total.

En la drepanocitosis la anemia es normocrómica y va acompañada por datos de laboratorio de hemólisis con eritropoyesis eficaz, como son bilirrubina sérica con reacción indirecta que se encuentra aumentada, aumento de urobilinógeno fecal y de la reticulocitosis y de la hiperplasia eritrocítica de la médula. El nivel de glóbulos rojos en los pacientes con anemia drepanocítica se sitúa normalmente entre dos y 3.5 millones por mm^3 . Durante la crisis aplástica puede ser menor. Las células en forma de hoz completas o parcialmente formadas pueden ser vistas en la sangre de individuos con anemia drepanocítica, mientras que no se encuentra en los que solo tienen rasgo drepanocítico. Pueden encontrarse grandes macrocitos, debido a la eritropoyesis eficaz, y también microcitos. Puede haber aumento de células en diana (en blanco de tiro). Los hemáties nucleados están casi siempre presentes en proporción de 1:100 por cada 100 leucocitos. Pueden observarse los signos usuales de eritropoyesis eficaz, tales como policromatofilia, punteado basófilo, cuerpos de Howell-Jolly y glóbulos rojos conteniendo hemosiderina. La reticulocitosis se eleva característicamente desde el 5 hasta el 30 %. Es común una discreta leucocitosis (30, 000) y puede estar asociada con monocitosis del 5 al 25 %; es también habitual la trombocitosis. La velocidad de sedimen

tación globular se encuentra característicamente disminuida en la anemia por drepanocitosis, debido muy probablemente a la inhibición de la formación de pilas de monedas por la transformación falciforme de los globulos rojos.

Tal como se ha dicho antes, las crisis aplásticas son una grave complicación grave y no rara de la anemia por drepanocitosis. La existencia de esta complicación acentúa la importancia de un recuento urgente de reticulocitos que debe hacerse en los casos de enfermedad aguda. En las crisis aplásticas el recuento de reticulocitos dará como resultado cero o una cifra muy cercana. Si también se efectúan observaciones de la médula ósea se encontrará una ausencia casi total de precursores eritropoyéticos con excepción de algunos pronormoblastos. Al restaurarse la eritropoyesis la médula vuelve a poblarse, primero con normoblastos basófilos, luego policromatófilos y finalmente, ortocromáticos. Todo esto va seguido de un rápido aumento en el número de reticulocitos.

La electroforesis del hemolizado de la sangre de uno de estos pacientes, efectuada a un pH de 8.6 en papel filtro, gel de almidón u otras técnicas afines, muestra la migración de la hemoglobina S a medio camino entre la hemoglobina A y la hemoglobina A₂. También cantidades variables de hemoglobina F pueden verse migrar un poco, más lentamente que la hemoglobina A. Por medio de ensayo de desnaturalización se puede comprobar que la hemoglobina S se halla entre dos a 30 %.

Diagnóstico diferencial

En el diagnóstico de las alteraciones provocadas por los hematíes falciformes pueden surgir problemas muy grandes, que incluyen los siguientes:

1. Atribuir demasiados síntomas a la presencia del rasgo drepanocítico.
2. Falla en reconocer la variada gama de síntomas que pueden derivarse de la anemia por drepanocitosis.

3. Decidir si un individuo asintomático al cual por electroforesis se le demostró predominancia de hemoglobina que migra en forma semejante a la hemoglobina S, tiene, en efecto, anemia por drepanocitosis.

Como se ha apuntado, los individuos con anemia drepanocítica pueden presentar una amplia variedad de síntomas. Es difícil fallar en este diagnóstico si, cuando se examina a una persona anémica de raza negra, se tiene bien claro el concepto de la anemia por drepanocitosis, a pesar de que la combinación de fiebre, dolores en las articulaciones y soplos cardiacos en los pacientes con drepanocitosis, puede simular una fiebre reumática aguda.

Puede hacerse un ejercicio interesante de genética - hematológica cuando una electroforesis rutinaria muestra que -- una persona, relativamente asintomática, tiene la mayoría de su hemoglobina migrante como hemoglobina S y una prueba positiva de células en forma de hoz. En esta circunstancia, se incluyen las siguientes posibilidades diagnósticas:

1. Carácter homocigoto para la hemoglobina S
2. Carácter heterocigoto para la hemoglobina S y persistencia hereditaria de hemoglobina fetal
3. Carácter heterocigoto para la hemoglobina S y beta-talasemia
4. Carácter heterocigoto para la hemoglobina S y la hemoglobina D
5. Carácter heterocigoto para la hemoglobina S y la hemoglobina Memphis

La mejor forma de abordar este problema es estudiar a los padres, hermanos y descendientes de dichas personas. La presencia en un progenitor del rasgo de la betatalasemia, de una persistencia hereditaria de hemoglobina fetal, o el rasgo de hemoglobina D en lugar de S, nos dará la solución al problema que, sin una investigación de la familia, podría resultar muy difícil. Se puede sospechar el carácter heterocigoto para

hemoglobina S y el tipo A_2 de la beta-talasemia, con supresión completa de la síntesis de hemoglobina A_1 , a causa de la hipocromía, microcitosis, formación de células en blanco de tiro, anisocitosis, disminución de la hemoglobina en los hematíes y del volumen de los mismos, que se observa en este estado, - Además, el nivel de la hemoglobina A_2 se encuentra elevado pero es difícil de medir con precisión en presencia de la hemoglobina S. Si el gen de la beta-talasemia no suprime completamente la síntesis normal de la cadena beta, la presencia de la hemoglobina A descartará la enfermedad por enfermedad por hemoglobina S homocigótica en la electroforesis. Los heterocigotos mixtos para la hemoglobina S y el tipo de beta-talasemia con nivel elevado de hemoglobina fetal no muestran incremento de hemoglobina A_2 . Ya que este tipo de talasemia es causa frecuente de la completa supresión de la síntesis de la hemoglobina A_1 , puede ser difícil de distinguir este trastorno de la hemoglobina S homocigota, sin la ayuda de estudios familiares. En la heterocigosidad para la hemoglobina S y la persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal, la anemia es inexistente o benigna y estos pacientes generalmente son asintomáticos. Un examen del frotis de sangre por la técnica de Kleihauer demostrará que la hemoglobina fetal está homogéneamente distribuida en los glóbulos rojos. Además, el nivel de la hemoglobina fetal en esta alteración suele ser más alto que el que se observa en los homocigotos para la hemoglobina S.

En la electroforesis habitual, la hemoglobina D migra a la misma velocidad que la hemoglobina S; sin embargo, no forman drepanocitos. Los heterocigotos mixtos para las hemoglobinas S y D tendrán una prueba positiva de formación de drepanocitos. Sin embargo, son asintomáticos y no muestran anemia. Además, la solubilidad de su hemoglobina en medio alcalino es intermedia entre la de la hemoglobina A y la de la S. Ya que la hemoglobina D migra en forma diferente que la S, en la electroforesis en gel de agar este procedimiento puede identificar los individuos S/D. Se ha descrito una cadena mutante

(hemoglobina Memphis) que, estando presente en asociación con hemoglobina S homocigota reduce la gravedad de la enfermedad.

CAPITULO VI

FISIOPATOLOGIA

FISIOPATOLOGIA:

En la anemia drepanocítica la producción de eritrocitos parece ser inferior a la capacidad medular en un margen considerable (19), y algunas evidencias sugieren que no es tanto el índice de la hemólisis, sino la posición de la curva de disociación de oxígeno, lo que determina la masa de los eritrocitos. La eritropoyetina conducida al eritrón se controla probablemente por fluctuaciones en el pO_2 renal y, si esta última se mantiene en un nivel adecuado (como resultado de un desplazamiento patológico hacia la derecha en la curva de disociación de oxígeno), la estimulación eritroide puede ser subóptima. En cualquier nivel de hematocrito, la destrucción debe ser compensada por la producción, pero es de suponer que si existiese una hipoxia hística la eritrogénesis posterior, estimulada por eritropoyetina durante un periodo de tiempo, haría elevar el hematocrito a un nuevo nivel y reestablecería el equilibrio. Parece ser que no ocurre así. Una evidencia demostrativa en favor de esta hipótesis puede encontrarse en otras anemias hemolíticas crónicas en las que, en conjunto, el hematocrito guarda relación con la $p50$, independientemente del índice de hemólisis (20). Estos factores deberían ser tomados en cuenta al considerar la conveniencia de transfusiones de sangre. La transfusión de substitución puede ser a veces necesaria para eliminar células falciformes, pero no suele serlo en pacientes que se hallan en un estado de equilibrio dinámico.

Hemólisis e intervalo de vida del eritrocito

Aún cuando se trata de cifras variables, el $T\ 1/2$ de Cr^{51} es de unos ocho días en término medio en la anemia drepanocítica (21), de alrededor de unos 18 días en la enfermedad de hemoglobina - S/C (22) y de unos 15 días en la hemoglobina S-beta-talasemia (23). Un mejor índice de supervivencia del eritrocito es la vida celular media obtenida mediante el uso de --

diisopropilfluorofosfenato marcado (FPF³²). El intervalo medio de vida en la anemia drepanocítica es en promedio de unos 17 días (24), comparado con 120 días en un sujeto normal, - pero se observa considerable fluctuación en el índice hemolítico de un momento a otro. Aproximadamente una tercera parte de la hemólisis es intravascular (25) y los niveles de hemoglobina en plasma a menudo están elevados.

Dado que también el nivel de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6PD) del eritrocito se presenta en las mismas poblaciones portadoras del gen de hemoglobina S, es posible que coincidan los dos defectos. Algunos autores (27) han llamado la atención sobre la hemólisis aumentada en asociación con infecciones, crisis drepanocítica y terapéutica farmacológica en niños con deficiencia de G-6PD y ello debe ser tenido siempre en cuenta en los raros casos de crisis hemolíticas. La sugerencia señalada por algunos autores (28) en el sentido de que los sujetos con anemia drepanocítica con déficit de G-6PD pueden tener una ventaja selectiva de supervivencia no se ha confirmado. Ciertamente es posible que presenten molestias con mayor frecuencia y que sean también identificados más a menudo.

