16
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

"HEMOGLOBINOPATIAS: COMPLICACIONES Y PRUEBAS DIAGNOSTICAS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ANTONIO ESPARZA CONDE

ASESOR: Q.F.B IDALIA AVILA MIYAZAWA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 esta 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodriguez Caballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Hemoglobinopatías: "Complicaciones y Pruebas Diagnósticas"

que presenta el pasante: Antonio Esparza Conde

con número de cuenta: 8352424-8 para obtener el TITULO de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 1º de abril de 199 7

PRESIDENTE	Q.F.B. Ramón Mendejas Ramírez	
VOCAL	Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa	
SECRETARIO	M. en C. Francisco López Mejía	
PRIMER SUPLENTE	Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega	
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Rene Damián Santos	

UAE/DEP/VAP/02

INDICE

Hoja

INTRODUCCION 4

OBJETIVOS 11

CAPITULO I
GENERALIDADES 12
Hemoglobina 12
Estructura de la hemoglobina 14
Quimica de la hemoglobina 17
Funciones de la hemoglobina 21
Catabolismo de la hemoglobina 22
Metabolismo del hierro 27

CAPITULO II
CLASIFICACION DE LAS HEMOGLOBINOPATIAS 30

CAPITULO III
HEMOGLOBINOPATIAS CLINICAMENTE IMPORTANTES 33
Hemoglobina S (HbS) 33
Descripciòn 33
Complicaciones 36
Manifestaciones sanguineas 37
Manifestaciones vasculares 39
Manifestaciones gentourinarias 40
Manifestaciones gastrointestinales 41
Manifestaciones neuronales 46
Manifestaciones oftàlmicas 48
Manifestaciones auditivas 49
Manifestaciones òseas 49
Manifestaciones en recién nacidos 51
Otras manifestaciones 51
Hemoglobina C (HbC) 53
Descripciòn 53
Complicaciones 55
Manifestaciones auditivas 55
Otras manifestaciones 56
Hemoglobina M (HbM) 57
Descripciòn 57
Complicaciones 58
Otras hemoglobinas anormales 60
Hemoglobinas D y G 61
Hemoglobina de Saint Nazarie 62
Hemoglobina Rothschild 63
Hemoglobina Questembert 64
Hemoglobina Altdorf 64
Hemoglobinas diversas 65
Talasemia (Hemoglobinas H y E) 67

Descripción 68
Talasemia Mayor 69
Talasemia Intermedia 71
Talasemia Menor 73
Hemoglobina H (HbH) 74
Hemoglobina E (HbE) 76
Complicaciones 79
Manifestaciones cutáneas 79
Manifestaciones cardiacas 80
Manifestaciones hepáticas, esplénicas y renales 81
Manifestaciones nerviosas 82
Manifestaciones oftálmicas 83
Manifestaciones óseas 83
Manifestaciones fetales 85
Otras manifestaciones 85

CAPITULO IV
PRUEBAS DIAGNOSTICAS 88
Drepanocitosis (HbS) 89
Talasemia mayor 94
Talasemia menor 100
Talasemia intermedia 104
Hemoglobina SC 107
Hemoglobina D 108
Hemoglobina G 108
Hemoglobina M 109

CAPITULO V
TECNICAS DE RUTINA 111
Identificación de Hemoglobinas anormales 111
Muestras de sangre (colección y preparación) ... 113
Método para el reactivo hemolisante 114
Electroforesis en acetato de celulosa 116
Electroforesis en agar de citrato 123
Electroforesis de la cadena de globina 129
Electroforesis a pH neutral para la hemoglobina H y la hemoglobina de Bart 134
Prueba de solubilidad para hemoglobinas "falciformes" 138
Cuantificación de hemoglobina A_2 141
Cuantificación por elución de acetato de celulosa 141

CAPITULO VI
TECNICAS DE PUNTA 150
Reacción en cadena de la polimerasa 150
La técnica 151
Creación de cebadores 153
Análisis del ADN ampliado 154
Preparación y mapeo del ADN 155
Reacción en cadena de la polimerasa 156
Investigación de oligonucleótido alelo-específico 157

Cromatografía líquida de alta eficiencia y espectrometría de masas por electrospray 159
Perfil de la hemoglobina 163
Gradiente de pH inmovilizado 164

RESUMEN 166

BIBLIOGRAFIA 171

INTRODUCCIÓN

En años recientes, se ha visto que ciertas anemias hemolíticas con frecuencia se acompañan, por causas genéticas, de la presencia de hemoglobinas anormales (que son la base del padecimiento). Estas anomalías se heredan siguiendo las leyes de Mendel. Las hemoglobinopatías se designan con las letras del alfabeto, de A hasta N (excepto B), y O, P, Q y S. Las variantes se indican con otra letra a manera de subíndice, por ejemplo, M_B significa hemoglobina M aislada en Boston. Cuando se ha identificado la cadena polipeptídica anormal, se puede escribir, por ejemplo, G_{alfa} refiriéndose a una hemoglobina G cuya anomalía reside en la cadena alfa. Si se identifican varias hemoglobinas anormales en un mismo enfermo, se puede indicar el fenotipo mencionando las hemoglobinas en orden de concentración decreciente: por ejemplo, SF (que es el caso de la anemia falciforme).[102,103]

Se han descrito más de 100 hemoglobinopatías anormales, pero han sido pocas las asociadas con alguna enfermedad clínica.

Las talasemias son los desórdenes genéticos más comunes en el hombre, y en la última década la epidemiología molecular de estos defectos han sido estudiados en detalle. Después de haber revisado la gran diversidad de mutaciones, se han definido cuatro regiones en el mundo que las presentan con mayor significancia.