Hemodinámica y transporte de oxígeno

La fuerza conductora para la difusión de oxígeno a partir de los eritrocitos en los capilares, hacia las mitocondrias de la célula, es la diferencia de pO_2 entre estos organelos consumidores de oxígeno y la presión con la que la hemoglobina libera oxígeno. La difusión a través del líquido histico requiere una pO_2 óptima en el extremo venoso del capilar, que debe ser mantenida si el aflujo de oxígeno tiene que afrontar necesidades. Este pO_2 venoso varía entre los distintos órganos, pero el promedio de todas estas diferentes presiones será igual a la pO_2 de sangre venosa de la arteria pulmonar. En el

sujeto en reposo existe normalmente una pO_2 de 39 mmHg, la que es mantenida por la forma sigmoide y la posición de la curva de disociación de oxígeno (29) (Fig. 4 y 5).

La escasa afinidad para con el oxígeno de la sangre en la anemia drepanocítica ha sido perfectamente documentada, pero no se explica fácilmente debido al hecho de que la hemoglobina S, al ser extraída del glóbulo rojo presenta una afinidad normal para con el oxígeno y reacciona normalmente con 2,3 difosfoglicerato (DPG). El nivel de DPG suele ser elevado y los niveles máximos se hallan en los reticulocitos, lo cual reduce la afinidad para con el oxígeno de la sangre, que desplaza la curva de disociación de oxígeno hacia la derecha. Sin embargo el desplazamiento hacia la derecha (escasa afinidad para con el oxígeno, elevada $p50$), suele ser mayor que el que pudiera atribuirse al DPG solo y, si se realizan comparaciones entre pacientes, se da una escasa correlación entre $p50$ y nivel de presión de descarga. Al comparar el porcentaje de drepanocitosis irreversible con $p50$ se encuentra una excelente correlación. La razón de esto se demostró recientemente sobre drepanocitosis irreversible, donde los eritrocitos separados presentan un contenido de DPG normal, pero una muy elevada $p50$ (30). Tal como se ha señalado anteriormente, estas células deformadas poseen una elevada concentración media de hemoglobina. Algunos autores (31) han explicado este fenómeno demostrando que la afinidad para con el oxígeno de los eritrocitos conteniendo hemoglobina S guarda relación con su concentración celular de hemoglobina. Cuanto más elevada es la concentración de hemoglobina S tanto menor es la afinidad para con el oxígeno de los eritrocitos; ello obedece, presumiblemente, a una interacción molecular; la tendencia a un orden aumentado entre moléculas de hemoglobina S sin ligando constituye una función de la concentración y tiene por resultado una menor afinidad por el oxígeno.

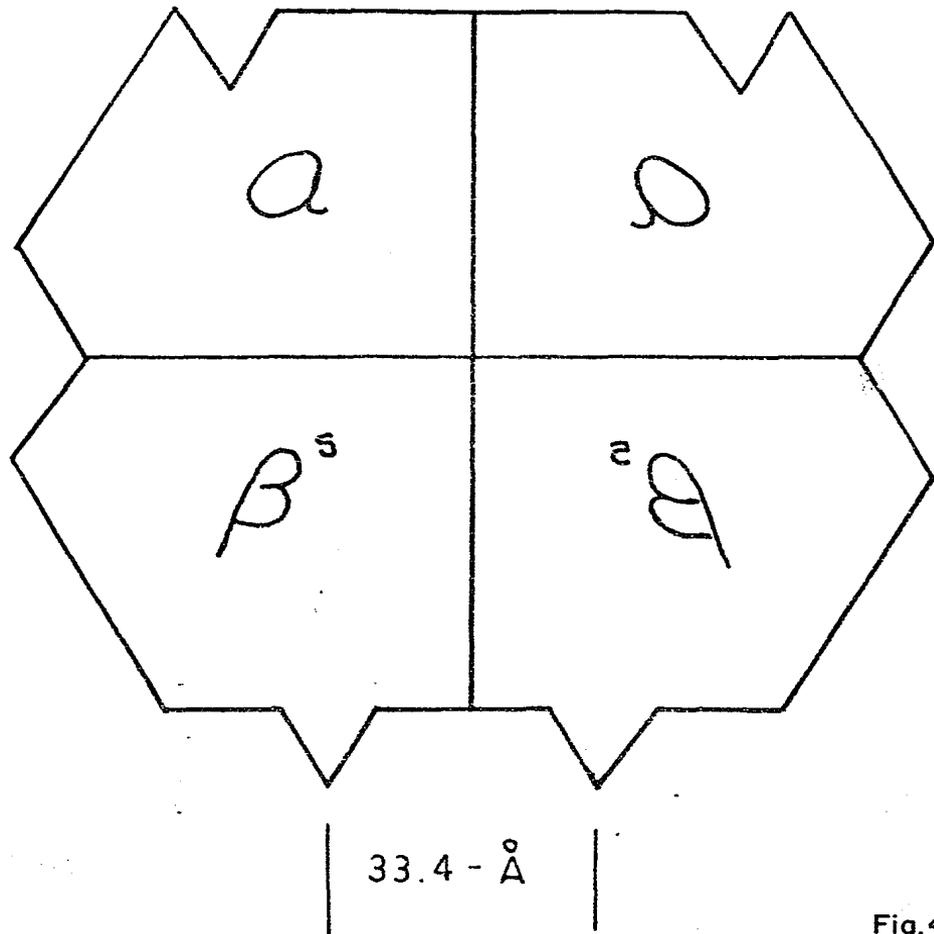


Fig.4

FIGURA 4

Representación esquemática de la configuración de la hemoglobina S en su estado oxigenado. La comparación con la figura 5 indica un desplazamiento central de las cadenas beta. El movimiento puede ser semejante al de una bisagra, y no un desplazamiento paralelo como se muestra en este diagrama.

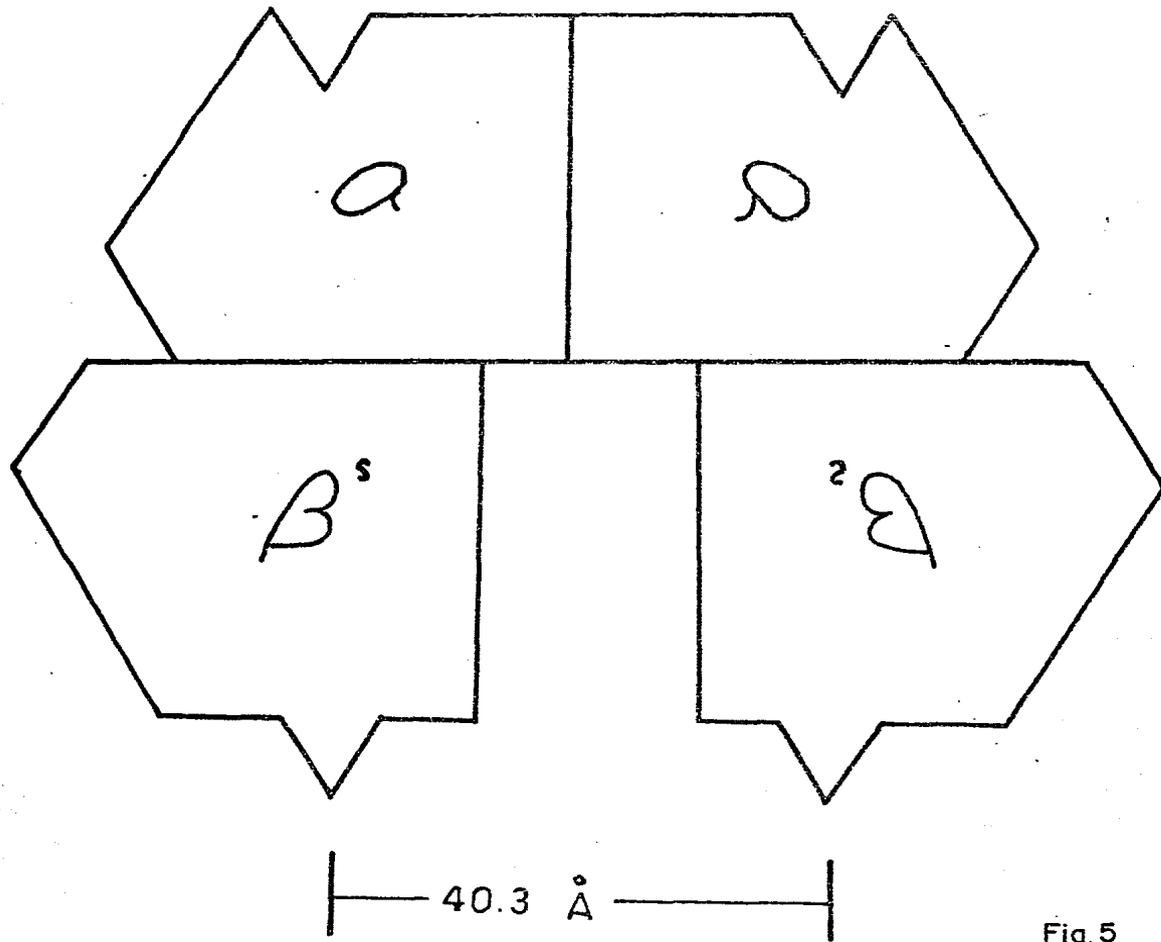


Fig. 5

FIGURA 5

Representación esquemática de la configuración de la hemoglobina S inducida por - desoxigenación. Las cadenas beta están desplazadas lateralmente en comparación con la forma oxigenada ilustrada en la figura 4.

CAPITULO VII

DISTRIBUCION GEOGRAFICA

DISTRIBUCION GEOGRAFICA:

El fenómeno de drepanocitemia es muy frecuente en los países con mayor población negra; antiguamente se creía exclusiva de esta raza. Sin embargo, Lehman (32) postuló que el gen de la hemoglobina S tuvo su origen en el medio oriente entre los Veddoides que habitan Arabia; estas tribus poblaron la península y gran parte del medio oriente y al final de la era neolítica emigraron a la India y al Africa, llevando consigo el gen de hemoglobina S. Otros autores han encontrado casos en Italia, Sicilia y Grecia.

El primer informe sobre la enfermedad que apareció en la literatura se debe a Herrick en 1910 (33), al describir sus hallazgos en un varón joven procedente de las Indias occidentales que vivía en Chicago; en 1951 se había extendido por toda América el conocimiento de la expresión clínica y patológica de la enfermedad. En Africa los casos de anemia drepanocítica eran raros a pesar de una elevada incidencia del rasgo falciforme en algunas zonas. Sin embargo, si se procedía a un examen de niños muy pequeños la incidencia de anemia drepanocítica era bastante aproximada a la que cabía esperar de la frecuencia del gen (35). Vandipette (1954) calculó que en cada generación deberían de nacer en el Africa central deberían de nacer alrededor de un millón de niños con anemia drepanocítica, pero al proceder a una revisión de 100 mujeres jóvenes embarazadas de Zaire, no encontró un solo caso de anemia drepanocítica. En la actualidad se calcula que en el cinturón del cobre en Sambia, aproximadamente la mitad de los enfermos fallecen antes de tres años de edad y las causas más frecuentes son gastroenteritis, neumonía y desnutrición.

Anemia drepanocítica leve

Si bien se han comunicado casos aislados de supervivencia prolongada en anemia drepanocítica (36), la bibliografía

fia estadounidense ha concentrado casi totalmente su atención en los casos hospitalizados y en las complicaciones graves. No obstante muchos médicos han quedado sorprendidos por el número de pacientes que, a través de los actuales criterios de laboratorio y genéticos presentan una anemia drepanocítica homocigota, pero que solo muestran una enfermedad leve. A menudo estos individuos tienen más de 20 años de edad, son personas activas y trabajan a pleno rendimiento y tienen crisis poco frecuentes.

En las Indias Occidentales es frecuente entre los adultos la anemia drepanocítica clínicamente leve, no obstante, todos estos pacientes clínicamente leves muestran una anemia acentuada y no pueden distinguirse claramente de los pacientes con más síntomas. En la infancia y en la adolescencia, un 94 % de dichos pacientes muestran crecimiento retardado (37) y su peso medio es inferior en dos desviaciones estándar al peso medio de los controles, si bien tienden a demostrar en la edad adulta una talla normal o incluso por encima de la media. Todavía se desconoce si estos pacientes son precisamente los supervivientes en una curva de distribución de supervivencia y tampoco se conoce el porcentaje de los nacidos con hemoglobina S homocigota que sobreviven a su vigésimo aniversario, aún cuando Scott en 1970 ha calculado que dicho porcentaje es solo del 50 % en Estados Unidos, lo cual parece injustificadamente pesimista.

Anemia drepanocítica benigna

Un informe procedente de Kuwait (Ali, 1970) fué el primero en sugerir la existencia de una variante benigna de la anemia drepanocítica, asociada con niveles inusualmente elevados de hemoglobina fetal. Recientemente (38) se ha estudiado este cuadro en un grupo de árabes sandies chiitas. Con excepción de crisis ocasionales con ligero dolor músculo-esque

lético, estos pacientes no se encontraban incapacitados, y sus niveles de hemoglobina oscilaban entre 9.4 y 12.3 g por decilitro. Ninguno de ellos presentaba úlceras: en las piernas, osteomielitis ni cardiomegalia, y tres de las mujeres habían llegado a término su embarazo sin complicaciones en un total de cinco embarazos. Sin embargo, el bazo era palpable en algún momento en ocho casos, en dos ocasiones se advirtió una coledoclitiasis, algunos pacientes presentaron alteraciones óseas radiológicas y un adolescente padeció una necrosis aséptica de la cabeza del fémur. Quizás el más interesante aspecto de estos pacientes lo constituyó un nivel elevado de hemoglobina fetal, de un 18.9 % por término medio, con límites entre 7.6 % y 36 %; solo en dos ocasiones la cifra fué inferior al 12 %. Esta producción sostenida de hemoglobina fetal se acompaña de una composición $\gamma/\alpha\gamma$ similar a la de la hemoglobina fetal en niños normales. Una comparación con la anemia drepanocítica en negros demostró que en esta última se encontraban proporciones de hemoglobina fetal similares a las observadas en adultos normales. No es claro el significado de este hallazgo con respecto a la elevada producción de cadenas gamma en los árabes, pero no hay duda de que se trata de un nivel elevado que, si bien con una distribución desigual, eleva el umbral falciforme para la mayor parte de los eritrocitos. El hematocrito más elevado en estos pacientes se acompaña de una menor p50 y de unos niveles de 2,3 DPG inferiores a los que habitualmente se encuentran en la anemia drepanocítica, aunque se desconoce por el momento el grado en que son hemolizados los eritrocitos.

Distribución en la República Mexicana

En la República Mexicana los estudios sobre esta alteración se han hecho de dos tipos, unos con orientación fundamentalmente antropológica y otros con orientación médica. Las de orientación médica con el objeto de caracterizar biológicamente a determinadas poblaciones. El criterio para la selección de los grupos indígenas investigados fué distinto en cada uno de los diferentes autores, teniendo en común:

- a. Se intentó estudiar indígenas no mezclados
- b. Se estudiaron poblaciones que por distintas razones de orden práctico podían investigarse y estaban dispuestas a cooperar con la toma de una muestra de sangre.

Estudios realizados en grupos indígenas no mezclados

Lisker recopiló los estudios realizados en indígenas no mezclados en el sureste de la República Mexicana por diversos autores, en una tabla de distribución de hemoglobinas anormales en la cual muestra que de 1, 481 indígenas estudiados, únicamente dos Chontales de Tabasco fueron heterocigotos para la hemoglobina S; en la misma muestra unos hallazgos hechos por Cannabes, quien encontró un sujeto con hemoglobina S y 20 con beta-talasemia. Lisker sugiere considerarlos con reserva ya que son totalmente diferentes a los descritos en otros estudios en otros estudios (39).

Entre los estudios de indígenas no mezclados se encuentran el del grupo macronahua que se localiza alrededor de la ciudad de México y el tarasco en el estado de Michoacán; de un total de 1, 201 indígenas estudiados, solo se encontraron tres heterocigotos para la hemoglobina S, lo cual indica la existencia de la mezcla africana y con ello puede afirmarse que la hemoglobinas anormales son poco frecuentes en la población indígena de México.

En estudios realizados en grupos mestizos, un hecho sobresaliente que se debe tener en cuenta en relación con la población de las costas de México es la inmigración de esclavos africanos que se inició en los primeros años de la dominación española. Aguirre-Beltrán (40) señala el hecho interesante de que aún cuando la introducción de esclavos se realizó principalmente en la costa este, un número no despreciable llegó al país por Acapulco. Los grupos negros de la costa occidental

parece ser que se formaron con los esclavos introducidos por Acapulco, además de aquellos que llegaron huyendo de plantaciones de estados vecinos. El sitio de origen de los esclavos no se conoce. En el siglo XVI los principales centros de exportación estuvieron en Safi, Marruecos; San Jorge de Mina, Costa de Oro; y Cabo Verde, Senegal. Los negros traídos de esos sitios pertenecían a las tribus tukolor, serer, diola, bifeda y malinka; twi, ashauta, hausa y kanuri de Africa Occidental. Al final del siglo XVI y durante el siglo XVII, la mayor parte de los esclavos eran de origen Bantú y provenía del delta del río Congo, y la isla de San Thomé era el principal sitio de concentración y exportación. Se calcula que en el año de 1640, alrededor de 150, 000 esclavos habían sido traídos a México.

Costa Occidental

En 1965 se recogieron datos preliminares sobre la presencia de deficiencia de G-6PD eritrocítica y de hemoglobina S en varias poblaciones de la costa oeste de México. Cuatro de estas poblaciones: Pochutla y San Pedro Mixtepec (municipio de Juquila, Oaxaca), y Cuajiniquilapa y Ometepec en el estado de Guerrero, se volvieron a investigar con el propósito de aclarar si la presencia de esas anomalías eran el resultado de la mezcla con africanos o si obedecían a otras razones en particular, a la ventaja selectiva que tienen los heterocigotos con hemoglobina S en zonas palúdicas. La investigación se realizó sólo en varones. En los resultados no se pudo calcular con exactitud la proporción de genes negros y blancos presentes en los grupos estudiados. Por otro lado, con otros marcadores genéticos se comprobó (42) en las otras poblaciones incluidas en el estudio, la existencia de genes de raza negra y se concluyó que la presencia de hemoglobina S y la deficiencia de G-6PD obedece a la mezcla de la población

local con esclavos africanos, y es legítimo preguntarse si la selección natural ha intervenido para mantener los porcentajes obtenidos. Si se parte de que los homocigotos SS fallecen antes de reproducirse y de que en ausencia de selección natural los heterocigotos AS y los homocigotos normales AA si se reproducen igual, los pobladores negros originales, llegados hace 325 años a México, debieron haber tenido una proporción AS cercana al 100 % (43) para tener la frecuencia observada actualmente en Cuajinicuilapa. Esta cifra teórica es inaceptable, y una explicación atractiva alternativa, es que la selección natural haya operado para mantener la hemoglobina S en sus cifras actuales, favoreciendo a los heterocigotos. El hecho de que en esta zona el paludismo por *Plasmodium vivax* fue ra hiperendémico, refuerza la sugerencia en el sentido de que este tipo de paludismo también actúa como agente selectivo de los individuos heterocigotos para hemoglobina S. Para intentar probar la posibilidad se hizo un cálculo de la frecuencia de hemoglobina S estratificando a la población analizada según la edad. En el caso de G-6PD la distribución por edad es bastante uniforme; en cambio, la frecuencia de hemoglobina S parece aumentar después de los seis años en Cuajinicuilapa y después de los nueve años en Ometepec. Estos datos apoyan la hipótesis de que la frecuencia de la hemoglobina S se ha mantenido alta en la zona como resultado de la selección natural.

Además de los datos anteriores, podemos agregar los de Kalmus y colaboradores, quienes estudiaron a 16 varones de Boquilla del Río Verde y 15 de Piedra Ancha, municipio de Jamiltepec, estado de Oaxaca, en relación con la presencia de hemoglobina S y la deficiencia de G-6PD. Encontraron a dos personas con hemoglobina S en los 31 sujetos examinados y uno mostró la deficiencia enzimática. Finalmente, Gamboa y colaboradores (44) estudiaron a 200 individuos de la Sabana, Guerrero en relación con la presencia de hemoglobinas anormales.

Encontraron a cinco personas heterocigotas para la hemoglobina S y a cinco con persistencia hereditaria de hemoglobina fetal. Este último hallazgo es novedoso, porque no se sabía con anterioridad de la existencia de esa anomalía en una proporción -- significativa en la población mexicana.

Costa Oriental

En otros trabajos como los realizados por González--- Deschamps sobre hemoglobinopatías en cinco poblaciones de Veracruz, se describe solo la frecuencia de hemoglobina S en cinco poblaciones de este estado. También Lisker (45) realizó otro trabajo donde nos proporciona datos sobre hemoglobina S y G-6PD investigadas en poblaciones de la costa Este de México y encontró hemoglobina S en todas las poblaciones estudiadas, lo que reafirma lo señalado en relación con la presencia de genes africanos.