Las talasemias, de las cuales la HbE es una de ellas, son más frecuentes en Asia, donde trabajos recientes han definido las bases moleculares de las α-talasemias y la frecuencia de los varios tipos de talasemia alfa+ y alfa 0. Las poblaciones oceánicas tienen un grupo de variantes genéticas de globina marcadamente diferentes a aquellas del sureste asiático. Se conoce mucho acerca de la naturaleza y frecuencia de las mutaciones talasémicas en los países mediterráneos, donde los programas de diagnóstico de nuevos casos han sido muy exitosos en reducir la frecuencia de nuevos casos de talasemia mayor. La talasemia alfa+ es la hemoglobinopatía más común en la región africana de Sahara, y los estudios moleculares de negros estadounidenses con beta-talasemia han elucidado las probables bases moleculares de las formas poco severas de estos desórdenes en los africanos. A pesar de que cada región geográfica tiene su propio grupo común de mutaciones α-talasémicas, con pequeñas superposiciones, la mayoría de ellas parecen tener un origen único. La cuestión de que los orígenes de la HbE sean únicos o múltiples, no está resuelta. Los eventos de recombinación que producen supresiones de talasemia alfa+ son frecuentes, mientras que la alfa-0-talasemia es producida por una variedad de supresiones importantes, cada una de las cuales ha tenido un origen único. Existe evidencia de que la selección natural del *P. falciparum malaria* es la causa primaria de la alta frecuencia de las talasemias a lo largo de los trópicos y subtrópicos. Mientras que el mecanismo de protección permanece confuso, la evidencia epidemiológica apoya fuertemente esta hipótesis, pero se requiere

mas información de los estudios de los casos control sobre la cantidad de protección que proporcionan los diferentes genotipos de talasemia.[34]

El estudio de los desórdenes de la hemoglobina, han sido muy amplios, dada la importancia orgánica que esta substancia implica. Estos estudios se centran básicamente en la identificación de hemoglobinas anormales que tienen importancia clínica, por medio de diagnóstico por laboratorio, así como mediante nuevas técnicas de identificación genética.

Las complicaciones de estas anormalidades genéticas, son de un estudio interesante, debido a que es muy factible identificar, o cuando menos sospechar, la existencia de una alteración de este tipo, basándose en el tipo de alteraciones sistémicas que pueda presentar un paciente.[42,50,52]

Los tipos de complicaciones que pueden presentar las diferentes hemoglobinopatías es muy vasto, dado de afectan diversas regiones del organismo. De manera general se pueden identificar complicaciones de los sistemas nervioso central, vascular periférico, óseo y auditivo; también se presentan complicaciones en órganos específicos como los ojos, piel, riñón, bazo, pulmón y corazón.[56,78]

Se ha detectado que las hemoglobinas anormales que tienen importancia clínica son las hemoglobinas S, C, D, H y M incluyendo también a las talasemias. Todas las hemoglobinopatías obedecen a las leyes genéticas, y se identifican por técnicas similares. Cuando un gen anormal que proviene de uno de los

padres obliga a la producción de hemoglobina anormal, o sea, cuando un sujeto es heterocigoto, se tiene en teoría la mitad de la hemoglobina anormal y la otra mitad normal. Si se heredan de ambos padres genes anormales idénticos, el sujeto es homocigoto, y casi toda la hemoglobina es anormal. es muy posible que se hereden dos hemoglobinas anormales distintas, una de cada progenitor, de manera que el paciente presenta dos hemoglobinas anormales distintas, y una pequeña cantidad de hemoglobina normal.[47]

Los genes de la globina conforman dos grupos, el grupo beta en el cromosoma 11, y el grupo alfa en el cromosoma 16. El término genético de "ligado" es usado para genes que están al final de un cromosoma, tales como los genes de la globina de cada grupo. Por ejemplo, los genes beta y gamma del grupo de la beta-globina, son ligados. Por otro lado, se dice que los genes del grupo beta son "desligados", porque están en diferentes cromosomas. Cuando varios genes pueden ocupar un locus genético específico, son denominados "alelos" de uno y otro. Por ejemplo, la mutación de la hemoglobina S que afecta al gen de la beta-globina, es alelo del gen normal de la beta-globina que produce la hemoglobina A. De manera similar, si dos mutaciones diferentes afectan al mismo gen, los genes mutantes son alélicos. Por ejemplo, las mutaciones de la hemoglobina S y de la hemoglobina C son mutantes del gen beta y son alelos el uno del otro.[122]

De manera muy general, el diagnóstico de laboratorio se basa en las siguientes pruebas, después de la demostración del estado hemolítico:

Frotis de sangre. Muestra alteraciones características en caso de presencia de HbS (enfermedad grave); pero son comunes las células blanco y la hipocromasia. (Las células falciformes se identifican fácilmente en cortes histológicos fijados en formol).

Fragilidad osmótica. En la mayor parte de hemoglobinopatías, se observa una mayor resistencia, por el menor espesor medio de los eritrocitos.

Electroforesis de hemoglobina. Es satisfactoria la electroforesis en papel, pero resulta mejor la base de gel de agar.

Prueba de desnaturalización por álcalis. Esta prueba se utiliza para medir la HbF.

Estas pruebas, pueden demostrar la presencia de una hemoglobinopatía, pero no diferenciar de que tipo de hemoglobina se trata, y por los tanto, podemos considerarlas como pruebas muy generales.[2,4,14,111,117,119,120]

Es importante estudiar los padres del enfermo, para confirmar el diagnóstico; de ser posible se estudiará simultáneamente a toda la familia. Es inútil este estudio familiar en cualquier anemia hemolítica congénita, ya que, evidentemente, el origen de tal anemia sería diferente del factor hereditario.

La mayoria de las hemoglobinopatias que prevalecen el mundo son talasemias, que son anemias microciticas hereditarias. Cada año 100,000 niños, en todas partes del mundo, nacen con talasemia mayor, una fatal enfermedad sanguinea. La talasemia menor es el estado portador de esta grave enfermedad. Los profesionales de la salud pueden fácilmente identificar a pacientes que pueden tener talasemia menor a través de una evaluación de rutina de los indices eritrocitarios, y el diagnóstico puede ser confirmado mediante la determinación de HbA_2. Una vez conocidos a los individuos que tienen talasemia menor, se puede evitar un innecesario tratamiento de por vida. La educación de los pacientes podria también incluir información acerca del asesoramiento de la preconcepción y una búsqueda asociada. El reconocimiento del potencial para las enfermedades congénitas y la subsecuente búsqueda o referencia son las responsabilidades de todos los profesionales de la salud que ven pacientes antes y durante sus años reproductivos.[3,7]

El diagnóstico de las diferentes hemoglobinopatias mediante las técnicas rutinarias de laboratorio, no han variado de manera significativa en los últimos años, sin embargo la instrumentación de dichas técnicas ha tenido un avance importante, gracias a las nuevas tecnologias aplicadas a la investigación médica.