Consideraciones finales

En las costas de México la anemia de células falciformes y la deficiencia de G-6PD eritrocítica no son raras. Los estudios anteriores, además de corroborar la amplia evidencia etnohistórica que existe en relación con la presencia de negros en esas zonas, permiten suponer que la patología humana encontrada en las costas debe ser diferente, en algunos aspectos, a la encontrada en el resto del país. Se puede calcular que si en una población la frecuencia de heterocigotos para la hemoglobina S es de 10 %, en uno de cada 100 matrimonios ambos --- miembros de la pareja serán heterocigotos y uno de cada 400 recién nacidos tendrá anemia de células falciformes, padecimiento altamente invalidante que requiere de atención médica constante y que habitualmente termina con la vida de los enfermos --- antes de que se reproduzcan.

CAPITULO .VIII .

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS :

El gran número de variantes de la hemoglobina, la --diversidad de sus estructuras y la detección de anomalías, ca--racterizada por la presencia de una hemoglobina estructuralmente anormal, han requerido el empleo de métodos de laboratorio muy sofisticados para su identificación definitiva. Además, el creciente interés en las hemoglobinopatías como un problema de salud pública, hacen necesario el disponer de métodos sencillos pero seguros con objeto de llevar a cabo la investigación fundamental. Por consiguiente, se ha intentado resumir la --metodología habitual en varios laboratorios hematológicos mun--diales, así como las técnicas disponibles en instituciones especializadas.

Se estudiaron quince familias de 16 pacientes con --anemia hemolítica de células falciformes que fueron vistos en el servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría. Se aceptó el diagnóstico de anemia de células falciformes con la demostración de una anemia hemolítica, con células en hoz en sangre periférica, prueba del metabisulfito de sodio positiva y un estudio electroforético que mostrara la hemoglobina S como componente único.

En cada uno de los pacientes se realizó una historia clínica completa y un examen físico cuidadoso, biometría hemática, dosificación de bilirrubinas y pruebas especiales para --la confirmación del diagnóstico; las cuales se realizaron también en los padres y hermanos.

Métodos hematológicos

El análisis hemático incluye la determinación de la concentración de hemoglobina (g por decilitro), el volumen del

hematocrito, el recuento de reticulocitos en porcentaje y el examen de frotis de sangre periférica. Para la determinación de estos parámetros se requiere:

1. La recolección de la muestra, generalmente por punción venosa.
2. Como para casi todo el trabajo hematológico y para muchos análisis bioquímicos se requiere sangre sin coagular, existen numerosos anticoagulantes. La mayor parte de ellos impiden que el calcio intervenga en la coagulación, bien sea precipitándolo como tal (oxalatos) o fijándolo en forma no ionizada (citrato o EDTA). Se eligió la sal dipotásica o disódica del ácido etilendiaminotetraacético porque impide que se ionice el calcio y ejerce por ello, tanto una acción anticoagulante muy intensa en cantidades de 1 a 2 mg por ml de sangre. Es preferible la sal dipotásica que resulta más soluble; pero aún así, la mezcla por inversión debe ser muy cuidadosa. La sustancia tiene muchas ventajas en hematología, por ejemplo, puede hacerse recuento de glóbulos rojo, blancos y hematocrito aún al cabo de varias horas. Así mismo pueden prepararse tres o cuatro horas después de la punción buenos frotis con morfología satisfactoria de leucocitos y eritrocitos. Puesto que esta sustancia tiene a impedir que las plaquetas se aglutinen o se peguen a la superficie, son posibles recuentos bastante exactos de estos elementos de sangre tratada con EDTA, muchas horas después de obtener la muestra. Para las técnicas habituales de laboratorio (muestras de 3 ml), se pone 0.1 ml de solución acuosa de EDTA al 10 % (sal dipotásica) en tubos o frascos y se evapora a sequedad. Es el mejor anticoagulante para la hematología habitual. Las muestras recogidas sobre EDTA se pueden conservar toda la noche a 4° C, sin inconveniente. Dadas las ventajas de este anticoagulante se seleccionó para utilizarlo en estos estudios.

3. Determinación de hemoglobina. La técnica usada para la -- determinación de hemoglobina es la de cianometahemoglobina. Considerando los patrones de que se dispone, este es el mé todo más adecuado en uso; asimismo permite medir todas -- las formas de hemoglobina.

Fundamento: La hemoglobina es transformada en cianometahemoglobina mediante la adición de ferrocianuro de potasio y cianuro de sodio. La densidad óptica del color producido es directamente proporcional a la cantidad de hemoglobina -- presente.

Método: Se diluyen 0.02 ml de sangre en 5 ml de reactivo. Después de 10 minutos se mide fotométricamente la densidad óptica de la solución a 540 nanómetros, utilizando un -- blanco con agua en una curva de calibración preparada con la ayuda de los patrones.

Reactivo: Se disuelven 2 g de bicarbonato de sodio, 50 mg de cianuro de potasio y 200 g de ferrocianuro de potasio en 200 ml de agua destilada. El reactivo existe también en -- el comercio.

Testigos: Como testigos conviene usar patrones del comer-- cio.

4. Determinación de hematocrito: Este parámetro se mide por el método de Wintrobe. Tiene el tubo de Wintrobe 11.5 cm de largo y 3 ml de diámetro interior, está graduado de 0 a 100 mm con marca tanto en sentido ascendente como descen-- dente. Se llena el tubo con sangre venosa anticoagulada -- con EDTA hasta la marca "0", asegurándose de que no haya: burbujas. Se ha visto recientemente que la relación entre EDTA y volumen de sangre es muy importante. La concentra-- ción final debe ser inferior a 2 mg de EDTA por ml de san-- gre; de otra manera, se encontrarán anomalías en el hema-- tocrito. Esto resulta especialmente importante cuando se -- utiliza un tubo al vacío que contiene una cantidad fija de EDTA, pues un llenado insuficiente del tubo significará -- una mayor relación entre EDTA y sangre. La preparación es centrifugada durante 30 minutos a una velocidad no menor de

3, 500 RPM, en una centrífuga de radio efectivo de 15 cm (o sea, 15 cm entre el eje o centro de la cabeza giratoria y el fondo de los portatubos en posición horizontal. Esto es importante ya que la fuerza centrífuga relativa (FCR) es directamente proporcional al radio y al cuadrado de la velocidad:

$$FCR = 1,118 \times R \text{ (cm)} \times (\text{RPM})^2 \times 10^{-8} \text{ G} = 2,054 \times \text{G}$$

En las condiciones descritas anteriormente

Resulta evidente de la fórmula anterior, que la centrifugación de eritrocitos será mas completa cuando el hematocrito sea bajo (anemia) que cuando esté alto (policitemia), debido a que la FCR disminuye linealmente con la columna de células. Queda implícito que el cabezal de la centrífuga debe permitir a los tubos rotar en el plano horizontal, -- para calcular la FCR por la fórmula ya anotada. Sin embargo, pueden emplearse centrífugas angulares para la determinación del hematocrito, pero los resultados deben ser comparados con los obtenidos en condiciones definidas, de manera que la velocidad correcta para la centrifugación total en la centrífuga angular sea determinada.

Lecturas: Una vez que la centrifugación es completa, el VGC se lee en la escala de la derecha del tubo, considerando el extremo superior de la banda oscura de eritrocitos compactos, inmediatamente abajo de la capa gris-rojiza de leucocitos.

La cifra obtenida en centímetros se multiplica por 10 para dar el hematocrito como un porcentaje, o sea, el volumen de células centrifugadas por 100 ml de sangre. En condiciones adecuadas el grado de error en el cálculo del hematocrito no debe exceder de 1 %. Este hecho hace que el VGC constituya la mejor prueba aislada de anemia, policitemia o hemoconcentración.

5. Recuento de reticulocitos.

Finalidad de la prueba: El recuento de los hematíes inmaduros (reticulocitos) es un método simple y directo, que valora el grado de eficacia de producción eritrocitaria. Debido a la liberación prematura o retardada desde la médula ósea y a los diferentes grados de maduración, los reticulocitos no siempre reflejan la actividad eritroide absoluta; sin embargo, la facilidad con que pueden ser contados en forma seriada en el mismo individuo hace el recuento reticulocitario un excelente método para valorar las variaciones del grado de producción eritrocitaria.

Principio de la prueba: El ARN residual de los hematíes inmaduros es precipitado y teñido con un colorante adecuado, como el azul de metileno o el azul de cresilo brillante.

Se preparan las extensiones y se cuentan las células que contienen precipitado teñido. Los resultados serán como proporción de los reticulocitos examinados o en cifras absolutas por mm^3 .

Reactivos y material:

- a. Azul de metileno. Se disuelven 0.5 g de colorante en 100 ml de agua destilada, con 1.6 g de oxalato potásico
- b. Microtúbulos (capilares) de hematocrito
- c. Cubreobjetos y Portaobjetos
- d. Cuadros de parafilm de 5 x 5 cm
- e. Tubos de ensaye

Técnica: Se ponen dos gotas de colorante en un tubo de ensaye. Se añade una gota de sangre y se dejan reposar a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos, con un tubo capilar se toma un poco de la muestra y se hace una extensión. -- Empleando aceite de inmersión y procurando mirar áreas sin células agrupadas, se cuenta el número de células que contienen gránulos azules o reticulares entre 1000 glóbulos -- rojos. Para que un recuento sea exacto, los glóbulos no deben estar agrupados en grumos o en pilas de monedas.

Cálculo de los resultados: (valores absolutos)

$$\frac{\% \text{ reticulocitos} \times \text{no. de hematíes} \times \text{mm}^3}{100} = \frac{\text{reticulocitos}}{\text{mm}^3}$$

Valores normales:

Adultos	1.64 %	(límites 0.56 - 2.72)
Recién nacidos	2 - 6 %	(estos valores descienden hasta los valores del adulto en 2 a 5 días)

6. Examen del frotis de sangre periférica

Método de preparación de los frotis: Es esencial utilizar portaobjetos limpios y sin grasa. A veces basta con lavar los portaobjetos nuevos en alcohol o una mezcla a partes iguales de alcohol y éter.

Para preparar un frotis en portaobjetos se pone a una distancia de uno a dos centímetros del borde una gota de sangre (de dos a 3 mm de diámetro) y el portaobjetos se deja sobre la mesa con la gota hacia arriba. Se escoge para extender la sangre otro portaobjetos con un borde liso y regular, cuyas esquinas se rompen para que la anchura del borde que extiende la sangre sea unos 4 mm menor que la anchura total del portaobjetos. Este borde de extensión se pone sobre el portaobjetos que sirve para extender la sangre se hace retroceder hasta que toque la gota de sangre, que se encuentra dentro de un ángulo agudo de 30 grados.

Inmediatamente la gota de sangre se extiende a lo largo del borde del segundo portaobjetos, que, formando el mismo ángulo de 30 grados, se hace deslizar en sentido contrario, rápida, cuidadosa y uniformemente. Mientras más rápido es el movimiento, más grueso resulta el frotis. El espesor también depende del ángulo entre los dos portaobjetos; mientras mayor es dicho ángulo, más grueso resulta el frotis. Para el trabajo hematológico y específicamente para éste, son preferibles frotis más delgados. El aspecto --

puede variar desde superposición franca de los glóbulos rojos al principio del frotis, hasta separación completa de los mismos al final, pasando por todos los grados intermedios. Mientras más lentamente se hace un frotis, más delgado resulta, y mayor es la proporción de leucocitos segmentados en los bordes y en la porción final.

En los frotis muy gruesos los leucocitos son pequeños, difíciles de teñir, y puede ser imposible reconocer las células. Aún en los mejores frotis, a causa de la diferencia de tamaño, densidad, etc., los leucocitos muestran una distribución particular. Los grandes monocitos y los polimorfonucleares predominan en los bordes y al final de la extensión, mientras que los linfocitos, más pequeños, se distribuyen en forma más uniforme y debido a la localización preferencial de los demás leucocitos, parecen predominar en la parte media. Esta distribución desigual no se presenta en los frotis sobre cubreobjetos. Una vez preparadas las extensiones se dejan secar al aire antes de tefirlas con colorante de Wright --- (eosina-azul de metileno).

Inducción de drepanocitos con metabisulfito de sodio (46)

Reactivo: Solución de metabisulfito de sodio ($S_2O_5Na_2$) :
Metabisulfito sódico 2 g
Agua destilada hasta 100 ml

Nota: esta solución debe ser reciente y utilizarse el mismo día.

- Técnica :
1. Poner una gota de sangre con anticoagulante del paciente sobre un portaobjetos
 2. Poner una o dos gotas de la solución de metabisulfito sódico sobre el portaobjetos y mezclar bien con la gota de sangre
 3. Tapar con un cubreobjetos y eliminar la sangre sobrante produciendo una suave presión sobre el cubreobjetos con un trozo de papel filtro
 4. Examinar la preparación en el microscopio con el objetivo seco de mayor aumento

5. Si la sangre procede de un enfermo con drepanocitosis, inmediatamente aparecerán dichas células, que serán muy abundantes al cabo de 15 minutos. Si no se observan en este lapso es que no hay drepanocitosis. Sin embargo, se debe observar al microscopio cada 15 minutos hasta completar una hora con la finalidad de asegurarse de la positividad o negatividad de la prueba.

Preparación del hemolizado

Reactivos: NaCl (cloruro de sodio) al 0.9 %
Tolueno
Agua destilada

- Procedimiento: 1. 3 ml de sangre anticoagulada colocada en un tubo de ensaye, se centrifugan en una centrífuga de radio efectivo de 15 cm durante 10 minutos; a 2,000 RPM; concluida la centrifugación, con la pipeta Pasteur se separa el plasma, quedando en el tubo el paquete de glóbulos rojos únicamente.
2. Para lavar, se agrega al paquete de glóbulos rojos NaCl al 0.9 % hasta llenar el tubo, y se invierte suavemente.
 3. Se centrifuga a 2,500 RPM durante 10 minutos (en una centrífuga con el mismo radio efectivo. Concluida la centrifugación se separa el sobrenadante.
 4. Se repiten los pasos 2 y 3 dos veces más
 5. Al paquete de glóbulos rojos lavados se le agrega la misma cantidad de agua destilada y se agita vigorosamente -- hasta la hemólisis total
 6. Para separar el estroma de los glóbulos rojos se agregan al hemolizado 0.4 ml de Tolueno y se centrifuga la muestra a 3,000 RPM durante 20 minutos.
 7. Al terminar la centrifugación se extrae cuidadosamente la fase inferior del tubo con una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo de ensaye limpio dentro del congelador, si es que no se va a utilizar inmediatamente.
 8. La muestra guarda sus propiedades en el congelador durante 15 días.

Determinación de hemoglobina fetal

Las propiedades estructurales específicas de la hemoglobina F han dado lugar a varios métodos para su detección y cuantificación. Los métodos cualitativos se basan en la movilidad electroforética y cromatográfica de la hemoglobina F, en su ritmo lento de desnaturalización a un pH de 10.5 a 11, en su absorción específica en el ultravioleta y en su especificidad inmunológica.

El método utilizado para la demostración de hemoglobina F en cada eritrocito se basa en la diferencia que existe en el índice de disociación en subunidades de hemoglobina A y hemoglobina F en sangre total o en los hemolizados de eritrocitos, determinados por el aumento de resistencia de la hemoglobina F a la desnaturalización con reactivos alcalinos

Procedimiento de determinación de hemoglobina fetal por desnaturalización de un minuto (47)

Reactivos: I. Solución 1/12 N de NaOH o KOH (se conserva en frasco de polietileno en refrigeración).

KOH 4.675 g/ 1,000 ml

NaOH 3.33 g/ 1,000 ml

II. Solución precipitante

Solución acuosa saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que contenga 1.25 % de una solución 10 N de HCl

Procedimiento:

1. El día que se realiza la prueba se prepara un hemolizado fresco y se determina la concentración de hemoglobina por el método de cianometahemoglobina (0.02 ml de hemolizado en 5 ml de reactivo, dilución 1:250)

2. En un tubo de ensayo se colocan 1.6 ml de la solución de NaCl o KOH, y se agregan 0.1 ml del hemolizado fresco y se empieza a tomar el tiempo por un minuto; la pipeta con la que se pone el hemolizado debe lavarse varias veces en la solución alcalina
3. Se agita la muestra vigorosamente y pasado un minuto se le agregan 3.4 ml de la solución de sulfato de amonio precipitante, se agita y se invierte el tubo varias veces y se filtra inmediatamente a través de dos capas de papel -- filtro Wathman I. La solución filtrada que se obtiene se lee al espectofotómetro.
4. Agregar 4 ml de reactivo cianometá a 1 ml del filtrado; mezclar muy bien y leer. El resultado se expresa como la proporción de lo desnaturalizado presente en el filtrado, respecto de la hemoglobina inicial (100 %) presente en el hemolizado, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{HbF} = \frac{\text{D.O. del filtrado} \times 100}{\text{D.O. del hemolizado}} = \text{g} \%$$

Electroforesis

Electroforesis es un término que se refiere al movimiento de partículas o iones en un campo eléctrico. Los métodos electroforéticos fueron desarrollados por primera vez hace 40 años por Arne Tiselius. Los avances han resultado en la evolución de la electroforesis como uno de los métodos más -- efectivos de separación y caracterización. Los únicos requerimientos son: a. Que los componentes de la mezcla deben -- estar en forma iónica o ser convertidos a ella, b. Que cada -- componente debe tener una carga neta distinta.

En problemas bioquímicos la electroforesis ha sido -- muy valiosa en el aislamiento y la separación de proteínas. Hay dos razones principales para esto: a. Los métodos elec-- troforéticos se pueden realizar en condiciones muy suaves, pro-- tegiendo así a las proteínas muy inestables de cualquier modi--

ficación estructural severa, y b. Algunos métodos tienen un alto poder de resolución, resultando una clara separación de moléculas proteicas similarmente cargadas.

En el lenguaje fisicoquímico, el grado de movimiento de una partícula cargada en un campo eléctrico se denomina movilidad electroforética (μ); para una partícula esférica cargada no sometida a ninguna interacción electroforética fuerte de su medio ambiente, se puede demostrar mediante un análisis teórico que:

$$\mu = 6 \frac{Q}{\pi \eta r}$$

donde Q = Carga neta de la partícula

r = Radio de la partícula en centímetros

η = Viscosidad del medio líquido donde ocurre la migración

Esta ecuación fundamental revela la esencia de un análisis electroforético. Considerando que la solución líquida conductora permanece invariable durante el análisis y así la viscosidad del medio es constante durante todo el procedimiento, la ecuación establece que la migración de una partícula está controlada por la razón entre dos variables, específicamente la relación tamaño-carga.

De esta manera:

$$\mu \propto \frac{Q}{r}$$

(Partículas diferentes en el mismo medio)

A medida que la relación aumenta, la movilidad también aumenta. Si suponemos además que los componentes de una mezcla no difieren apreciablemente en su tamaño molecular, la ecuación se reduce a una relación directa de la forma $\mu \propto Q$

para partículas diferentes, del mismo tamaño en el mismo medio. Esta es la manera de establecer que la migración de partículas iónicas, similares en tamaño, es dependiente directamente de sus cargas respectivas. A mayor carga mayor migración.

Los métodos de electroforesis se pueden clasificar en zonales o de límite móvil. En el método de límite móvil, la electroforesis se realiza en solución, es decir, las partículas cargadas migran libremente a través de un canal abierto lleno de un medio rígido conductor, es decir, una solución salina. Una consecuencia natural de este tipo de separación es que los solutos nunca llegan efectivamente a separarse unos de otros. Las partículas se desplazan hacia el electrodo de carga opuesta, formándose un borde que permite distinguir la presencia de cada componente. Una muestra pura se caracteriza por presentar un límite único entre las partículas de soluto que migran y la región del canal que contiene la solución; dos límites indicarán la presencia de dos solutos, y así sucesivamente. La única aplicación práctica del método de límite móvil es probar la pureza de una muestra y estimar las concentraciones relativas de los solutos. Los métodos de electroforesis zonales han desplazado virtualmente al del límite móvil. La razón para esto es que además de caracterizar pureza, las técnicas zonales son también efectivas para la separación, puesto que los solutos pueden disolverse en zonas discretas. La electroforesis zonal no se realiza en solución sino que requiere un soporte sólido; según el aparato, la migración puede ser vertical u horizontal. El primer soporte sólido usado fué el papel filtro. Una plataforma horizontal sostiene una tira de papel cuyos extremos cuelgan en un compartimiento del electrodo que contiene la solución salina conductora. La tira de papel misma está completamente mojada para que el circuito eléctrico entre los dos compartimientos se cierre. Las muestras pueden aplicarse directamente al papel.

húmedo en el origen designado. El resto del área está disponible para la migración electroforética. El resultado de limitar la aplicación inicial de la muestra a un lugar pequeño, respecto de la región que permanece disponible para la migración, es que los solutos individuales tienen propiedades electroforéticas diferentes, tienen la oportunidad de desplazarse entre sí como zonas discretas, sin superposición. Este no es el caso en la celda en forma de "U" que se usa en la electroforesis de bordes móviles, donde la región para la migración es del mismo tamaño que el destinado a la muestra, es decir, los compartimientos son idénticos. En otras palabras, la diferencia en el resultado de los dos métodos es algo similar a comparar una carrera corta de 20 metros y una carrera de una milla a campo traviesa, con 10 corredores. Una fotografía en la meta de la carrera de 20 metros mostrará probablemente los cuerpos extendidos de los 10 corredores superpuestos entre sí desde el primero hasta el último lugar. En la carrera a campo traviesa, no obstante, cada corredor indudablemente cruzará la meta con una separación distinta de los otros corredores.