En estos últimos años, el diagnóstico y la consideración de las personas afectadas de enfermedades genéticas han experimentado un cambio enorme. Hace algunas décadas, sólo podia basarse en la interpretación de los síntomas para establecer un

diagnóstico. Frecuentemente se, trataba de la presencia de células anormales, visibles en microscopia óptica. De este modo, se descubrió que individuos de raza negra afectados por episodios agudos de ataques cardiacos poseian glóbulos rojos en forma de hoz: de ahi el nombre de anemia de células falciformes (drepanocitosis) que se da a su afección. Paralelamente a los progresos de la bioquímica, algunas de estas enfermedades celulares pudieron explicarse por la existencia de anomalias en ciertas proteinas. Así, los químicos L. Pauling y V. Ingram demostraron en 1949 que la drepanocitosis se debe a una forma de hemoglobina anormal (hemoglobina S), incapaz de fijar correctamente el oxígeno.[104]

Fuera del ámbito netamente bioquímico, nos encontramos ahora con diagnósticos basado en el empleo de técnicas genéticas que nos permiten identificar y diagnosticar de manera eficaz, rápida y confiable, los desórdenes moleculares que se traducen en enfermedades difícilmente detectables mediante las técnicas ordinarias de laboratorio.

OBJETIVOS

- Determinar las diferentes complicaciones sistémicas que se relacionan, ya sea directa o indirectamente, con las manifestaciones clinicas de los diferentes tipos de hemoglobinopatias.

- Establecer las implicaciones diagnósticas de estas complicaciones en las hemoglobinopatias de diversa índole.

- Actualización bibliográfica de los avances más recientes en la investigación diagnóstica de los diferentes tipos de hemoglobinopatias.

GENERALIDADES

HEMOGLOBINA

El eritrocito es un transportador químico muy eficaz del comburente básico (oxígeno) y de uno de los productos finales de la combustión (CO_2). Su membrana presenta una semipermeabilidad dinámica, y mantiene dentro del eritrocito, una concentración elevada de potasio, no dejando entrar al sodio; en cambio no ofrece ningún obstáculo al paso de los iones hidrógeno, cloruro y bicarbonato en ambos sentidos, en función del gradiente iónico.[102]

La hemoglobina se forma en el eritrocito en desarrollo, dentro de la médula ósea. La formación más rápida ocurre en el hematíe de clase III (normoblasto policromatófilo), cuando se produce el 80% aproximadamente de la hemoglobina que llevará el glóbulo maduro. Aunque puede formarse hemoglobina en el reticulocito y, en circunstancias especiales, en el eritrocito no reticulado y no maduro; en circunstancias normales su formación sólo tiene lugar en los normoblastos en desarrollo dentro de la médula ósea.[103,106]

La concentración de la hemoglobina en la sangre presenta un equilibrio en la producción y destrucción de moléculas de hemoglobina. En la persona normal el contenido hemoglobínico es constante, por cuanto producción y destrucción están perfectamente equilibradas.

La cantidad real de hemoglobina total puede determinarse multiplicando la concentración de hemoglobina por el volumen de sangre. Si la concentración de hemoglobina es de 15g/100ml (el promedio para el hombre es de 16.3g; para la mujer de 14.5g), y el volumen total de sangre de aproximadamente 5 litros, la cantidad total de hemoglobina se calcula como sigue:

Hb_{total} = concentración de Hb (g/ml) X volumen sanguíneo (ml)

Hb_{total} = 0.15 x 5000 = 750g de Hb

La vida de la molécula de hemoglobina es de aproximadamente 120 días; su destrucción coincide con la del eritrocito. Si la cantidad total de hemoglobina que hay en el cuerpo en un momento dado es de 750g, y la duración de la vida del eritrocito es de 120 días, la cantidad de hemoglobina formada cada día es entonces de 6.25g. En caso de esfuerzo máximo, por ejemplo, si existe una enfermedad hemolítica, se ha calculado que la producción de hemoglobina puede llegar a ser de 40g/día.

Cuando se compensa una hemólisis excesiva, hay destrucción aumentada de eritrocitos sin producción de anemia. Generalmente se considera que el incremento en la producción de eritrocitos y de hemoglobina ocurre aumentando la masa de precursores eritroides, más que aumentando la rapidez de maduración de cada eritrocito, aunque este último proceso no ha sido completamente excluido como factor contribuyente.

Si la destrucción de eritrocitos excede del esfuerzo máximo de la médula, se produce anemia. La anemia se estabiliza cuando la

producción de eritrocitos y la destrucción de los mismos ocurre en proporción constante. Aunque los valores hallados para hemoglobina y eritrocitos no sean normales, no disminuyen progresivamente a menos que la duración de la vida del eritrocito se acorte, o que exista interferencia en la actividad de la médula. La duración de la vida del eritrocito es menor que la que puede compensar una actividad máxima de la médula; en circunstancias usuales el valor subnormal de hemoglobina se estabiliza en una cifra que depende de la duración de la vida del eritrocito y del rendimiento medular máximo.[103]

ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina, es una hemoproteina. La parte protéica se denomina globina; es incolora y consta de cuatro cadenas peptidicas formando asas complicadas. En la molécula de hemoglobina, el grupo hem está rodeado por dos pares de cadenas polipeptidicas. La hemoglobina normal del adulto (HbA_1) tiene dos pares de cadenas alfa y beta. La cadena alfa posee 141 aminoácidos empezando, dicha cadena, con valina y terminando con arginina. La cadena beta posee 146 aminoácidos; también hay valina en un extremo, pero termina con histidina en el otro. En el adulto existe además una pequeña cantidad de hemoglobina fetal (HbF) en la cual las dos beta son substituidas por cadenas gamma. La cantidad de HbF es normalmente alta en la infancia y aumenta en ciertos estados patológicos. Otro componente secundario de la hemoglobina del adulto es HbA_2, en la cual las cadenas beta son substituidas por cadenas delta.[102]

Si el orden de los aminoácidos en la cadena peptídica difiere de las variedades alfa o beta habituales, o si deja de formarse una cadena, o se produce una recombinación anómala, se producen hemoglobinas anormales; existe otra variedad, todavía mal conocida, pero distinta de las mencionadas. Las cadenas peptídicas adoptan una disposición helicoidal, lo que le da a la molécula una estructura esferoide. Se unen a las cadenas peptídicas cuatro grupos ferroporfirínicos (hem). El enlace entre hem y cadena peptídica se debe a la histidina cuyo grupo imidazol desempeña un papel fundamental en la amortiguación iónica. El hem, a su vez, es una porfirina de hierro, o sea, un compuesto cíclico formado por cuatro anillos pirrólicos enlazados por puentes =CH, y unidos al hierro por átomos de Nitrógeno. La hemoglobina resultante es aproximadamente esférica (elipsoidal).

La estructura de la hemoglobina puede ser dividida en cuatro categorías. (1) La <u>estructura primaria</u> es la composición de aminoácidos y la secuencia de las cadenas de polipéptidos. (2) La <u>estructura secundaria</u> son las áreas helicoidales alfa de la cadena de polipéptidos en un espacio tridimensional. (3) La <u>estructura terciaria</u> es la relación espacial de las áreas helicoidales alfa en la molécula plegada. (4) La <u>estructura cuaternaria</u> es la apropiada (la estructura funcional), en la que quedan establecidos los puntos de contacto y las posiciones relativas de las cuatro cadenas de polipéptidos que constituyen la molécula de hemoglobina.[122]

En la investigación para determinar con mayor certeza los componentes de la hemoglobina, TJ Shen y colaboradores, han

construido un plásmido (pHE_2) en el cual los genes humanos sintéticos de las globinas alfa y beta, y el gen de la aminopeptidasa de la metionina de la Escherichia coli, son expresados bajo el control de promotores "tac" —promotores de tactoides— separados. Las hemoglobinas fueron expresadas en E. coli JM109 y purificada mediante una cromatografía líquida de proteína produciendo dos componentes principales, "a" y "b". La espectrometría de masas por electrospray, demuestra que por lo menos el 98% y cerca del 90% de los cambios expresados en las cadenas alfa y beta del componente "a", tienen, respectivamente, la masa esperada. El 10% restantes de la cadena beta en el componente "a" corresponde en masa a la cadena beta de la metionina positiva. En el componente "b", tanto la cadena alfa como la beta tienen las masas correctas sin la detección de la metionina N-terminal (menos del 2%). Estos resultados han sido confirmados por estudios de degradación Edman de la secuencia amino terminal de las cadenas alfa y beta de estos dos recombinantes de la hemoglobina (rHb). Los rHbs de los componentes "a" y "b" exhibieron un espectro óptico visible idéntico al de la hemoglobina normal del adulto (HbA). El componente "a" y la HbA tienen propiedades muy similares de afinidad por el oxígeno, pero el componente "b" muestra alguna alteración a este respecto, especialmente a valores bajos de pH. El espectro de IH-NMR del componente "a" y el de la HbA son esencialmente idénticos, mientras el del componente "b" exhibe una alteración en el anillo a nivel del protón de resonancia en las traslaciones hiperfina y normal, indicando alteraciones en la

conformación del hem en la cadena beta. Esta alteración en los patrones de resonancia pueden ser cambiados a aquellos de la HbA convirtiendo el componente "b" al estado férrico y luego al estado deoxy y regresándolo, finalmente, a la forma carbomonoxy o bien, a la forma oxy.[107]

El peso molecular de la hemoglobina difiere según los resultados obtenidos por diferentes investigadores, siendo 68000, 66700 y 64450 los valores más comunmente aceptados. La molécula de hem es uno de los productos finales del anabolismo de las porfirinas durante el cual se construye la complicada estructura a partir de substancias relativamente simples, fundamentalmente succinilcoenzima-A y glicina.

Se conocen muchas alteraciones patológicas debidas a deficiencia de alguna etapa de esta complicada síntesis; pero sólo dos tienen importancia hematológica, porque dan lugar a síntesis anormal en el eritrocito o sus precursores.[102]

QUIMICA DE LA HEMOGLOBINA

El orden en que están colocados los aminoácidos que forman las cadenas peptídicas alfa y beta, se hallan bajo control genético, y su síntesis tiene lugar en la etapa temprana del desarrollo del normoblasto. Se ha comprobado la importancia de una organización adecuada de los aminoácidos durante la síntesis de tales proteínas comparando la estructura molecular de la hemoglobina normal con la obtenida de pacientes que sufren hemoglobinopatías diversas.[103]

De las 30 porciones peptídicas que, aproximadamente, se obtienen de la hemoglobina por digestión triptica y mediante calor, utilizando electroforesis y cromatografía, sólo un péptido de la hemoglobina de la célula falciforme difiere del normal. Los análisis del péptido anormal revelan que un residuo de ácido glutámico ha sido substituido por valina. Un estudio similar efectuado con la hemoglobina C indicó que el mismo péptido era anormal, pero en este caso el ácido glutámico había sido substituido por lisina. En ambos casos el péptido anormal era un componente de la cadena peptídica beta. Investigaciones ulteriores de las hemoglobinas E, D e I demostraron substituciones similares de aminoácidos en otros péptidos de las cadenas alfa y beta. Estos estudios revelan que la simple variación de un sólo aminoácido entre 300 de la mitad de la molécula de hemoglobina puede ser la diferencia entre estado de salud, invalidez moderada, y enfermedad mortal.[103]

La estructura química de los dos genes que parecen intervenir en la producción de hemoglobina es la que determina la sucesión de aminoácidos en las cadenas peptídicas. Cualquier alteración de la estructura química de los genes, a su vez, alteraría la sucesión de aminoácidos en la molécula de hemoglobina. Como los genes son macromoléculas que se autoduplican, cualquier anomalía estructural se transmitiría de una generación a la siguiente. Que el efecto de tal anormalidad sea o no clínicamente importante, parece depender de la porción de la cadena peptídica afectada.