Existe en la actualidad una gran variedad de soportes sólidos, incluyendo tiras de papel filtro que fué el soporte primeramente usado. Un revolucionario avance en ésta área -- fué en 1955 por O. Smithies que desarrolló el uso de geles porosos de almidón como soporte sólido. El poder de resolución del gel de almidón fué superior a cualquier otra técnica. Este aumento de resolución se debe al hecho de que la migración diferencial de las partículas cargadas no está controlada solo por las diferencias de carga, sino también por las diferencias de tamaño. Puesto que las partículas de gel son porosas, los solutos pueden difundirse reversiblemente dentro de los gránulos. En los métodos del gel, por consecuencia, tanto la carga molecular neta (Q), como el tamaño molecular (r) son en realidad variables importantes.

Sin embargo, resultados variables y dificultades en

Tiras de Cellogel

Equipo: Equipo para electroforesis Chemotron Tand Mod 2
PAC / 5 (De Internacional Científica) *
Cámara electroforética *
Puente de soporte de 8.5 cm *
Semiaplicador de 50 microlitros *
Fuente de poder (CAMAC)
Placa de vidrio para transparentizar

Procedimiento:

1. Sumergir las tiras en el amortiguador trisglicina por lo menos 10 minutos
2. Eliminar el exceso de líquido entre dos hojas de papel filtro
3. Extender las tiras sobre el puente de la cámara. La superficie penetrable tiene que ir dirigida hacia lo alto, (para estar seguros que la superficie penetrable está bien colocada, debe quedar la esquina incompleta de la tira, hacia abajo y hacia la derecha). La tira debe estar tesa y plana; conviene operar rápidamente para evitar evaporación.
4. Se aplican las muestras hemolizadas, primero la de un testigo normal, junto a ella la del paciente y al final la de un paciente conocido con hemoglobina fetal. La finalidad de correr la muestra problema (paciente) junto con un testigo normal y un fetal, radica en comparar que tan lenta corre electroforéticamente la banda de hemoglobina S y ver si hay fracción de hemoglobina F.
5. Se colorean por 5 minutos con Ponceau
6. Se decoloran con 3 o 4 baños del decolorante
7. Transparentizado: una vez terminada la decoloración se transparentizan las tiras de la manera siguiente:
 - a. se sumergen las tiras en metanol puro anhidro durante 30 segundo
 - b. a continuación se sumergen un minuto en la solución transparentizadora

c. se colocan sobre una placa de vidrio, eliminando --
las burbujas de aire, y se llevan a una estufa a --
60° C durante 5 minutos. Las tiras deben quedar
transparentes y las bandas observarse claramente.

CAPITULO IX

RESULTADOS

RESULTADOS:

Las familias estudiadas provienen del interior de la República Mexicana, la mayoría de ellas de las costas del Golfo de México: seis del estado de Veracruz y dos del estado de Tabasco; cinco de los 16 pacientes provienen de las costas del Océano Pacífico: cuatro del estado de Guerrero y uno del estado de Oaxaca; las tres familias restantes del estado de Morelos (Figura 9). La procedencia de los pacientes estudiados está de acuerdo con los datos de distribución de Lisker (43).

Distribución por sexo

Aún cuando se observó mayor número de pacientes del sexo femenino (9/16), la diferencia no parece ser significativa.

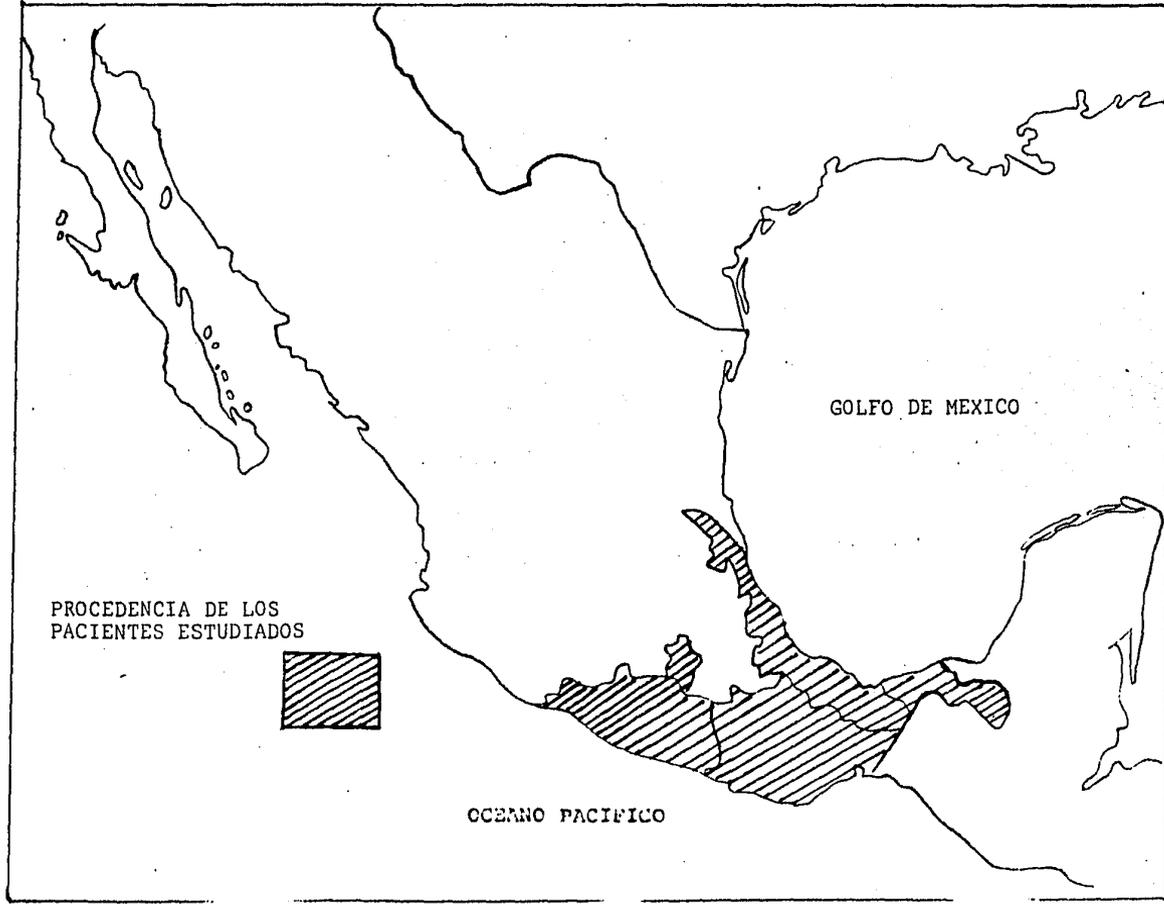
Edad

Cinco de los 16 pacientes fueron diagnosticados en la etapa preescolar, otros cinco en la etapa escolar y otros tantos en la lactancia; habiéndose diagnosticado solo un paciente después de los 12 años de edad. La mayoría de ellos (12/16) iniciaron las manifestaciones clínicas de la enfermedad en los cuatro primeros años de la vida, y ocho de estos 12 pacientes en el primer año de vida. Dos de los pacientes estudiados iniciaron la enfermedad en el primer mes de la vida. El tiempo de evolución entre el inicio del padecimiento y el diagnóstico fluctuó entre un mes y 10 años.

Cuadro clínico

En relación al cuadro clínico observamos que la ma--

FIGURA N° 9



CUADRO # 1

EDAD DE INICIACION APARENTE DE LAS MANIFESTACIONES
CLINICAS EN LOS CASOS ESTUDIADOS

<u>EDAD (años):</u>	<u>No. DE CASOS:</u>
0 - 2	3
2 - 4	4
4 - 6	2
6 - 8	3
8 - 10	1
12 - 14	1
14 - 15	1

CUADRO # 2

SINTOMAS Y SIGNOS MAS FRECUENTES OBSERVADOS EN PACIENTES
CON ANEMIA DE CELULAS FALCIFORMES

Palidez	(15/16)	93.75%
Ictericia	(8/16)	50.0%
Coluria	(3/16)	18.75%
Dolor Abdominal	(4/16)	25.0 %
Astralgias (en miembros su- periores e infe- riores).	(5/16)	31.25%
Flogosis (en miembros su- periores e infe- riores).	(5/16)	31.25%
Astenia	(3/16)	18.75%
Cefalea	(1/16)	6.25%
Irritabilidad	(6/16)	37.5 %
Hepatomegalia	(13/16)	81.25%
Esplenomegalia	(6/16)	62.5 %

por parte de los pacientes presentaron palidez e ictericia. En la exploración física se encontraron palidez, hepatomegalia e ictericia como datos más frecuentes. En seis de 16 pacientes se encontró esplenomegalia en la etapa inicial del padecimiento, y en uno de estos seis pacientes la esplenomegalia fué masiva. En este paciente las alteraciones de la electroforesis y el estudio familiar sugiere la presencia de un defecto doble: hemoglobina S y Talasemia. La mayoría de los pacientes (7/16) habían sido transfundidos por anemia antes de llegar a esta Institución.

Datos de Laboratorio

Anemia. Los 16 pacientes presentaron anemia en el momento de ser vistos por primera vez en el Hospital; la mayoría de ellos (12/15) presentaron anemia moderada, entre 6 y 9 g de hemoglobina, y solo cuatro de 15 llegaron con anemia severa, entre 4 y 5 g de hemoglobina. La leucocitosis, la normoblastemia, presencia de drepanocitos, anisocitosis y poiquilocitosis, fueron datos frecuentes observados en la mayoría de los pacientes.