La molécula de hemoglobina contiene cuatro grupos hem. Las enzimas necesarias para las etapas iniciales y terminales de la

síntesis del hem se hallan en las mitocondrias, mientras que las necesarias para las etapas intermedias se encuentran en el citoplasma. La síntesis de la forma tetramérica final de la hemoglobina se produce en el citoplasma. Los polirribosomas sintetizan cadenas alfa de la globina, reacción cuya rapidez depende de la presencia de cadenas alfa libres, y liberan espontáneamente estas cadenas. Las cadenas alfa libres parecen unirse a las cadenas beta cuando todavía se encuentran sobre los polirribosomas, pasando así al citoplasma subunidades alfa-beta libres. El hem abandona la mitocondria y se combina con cada cadena del dímero. Finalmente se juntan las dos subunidades alfa-beta para formar la tétrada de hemoglobina completa. El hem se adapta a una zona muy hidrófoba de la superficie de cada cadena de globina y se conserva en contacto con histidina y otros grupos químicos vecinos en dicho lugar gracias a fuerzas de van der Waal. El oxígeno es transportado a estos lugares en un ligando con el ion ferroso del hem y el residuo distal de la histidina.[103]

Como se mencionó anteriormente, el hem es una estructura porfirínica cíclica que contiene un átomo de hierro quelado, y se ha comprobado que forma parte de la estructura molecular de la mioglobina, los citocromos, la peroxidasa y la catalasa, igual que de la hemoglobina. Las porfirinas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran tanto en plantas como en animales, sirviendo a diversos procesos metabólicos vitales. Un ejemplo de los anterior lo tenemos en la clorofila, que siendo

esencial para la fotosintesis (y por lo tanto para la vida en la tierra), es un compuesto magnésico de porfirina.[102,106]

El hierro que se absorbe con los alimentos, asi como el que se libera al ser destruida la hemoglobina, se almacena como "ferritina", que es hidróxido de hierro unido a una proteina llamada apoferritina.

Cuando existe una destrucción local excesiva de sangre (en una contusión, por ejemplo), la cantidad de hierro liberada es mayor que la ferritina disponible y el exceso se deposita como gránulos microscópicos de "hemosiderina".

En los alimentos, el hierro se presenta, sobre todo, bajo la forma de sales férricas (principalmente $FeOH_3$), aunque se absorben con más facilidad los iones férricos. El HCl del estómago facilita la absorción de hierro, tal vez impidiendo la oxidación de sales ferrosas a férricas, pues se encuentran a veces anemias puras por deficiencia de hierro en hombres y mujeres que presentan aclorhidria absoluta.

El hierro se absorbe en el duodeno y las primeras porciones del intestino delgado. En la mucosa intestinal los iones ferrosos son oxidados a la forma férrica, que se une a la proteina apoferritina para formar ferritina. El hierro férrico circula en el plasma unido a la albúmina beta-1 llamada "transferritina", o "siderofilina", que suministra una capacidad de fijación de hierro de 300 a 350 microgramos por 100 ml de suero o plasma. El contenido normal de hierro es de 75 a 150 microgramos por 100 ml de suero.[102,106]

La globina debida al desdoblamiento de la hemoglobina se metaboliza hasta aminoácidos, que vuelven a la reserva general.

FUNCIONES DE LA HEMOGLOBINA

Las funciones de la hemoglobina son las siguientes: 1) transporte del oxigeno de los pulmones a los tejidos y del bióxido de carbono de los tejidos a los pulmones, y 2) participación en la regulación acido-básica eliminando CO_2 en los pulmones y amortiguando los cambios de pH por acción de los grupos histidinaimidazol de la hemoglobina.

En los pulmones, el oxigeno se difunde a través de las delgadas paredes de los alveolos y de los capilares, y es fijado en seguida por la hemoglobina reducida: $O_2 + Hb = HbO_2$. Al llegar la sangre a los tejidos, donde la tension de oxigeno es baja, la oxihemoglobina se disocia y el oxigeno difunde a las células tisulares. Al mismo tiempo, la tensión de CO_2 es alta en las células y el liquido que las rodea. Dentro de los eritrocitos, la anhidrasa carbónica acelera la reacción $CO_2 + H_2O \longrightarrow H_2CO_3 \longrightarrow H^+ + HCO_3^-$. La hemoglobina reducida (dado que acaba de ceder el oxigeno de los tejidos) tiene una acción amortiguadora muy potente y neutraliza los iones H^+ liberados en la reacción anterior. Los iones HCO_3^- salen de los glóbulos rojos y se unen al Na^+, mientras que los iones Cl^- del NaCl del plasma, difunden al eritrocito y compensan la pérdida de HCO_3^- ("intercambio de cloruros"). En esta forma, cerca del 70% del CO_2 producido en los tejidos, después de transformado en HCO_3^- por la anhidrasa carbonica en el eritrocito, es transportado en el plasma bajo la

forma de bicarbonato sin modificar el pH de la sangre. Además, un 20% del CO_2 es transportado bajo la forma de un compuesto con la hemoglobina reducida (carbohemoglobina). Cuando la sangre regresa a los pulmones, el proceso se invierte: la anhidrasa carbónica de los eritrocitos libera, del ácido carbónico ($H_2CO_3^-$), el CO_2 y el H_2O; para "alimentar" esta reacción, el HCO_3^- del plasma pasa a los eritrocitos, y los cloruros salen de ellos. La hemoglobina libera H^+; la carbohemoglobina se disocia; y la hemoglobina reducida ya puede volver a fijar oxígeno. Un gramo de hemoglobina se combina con 1.34 ml de O_2 aproximadamente (factor de Hüfner).[103,104]