Prueba de metabisulfito de sodio. En los 16 pacientes estudiados, la prueba fué positiva al 100 % a los 60 minutos.

Hemoglobina fetal. Fué considerada normal en todos los pacientes estudiados, ya que los valores fluctuaron entre 1 y 3 %.

Electroforesis de hemoglobina. El estudio mostró la presencia de una banda lenta en 15 de los pacientes, que corresponde a la hemoglobina S. En uno de los pacientes estudiados hubo diferencias que lo distinguieron del resto, ya que en el estudio familiar se encontró en la madre una banda de hemoglobina A₂ aumentada y no el rasgo falciforme como se esperaba; en este paciente la electroforesis mostró una banda única correspondiente a hemoglobina S. El cuadro clínico se caracterizó

por una anemia hemolítica con esplenomegalia masiva, por lo cual la posibilidad más factible es que este paciente tenga un doble defecto, hemoglobina S-Talasemia.

Bilirrubinas. Solamente en nueve de los 16 pacientes se hizo determinación de bilirrubinas, encontrando en tddos ellos -- elevación de la fracción indirecta, y en cinco de nueve pa--- cientes hubo además una discreta elevación de la bilirrubina - directa.

CAPITULO X

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES :

La utilidad de los métodos seleccionados para el diagnóstico de la Anemia Hemolítica de Células Falciformes fué definitiva:

1. Datos de la biometría hemática permiten sospechar la existencia de una Anemia Falciforme, y detectar tanto enfermos como portadores.
2. La prueba de metabisulfito de sodio permite confirmar la existencia de esta enfermedad.
3. Con la electroforesis de hemoglobina se puede identificar tanto a los homocigotos enfermos como a los heterocigotos portadores, lo cual permite dar un consejo genético adecuado.
4. La procedencia de los pacientes logró corroborar la distribución geográfica que la literatura menciona sobre esta enfermedad.

Por lo tanto, podemos considerar que la utilización de este conjunto de pruebas es suficiente para lograr un diagnóstico de precisión.

CAPITULO XI

APENDICE

En este capítulo se encuentran los hallazgos de la biometría hemática inicial que se realizó a cada uno de los pacientes a su ingreso al Hospital, así como los datos obtenidos del estudio familiar al efectuarles la prueba del metabisulfito de sodio y la cuantificación de hemoglobina fetal y los esquemas resultantes de la electroforesis de hemoglobina.

FAMILIA No. 1

Edad: 15 años

Registro: 232714

Procedencia: Morelos.

Biometría Hemática.

Hemoglobina 8.25 g.

Hematocrito 25

Leucocitos 24,500

Drepanocitos No se encontraron

Normoblastos No se encontraron

Basofilia Difusa No se observó

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb. Fetal
Padre	+	2.0%
Madre	+	1.0%
Paciente	+	1.3%



- Varón Heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer Heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer Homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 2

I.- Edad: 2 años.

Registro: 159698
Procedencia: Morelos.

Biometría Hemática.

Hemoglobina 7.1 g	Drepanocitos No se encontraron
Hematocrito 21	Normoblastos 72%
Leucocitos 14,600	Basofilia Difusa ++
Reticulocitos 10%	

II.-

Registro: 230103

Edad: 7 años.

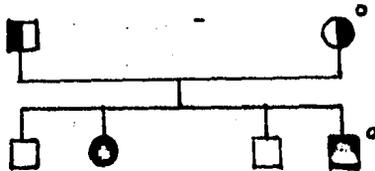
Procedencia: Morelos.

Biometría Hemática.

Hemoglobina 7.3 g.	Drepanocitos ++
Hematocrito 21	Normoblastos 95%
Leucocitos 7,600	Basofilia Difusa +

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	2.0%
Madre	-	1.0%
Paciente I	+	2.0%
Paciente II	+	2.0%
Hermano	-	1.5%
Hermano	-	1.5%



- Varón normal
- ◻ Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◼ Varón homocigoto para la Hb "S" y Talasemia
- Mujer homocigoto para la Hb "S"
- ◐ Mujer heterocigoto para la Talasemia

FAMILIA No. 3

Registro: 103225

Edad: 1 año.

Procedencia: Tabasco

Biometría Hemática.

Hemoglobina 7.0 g
Hematocrito 21
Leucocitos 17,400

Drepanocitos ++
Reticulocitos 15.0%
Normoblastos 20%
Basofilia Difusa ++

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.45%
Madre	+	1.0%
Paciente	+	2.5%



- ◻ Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◐ Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- ◼ Varón homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 4

Registro: 221618

Edad: 4 años 5 meses

Procedencia: Veracruz.

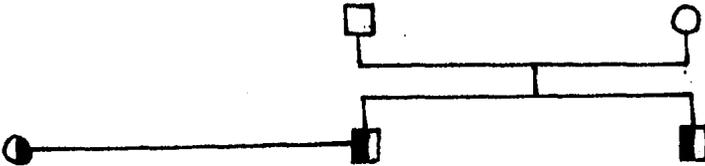
Biometría Hemática.

Hemoglobina 6.3 g
Hematocrito 20
Leucocitos 13,100
Reticulocitos 2.6%

Drepanocitos No se encontraron.
Normoblastos 5%.
Basofilia Difusa ++

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.45%
Madre	+	1.5%
Paciente	+	2.0%
Tío Paterno	+	1.7%



- Varón No estudiado
- Mujer No estudiada
- ◐ Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◑ Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 5

Registro: 175324.

Edad: 6 meses.

Procedencia: Veracruz.

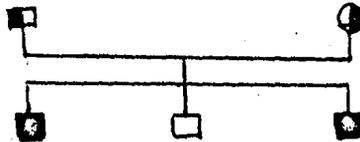
Biometría Hemática.

Hemoglobina 4.8 g.
 Hematocrito 16
 Leucocitos 19,200
 Reticulocitos 20.6%

Drepanocitos No se encontraron.
 Normoblastos 8%
 Basofilia Difusa No se observó

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.0%
Madre	+	1.5%
Paciente	+	2.0%
Hermano	+	1.0%
Hermano	-	1.0%



- Varón normal
- ◻ Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◐ Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- ◼ Varón homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 6

Registro: 230289

Edad: 2 años 6 meses.

Procedencia: Veracruz.

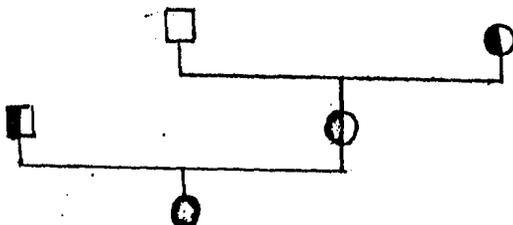
Biometría Hemática.

Hemoglobina 8.5 g
Hematocrito 26
Leucocitos 15,000
Reticulocitos 24.0

Drepanocitos No se encontraron
Normoblastos 2%
Basofilia Difusa +

Estudio Familiar

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.67%
Madre	+	2.0%
Paciente	+	1.8%
Abuela Materna	+	1.43%



- Varón No estudiado
- ◐ Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- ◑ Varón heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 7

Registro: 190593

Edad: 4 años.

Procedencia: Tabasco.

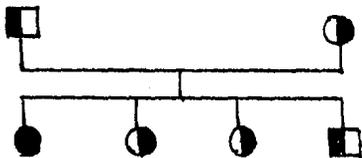
Biometría Hemática.

Hemoglobina 8.2 g
Hematocrito 23
Leucocitos 14,000
Reticulocitos 5.0%

Drepanocitos +
Normoblastos 30%
Basofilia Difusa ++

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.5%
Madre	+	1.0%
Paciente	+	2.3%
Hermana	+	1.0%
Hermana	+	1.0%
Hermano	+	1.7%



- Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◐ Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 8

Edad: 7 años.

Registro: 220454

Procedencia: Guerrero

Biometría Hemática.

Hemoglobina 5.6

Hematocrito 16

Leucocitos 15,500

Drepanocitos +++

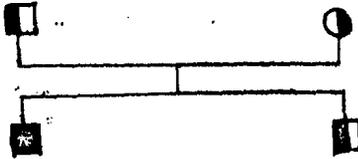
Reticulocitos 25.4%

Normoblastos 73%

Basofilia Difusa +++

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.4%
Madre	+	2.0%
Paciente	+	2.0%
Hermano	+	1.0%



- Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◻ Varón homocigoto para la Hb "S"
- Mujer heterocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 9

Registro: 193830

Edad: 2 años 5 meses

Procedencia: Guerrero

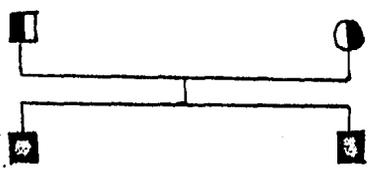
Biometría Hemática.

Hemoglobina 5.8 g
Hematocrito 15
Leucocitos 12,400

Drepanocitos No se encontraron
Reticulocitos 23.0
Normoblastos 9%
Basofilia Difusa ++

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.0%
Madre	+	1.0%
Paciente	+	2.0%
Hermano	+	1.5%



- ◻ Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◼ Varón homocigoto para la Hb "S"
- ◐ Mujer heterocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 10

Registro: 195475

Edad: 4 meses

Procedencia: Veracruz

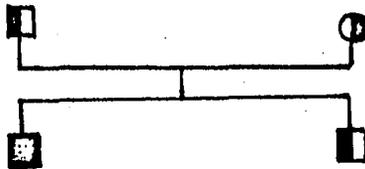
BIOMETRIA HEMATICA.

Hemoglobina 6.0%
Hematocrito 19
Leucocitos 8,700

Drepanocitos No se encontraron
Reticulocitos 5.1%
Basofilia Difusa No se observó

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.7%
Madre	+	2.0%
Paciente	+	2.0%
Hermano	-	1.7%



- ◻ Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◐ Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- ◼ Varón homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 11

Registro: 180237

Edad: 6 años.

Procedencia: Veracruz.

Biometría Hemática.

Hemoglobina 7.3
Hematocrito 22

Leucocitos 17,500
Reticulocitos 14.8
Normoblastos 49%
Basofilia difusa ++

Estudio Familiar:

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.0%
Madre	+	1.0%
Paciente	+	1.9%
Hermano	+	1.4%



- ◻ Varón heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- ◼ Varón homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 12

Registro: 204918

Edad: 2 años 4 meses

Procedencia: Guerrero.

Biometría Hemática.