CATABOLISMO DE LA HEMOGLOBINA

El eritrocito viejo probablemente se vuelva más esférico, disminuyendo su diámetro (microcito); también puede volverse irregular, y termina fragmentándose en pequeñas partículas. Estos fragmentos son recogidos por las células reticuloendoteliales de la pared de los sinusoides del bazo y del hígado. Dentro de estas células, el anillo del hem se abre, el hierro se separa y la globina es liberada. El residuo, que ya no contiene hierro ni proteína, es la biliverdina, que luego se reduce a bilirrubina. Este pigmento biliar es llevado por la sangre en combinación inestable con las proteínas del plasma (sobre todo albúmina). En las células del hígado la bilirrubina se separa de la proteína y se fija al ácido glucurónico, para formar el diglucurónido de bilirrubina hidrosoluble, que se excreta en la bilis. La bilirrubina en sí, así como el proteinato de bilirrubina, son

solubles en los lipidos y sus solventes, pero no en agua. Por lo tanto, son incapaces de unirse directamente con el ácido diazosulfanilico para formar el azocolorante rosa de la reacción de Van den Bergh. Para dar esta reacción, la bilirrubina primero debe ser puesta en solución alcohólica, conociéndose entonces como bilirrubina "indirecta". La bilirrubina normal del plasma, y las cantidades elevadas que contienen en los estados que se acompañan de destrucción excesiva de eritrocitos, por ejemplo, en las anemias hemoliticas, da reacción indirecta de Van den Bergh; por la misma razón (insolubilidad en agua), no se excreta bilis en la orina de pacientes con anemia hemolitica. Sin embargo, en la ictericia obstructiva, en la que las vias biliares están obstruidas, la bilirrubina atraviesa las células hepáticas, se transforma en glucurónido hidrosoluble y da la reacción directa de Van den Bergh; pero este cuerpo vuelve a ser absorbido a la sangre debido a la obstrucción de las vias biliares.

Profundizando un poco sobre todo lo anterior, podemos decir que la desintegración del hem a pigmentos biliares tiene lugar en la fracción microsómica de las células reticuloendoteliales. El hem primero se transforma en biliverdina por acción de una enzima microsómica, la oxigenasa del hem, liberando hierro. Esta es la etapa que limita el ritmo de la desintegración de la hemoglobina, y requiere oxigeno molecular y NADPH. El hierro es devuelto al fondo común ferruginoso y se utiliza de nuevo para formar hemoglobina.

La biliverdina se reduce luego a bilirrubina por otra enzima microsómica dependiente de NADPH, la reductasa de biliverdina.

La actividad de ambas enzimas es muy intensa en el bazo e hígado y puede ser inducida en otras células del sistema reticuloendotelial. En los macrófagos procedentes de animales de experimentación, la actividad enzimática puede mostrar adaptación reguladora en respuesta a la carga de sustrato. En la rata, se logró identificar las células hepáticas que fagocitan a los eritrocitos. Esta población celular especial guarda una buena correlación con el nivel de oxigenasa de hem en los microsomas. Los resultados de estos estudios parecen indicar que el hígado y el bazo cumplen funciones semejantes en la destrucción del eritrocito y el desdoblamiento de la hemoglobina. Luego la bilirrubina es liberada de las células reticuloendoteliales hacia el plasma, donde se fija a la albúmina y es transportada a las células parenquimatosas del hígado. Ahí en los microsomas hepáticos, se conjuga con ácido glucurónico y es eliminada con la bilis. Si el hígado no puede llevar a cabo adecuadamente tal conjugación, se produce una concentración elevada de bilirrubina "de acción indirecta" en la sangre. Si hay dificultad para la excreción de la forma conjugada por el sistema biliar, se produce en la sangre un aumento de bilirrubina de "acción directa". Que la bilirrubina proporcione reacción "directa" o "indirecta", depende —como se mencionó anteriormente— de la presencia o ausencia de conjugación con el ácido glucurónico. La enzima transferasa que existe en los microsomas de las células hepáticas, y el ácido uridín-difosfoglucurónico, son necesarios para que ocurra tal reacción. Se ha supuesto que el exceso de bilirrubina no conjugada que se descubre en el recién nacido

dependería de un desarrollo inadecuado del sistema de conjugación glucurónido.[102]

En el intestino, la acción de las bacterias sobre la bilirrubina origina productos de degradación de ésta que globalmente recibe el nombre de urobilinógeno fecal. Aproximadamente la mitad de dicho urobilinógeno es reabsorbida del intestino y vuelve a circular por la sangre para ser eliminada nuevamente por el hígado. Este es el origen del urobilinógeno en la bilis hepática, y de la pequeña cantidad del mismo que se pierde con la orina y recibe el nombre de urobilinógeno urinario. La excreción diaria normal de urobilinógeno urinario es de 0 a 3.5 mg.

La cantidad de urobilinógeno fecal en las heces, puede medirse y se comprobará que varía entre 40 y 280 mg/día. Como la cantidad de urobilinógeno fecal excretado depende de la cantidad de bilirrubina secretada por el hígado con la bilis, se ha utilizado como índice de desintegración de la hemoglobina. Sin embargo, la hemoglobina proveniente de los eritrocitos no es la única fuente de urobilinógeno, y la excreción de urobilinógeno fecal no siempre mide con exactitud la destrucción de eritrocitos. Estudiando la excreción de estercobilina, uno de los componentes del urobilinógeno fecal, se ha comprobado que hasta el 11% debe provenir de fuentes que no son la desintegración de eritrocitos maduros. No se sabe aún si ello representa la desintegración de células en desarrollo mientras se hallan todavía en la médula, o si depende de alguna vía de porfirina no hemoglobínica. En algunos estados patológicos la cantidad de estercobilina no

proveniente de hemoglobina se eleva hasta el 50%. Si se produce hemólisis intravascular la hemoglobina queda liberada, y rápidamente es fijada por la haptoglobina. Esta es una alfa-2-glucoproteina que se combina estequiométricamente con la hemoglobina formando un complejo estable. Como la concentración plasmática de haptoglobina es de 0.04 a 0.1 g por 100, unos 100 mg de hemoglobina son fijados por 100 ml de plasma. El complejo de haptoglobina-hemoglobina es demasiado voluminoso para ser filtrado por el riñón y no aparece en la orina. En el hígado, el hem y la hemoglobina abandonan el plasma, y son desdoblados por las células hepáticas, no por las células de Kupfer.

Cuando la hemólisis intravascular prosigue por largo tiempo, o la cantidad de hemoglobina libre es suficientemente grande, queda superada la capacidad de fijación de la haptoglobina plasmática y aparece hemoglobina libre en la orina. La hemoglobina libre es eliminada del plasma más rápidamente que el complejo de haptoglobina-hemoglobina. Aunque la permeabilidad del glomérulo para la hemoglobina libre es relativamente baja, resulta netamente mayor que para la albúmina y otras proteinas de peso molecular similar. Esto puede explicarse, en parte, por el hecho de que la hemoglobina tiende a disociarse en dimeros alfa-beta, y el pH y la concentración iónica fisiológicos del plasma. La gran masa de hemoglobina filtrada por el glomérulo en la mayor parte de trastornos clinicos con hemoglobina es reabsorbida por los túbulos proximales. Ahi se libera hierro que es reabsorbido hacia el plasma para ser utilizado de nuevo. La globina, de una parte, y la porfirina, de otra, son rápidamente catabolizadas y

utilizadas de nuevo. Asi pues, la célula tubular proximal se parece a la célula reticuloendotelial por su capacidad de conservar el hierro de la hemoglobina.

Por electroforesis se han identificado varios tipos de haptoglobina y su transmisión, se ha comprobado, es regida genéticamente. No se ha demostrado ninguna ventaja selectiva; todas tienen capacidades de fijación similares. La semidesintegración de la haptoglobina parece ser del orden de 5.4 dias. Se ha comprobado que la concentración de haptoglobina disminuye en todos los estados hemoliticos y en la enfermedad hepatocelular crónica. Está aumentada en el curso de infecciones agudas o crónicas y cuando hay destrucción o proliferación de tejidos.

METABOLISMO DEL HIERRO

El hierro férrico combinado con la apoferritina de las células de la mucosa, queda fijo (excepto en condiciones de hipoxia) y se pierde cuando éstas células se descaman. Probablemente, el hierro de la alimentación que se absorbe y pasa al plasma permanece en estado ferroso y puede formar complejos laxos con aminoácidos de donde es recogido por la transferrina del plasma para llegar hasta el hígado.

Normalmente, se absorbe del 7 al 10% de la alimentación; ésta representa un promedio de 1 mg al dia (limites, de 0.3 a 2 mg/dia).

La absorción aumenta cuando disminuyen las reservas de hierro del organismo o del plasma, de manera relativa o absoluta (por ejemplo, en las anemias por deficiencia de hierro, crecimiento, embarazo, lactancia, y los 3 a 6 días que siguen a la pérdida de sangre importante) o también en condiciones de hipoxia. En estos casos, parece aumentar la reducción del hierro férrico de la ferritina de la célula de la mucosa intestinal, a la forma ferrosa, que puede pasar a la sangre. La disminución resultante de hierro fijado en la célula de la mucosa significa más absorción de hierro de los alimentos. Este mecanismo podría intervenir en la anemia perniciosa, anemias hemolíticas y anemia rebelde acompañada de hiperplasia del eritrocito. Es todos estos casos puede haber una disminución de hemoglobina sin que, por esto, se reduzcan las reservas de hierro del plasma o del resto de la economía. También aumenta la absorción en la policitemia vera y la hemocromatosis primaria.

Las necesidades de hierro, son del orden de 1 mg/día en el adulto. La excreción urinaria representa aproximadamente 0.2 mg/día, y se pierden de 0.7 a 0.8 mg/día por descamación de células cutáneas y del tubo digestivo, por el sudor y por la bilis. Aparte de las necesidades básicas, se requieren de 0.8 a 1 mg/día suplementarios para el crecimiento, la menstruación y la lactancia. Durante la segunda mitad del embarazo, son necesarios de 2 a 3 mg más por día.

En el adulto normal, el hierro total es de 3.5 a 5 g. Entre 65 y 70% de esta cantidad se encuentra en la hemoglobina; de 20 a

25%, como hierro de reserva; 3% en la mioglobina; 1% en enzimas a base de hem y transferrina, y el resto en diversos lugares.

El hierro de reserva se divide en partes aproximadamente iguales entre la ferritina y la hemosiderina. La ferritina es una variedad finamente dispersa, formada por hidróxido férrico unido a una proteina especial, la apoferritina (P.M. 460000). La apoferritina contiene de 20 a 23% de hierro de fácil intercambio, que pasa a la forma ferrosa antes de unirse a la transferrina que lo transporta. Se piensa que la liberación masiva de ferritina, durante la anoxia que acompaña al schock, interviene en la aparición de choque irreversible. La hemosiderina es una variedad más burda de hierro de reserva, que se forma al perecer cuando el depósito de hierro sobrepasa la cantidad de apoferritina disponible. De acuerdo con esta hipótesis, la hemosiderina contiene de 25 a 33% de hierro. Este se intercambia lentamente y con dificultad. En las células reticuloendoteliales que la fagocitan, la hemosiderina es inofensiva; pero si llega a depositarse en células parenquimatosas o del estroma, produce lesiones celulares y fibrosis.[102,104,106]

CLASIFICACION DE LAS HEMOGLOBINOPATIAS

En el hombre, se han descrito más de 100 hemoglobinopatias anormales, pero han sido pocas las asociadas con alguna enfermedad clinica. Un autor (Heller) ha propuesto una clasificación de las hemoglobinopatias cuya base está dada por sus caracteristicas funcionales.[103] Tal clasificación es la siguiente:

Grupo 1. Hemoglobinas anormales sin alteraciones fisiológicas. Es el mayor grupo; estas hemoglobinas mutantes tienen interés genético y bioquimico, pero carecen de significancia clinica.

Grupo 2. Hemoglobinopatias "de agregación". Las hemoglobinopatias S y C se incluyen en este grupo; se producen cambios estructurales en el eritrocito al formarse tactoides de hemoglobina S y cristales de hemoglobina C.