Hemoglobina 6.87 g
 Hematocrito 21
 Leucocitos 16,700

Drepanocitos +
 Reticulocitos 8.0%
 Normoblastos No se encontraron
 Basofilia difusa No se observó

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb. Fetal
Padre	+	1.0%
Madre	+	1.0%
Paciente	+	1.0%



- ◻ Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◐ Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 13

Edad: 10 años

Registro: 215614.

Procedencia: Guerrero

Biometría Hemática.

Hemoglobina 6.1 g
Hematocrito 19
Leucocitos 31,100

Drepanocitos +++
Reticulocitos 21.6%
Normoblastos 7%
Basofilia difusa ++

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.5%
Madre	+	1.0%
Paciente	+	2.0%



- Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◐ Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 14

Registro: 196134.

Edad: 12 años.

Procedencia: Veracruz.

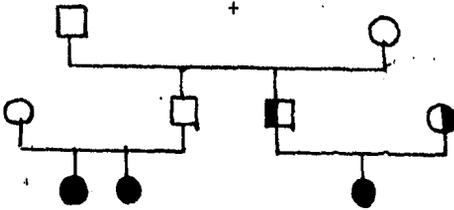
Biometría Hemática.

Hemoglobina 8.6
Hematocrito 26
Leucocitos 17,100
Reticulocitos 4.0%

Drepanocitos ++
Normoblastos 2%
Basofilia Difusa No se encontró

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	2.0%
Madre	+	2.0%
Paciente	+	1.8%
Primas	+	2.0%
Primas	+	2.0%



- Varón heterocigoto para la Hb "S"
- ◐ Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer homocigoto para la Hb "S"

FAMILIA No. 15

Edad: 8 años.

Registro: 16497

Procedencia: Oaxaca.

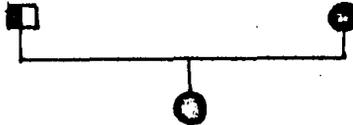
Biometría Hemática:

Hemoglobina 4.9 g.
Hematocrito 16
Leucocitos 13,000

Drepanocitos: No se encontraron
Normoblastos 4%
Basofilia difusa No se encontró

Estudio Familiar.

	Met. de Sodio	Hb Fetal
Padre	+	1.7%
Madre	+	2.0%
Paciente	+	1.9%



- Varón heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer heterocigoto para la Hb "S"
- Mujer homocigoto para la Hb "S"

B I B L I O G R A F I A

1. WONG, J.H.: Hemoglobin studies II A syntetic material -- with hemoglobin like property. J Am Chem Soc 80: 3168-3169, 1958.
2. PERUTZ, M.F., KENDREW, J.C.L., y WATSON, H.C.: Structure and function of haemoglobin II. Some relation betwen poli peptide chain configuration and aminoacid sequence. J Mol Biology 13:669-678, 1975.
3. KAUZMAN, W.: Some factors in the interpretation of protein denaturation. Adv Protein Chem 14:1-63, 1959.
4. HEWITH, J.A., KILMARTIN, J.V., FEN FIJU, L.F.S., y PERUTZ, M.F.: Non cooperativity of the alpha-beta dimer in the - reaction of hemoglobina with oxygen. Proceeding of the - National Academy of Sciences 69:203-207, 1972.
5. ARNONE: X-ray diffraction study of binding of 3,3 diphosphoglycerato to human deoxyhemoglobin. Nature 237: 146-149, 1972.
6. ROMERO-HERRERA, A.E., LEHMANN, A., JOYSEY, K.A., y FRIDAY, A.E.: Molecular evolution of myoglobin and the fossil record. Nature 246:289-395, 1973.
7. PAULING, L., ITANO, H.A., SINGIS, S.J., and WELLS, I.C.: Sickle Cell Anaemia. Molecular Disease. Science 110: -- 543, 1949.
8. INGRAM, V.M.: Abnormal human Haemoglobins. The comparison of normal and human Sickle cell Haemoglobins by "F printing" Biochim Biophys Acta 28:539, 1958.

9. PERUTZ, M.F., and MITCHISON, J.M.: State of haemoglobina in Sickle cell anaemia. Nature 166:677-679, 1950.
10. STEFSON, C.A.Jr.: The state of Sickle erythrocytes. J Exp Med 123:341-346, 1966.
11. DOBLER, J., and BERTLES, J.F.: The physical state of hemoglobin in sickle cell anaemia erythrocytes in vivo. J Exp Med 127:711-716, 1969.
12. BERTLES, J.F., RABINOWITZ, R., and DOBLER, J.: Hemoglobin interaction: Modification of solid phase composition in - the sickling phenomenon. Science 169:375-377, 1970.
13. MAGDOFF FAIRCHILD, B., SWERDLOW, P.H. and BERTLES, J.F.: Intermolecular organization of deoxygenated sickle haemo--globin determined by X-ray diffraction. Nature 239:217-219, 1972.
14. FINCH, J.T., et al: Structure of sickled erythrocytes and of sickle cell hemoglobin fibers. Proceedings of the National Academy of Sciences 70:718-722, 1973.
15. WHITE, J.G., and HEAGAN, B.: Tubular polymers of normal human hemoglobin. Am J Pathol 59:101-113, 1970.
16. PERUTZ, M.F., LIQUORI, A.M. and EIRICH, F.: X-ray and solubility studies of the hemoglobins of sickle cell anaemia patients. Nature 167:929-931, 1951.
17. CONLEY, L.L. et al: Hereditary persistence of fetal hemoglobin: A study of 79 affected persons in 15 negro families in Baltimore. Blood 21:261-281, 1963.
18. WILLIAMS, J. WILLIAMS et al: Hematologia II:420-441 Salvat Ed S.A. Barcelona, 1971.

19. ERLANDSON, M.E., SCHULMAN, I., and SMITH, C.H.: Studies on congenital hemolytic syndromes III. Rates of destruction and production of erythrocytes in sickle cell anemia. *Pediatrics* 25:629-644, 1960.
20. BELLINGHAM, A.J., and HUEHNS, E.R.: Compensation in hemolytic anaemias caused by abnormal haemoglobins. *Nature* 218:924-926, 1968.
21. FINCH, C.A.: Pathophysiologic aspects of sickle cell anemia. *Am J Med* 53:1-6, 1972.
22. PRINDLE, K.H. Jr., and McCURDY, P.R.: Red cell life span in hemoglobin C disorders. (With special reference) 1970.
23. MALAMAS, B. et al: Simultaneous radioactive tracer studies of erythropoiesis and red cell destruction in sickle cell disease and sickle cell thalassaemia. *Br J Haematologie* 9:487-498, 1963.
24. McCURDY, P.R.: 32 D.F.P. and 51 Cr for measurement of red cell life span in abnormal hemoglobin syndromes. *Blood* 32:214-224, 1969.
25. CROSBY, W.H.: The metabolism of hemoglobin and bile pigment in hemolytic disease. *Am J Am Med Assoc* 154:111-113, 1955
26. UPSHON, J.D. Jr., et al: Serum Benzidine-positive pigments in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 62:950-960, 1963.
27. SMITHS, H.L., OSKI, F.A. and BRODY, J.I.: The hemolytic crisis of sickle cell disease: The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Pediatrics* 74:544-551, 1969.

28. LEWIS, R.A., KAY, R.W., and HATHORN, M.: Sickle cell disease and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Haematologica* 36:399-411, 1966.
29. FINCH, C.A., and LENFANT, C.: Oxygen transport in man. *N Eng J Med* 288:407-415, 1972.
30. SEAKINS, M., et al: Erythrocyte Hb-S concentration. An important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 52:422-432, 1973.
31. MAY, A. et al: Effect of cyanate on sickling. *J Clin Invest* 53:3161-3171, 1972.
32. LEHMANN, A. and HUNTSMAN, R.G.: *Man's Haemoglobins*. Amsterdam: North Holland, 1966.
33. HERRICK, J.B.: Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med* 6:517-521, 1910.
34. MARGOLIES, M.P.: Sickle cell anemia. A composite study and survey. *Medicine* 30:357-443, 1951.
35. LAMBOTTE-LEGRAND, J., and LAMBOTTE-LEGRANDE C.: Anemie drepanocytaire et homozeotisms (a props de 300 cas). *Annales Soc Belge Med Trop* 35:47-51, 1955.
36. SIDENSTRICKER, V.P., KEMP, J.A., and METTE, J.C.: Prolonged survival in sickle cell disease. *J Clin Invest* 31:406-411, 1962.
37. PERRINE et al: Benign sickle cell anaemia. *Lancet* 11: 1163-1167, 1972.

38. BERNARD, G.R., ASHCROFT, M.T.: Delayed skeletal maturation in sickle cell anemia in Jamaica. *Br J Haematol* 24: 491-501, 1973.
39. CABANNES, R., SENDRAI, A., BOULOOX, C. and CARLES-TROCHAIN, E.: Study of hemoglobins in a population of Yucatan. *Acta Haematol* 45:469, 1971.
40. AGUIRRE-BELTRAN, G.: La población negra de México. *Fuente Cultural de México*, 1946.
41. LISKER, R., LORIA, A., GONZALEZ-LLAVEN, J., GULTMAN, S., et RUIZ-REYES, G.: Note préliminaire sus la fréquence - des hemoglobines anormales et de la déficience en glucose -6-phosphate dehydrogénese dans la population mexicana. *Rev Franc d'etudes Clin Biol* 1:76, 1967.
42. LISKER, R., LORIA, A. and CORDOVA, M.D.: Studies on several genetic hematological traits of the mexican population VIII Hemoglobin S, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other characteristics in a malarial region. *Am J Hum Genet* 17:179, 1965.
43. SMITH, S.M.: Appendix to notes on sickle cell polymorphism. *Ann Hum Genet* 19:51, 1954.
44. GAMBOA, I., GUERRERO, R., GONZALEZ, R. y cols.: Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal y otras anomalías de la hemoglobina en La Sabana, Guerrero. *Memoorias de la XVIII Jornada Anual de la Agrupación Mexicana para el estudio de la Hematología*, 1977.
45. LISKER, R , :
Estructura Genética De La Población Mexicana.
Salvat, Editores.
México , 1981.

46. ITANO, H.A., and PAULING, L.: A rapid diagnostic test for Sickle cell anemia. Blood 4:66, 1949.
47. SINGER, K., CHERNOFF, A.I., and SINGER.: Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. Blood 6:413-428, 1951.
48. SMITHIES, O.: An improved procedure of electrophoresis: Further variation in the serum proteins of normal individuals. Bioch J 61:629-641, 1959.