Grupo 3. Sintesis "no equilibrada" de hemoglobinas. Este grupo está formado por los sindromes de talasemia en los cuales un tipo de cadena hemoglobinica es sintetizada en proporción mucho

mayor que otras cadenas hemoglobinicas; las cadenas en exceso precipitan como cuerpos de Heinz, tal es el caso de las hemoglobinas D, E y H.

Grupo 4. Hemoglobinas inestables.

Estas hemoglobinas, que suelen incluir una substitución de aminoácido en la región de fijación al hem, son sensibles a la desnaturalización oxidativa precipitando cuerpos de Heinz. A este grupo pertenecen las hemoglobinas Zurich, Colonia, Seattle y muchas más.

Grupo 5. Hemoglobinas con función hem anormal.

Este grupo incluye las hemoglobinas M que se acompañan de metahemoglobinemias; las hemoglobinas Chesapeake, Rainer y otras, que tienen gran afinidad por el oxigeno con policitemia compensadora; y la hemoglobina Kansas, y otras, que tienen afinidad disminuida por el oxigeno.

Hacia 1967, M. Wintrobe dividió las anormalidades en la sintesis de hemoglobina en tres grupos: 1) la producción de una molécula protéica anormal (por ejemplo, el caso de la anemia falciforme), la cual resulta usualmente de la substitución de un aminoácido en una de las cadenas polipeptidicas normales; 2) la reducción en el rango de la sintesis de proteinas normales, como

el observado en las talasemias; y 3) el desarrollo de anomalias tales como la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal.[122]

Al parecer, hasta la fecha, no se ha hecho un esfuerzo adicional por reclasificar las hemoglobinopatias, de tal modo que la clasificacion dada por Heller sigue siendo válida, al menos para tener una idea del tipo de hemoglobina que ha sido codificada de manera errónea.

HEMOGLOBINOPATIAS CLINICAMENTE IMPORTANTES (DESCRIPCION Y COMPLICACIONES ORGANICAS)

Las complicaciones que las diferentes hemoglobinopatias pueden originar, son de diferente consecuencia y dependen del tipo de alteración de que se trate. De este modo, existen complicaciones auditivas, oftálmicas y óseas, siendo estas últimas las más documentadas en investigaciones recientes. La Tabla 1 muestra la composición parcial de aminoácidos en la cadena beta humana normal y en algunas hemoglobinas con cadenas beta anormales.

En México, no existen datos estadisticos que avalen un porcentaje digno de credibilidad relacionado con la frecuencia de las anemias provocadas por los diferentes tipos de hemoglobinopatias.

HEMOGLOBINA S (HbS)

DESCRIPCION

En esta enfermedad, el defecto se sitúa en la cadena beta. En este caso, el ácido glutámico de la posición 6 es substituida por valina. En el sujeto homocigoto se encuentran las células falciformes caracteristicas cuando desciende la tensión de oxigeno de la sangre. Los frotis realizados en forma habitual muestran un número variable de células falciformes con células

TABLA 1. Composición parcial de aminoácidos en algunos tipos de hemoglobinas.[108]

Hemoglobina	Posiciones en la cadena beta de la hemoglobina									
	1	2	3	6	7	26	63	67	121	146
A (normal)	Val	His	Leu	Glu	Glu	Glu	His	Val	Glu	His
S				Val						
C				Lis						
$G_{San\ Jose}$					Gli					
E						Lis				
$M_{Saskatoon}$							Tir			
$M_{Milwaukee}$								Glu		
O_{Arabia}									Lis	

blanco, hipocromasia y poiquilocitosis. La hemoglobina mutada tiene la propiedad de polimerizar cuando se encuentra en concentración alta en los eritrocitos (sujetos homocigotos, con las dos copias del gen beta afectadas), y cuando está desoxigenada. Las macrofibras de la hemoglobina falciforme, consisten en hileras dobles, de cadenas dobles antiparalelas retorcidas alrededor de una partícula eje. Bajo condiciones apropiadas, las dos hileras externas pueden disociarse de la partícula eje. Estas estructuras retienen la torcedura helicoidal de la macrofibra origen y lentamente se disocian en monómeros en un periodo de varias horas. Los hilos dobles individuales no se han observado nunca, sugiriendo que únicamente los pares antiparalelos son energéticamente favorables.[110] La mutación S

crea contactos entre las moléculas de HbS desoxigenada, que polimerizan en largas fibras (cuerpos semicristalinos llamados "tactoides"). Estas fibras dan al eritrocito su forma característica en hoz (falciformación) y hacen que el interior de la célula sea muy viscoso cuando la concentración de oxígeno es débil. Se produce una alteración pronunciada e irreversible de los eritrocitos y estos son eliminados de la circulación. También pueden bloquear vasos pequeños y capilares, disminuyendo todavía más la tensión de oxígeno, creando de esta manera un círculo vicioso.[105]

En presencia del rasgo de células falciformes (heterocigotos), no se encuentran este tipo de eritrocitos en los frotis, pero si se reduce la tensión de oxígeno, hacen su aparición, aunque en menor número que en el homocigoto. La enfermedad es casi exclusiva de la raza negra.

Los estudios por electroforesis muestran que en el homocigoto, la HbS representa casi el total de la hemoglobina, siendo el resto de ella, HbF. En el heterocigoto, la HbS constituye el 50% o menos, en tanto que el resto es HbA. Los sujetos portadores del rasgo (heterocigotos) son asintomáticos. En el caso de anemia de células falciformes (homocigotos), se encuentra anemia, crisis hemolítica, úlceras en las piernas, dolores abdominales y muchos otros síntomas.

Cabe encontrar combinaciones de hemoglobina S con otras hemoglobina anormales, que incluyen, en orden de gravedad clínica decreciente, la talasemia y las hemoglobinas C, D, E y G. La

hemoglobina D presenta la misma movilidad electroforética que la HbS, pero se distingue de ésta por su mayor solubilidad.[102]

Existe un incremento en las evidencias que sugieren que la peroxidación de lípidos *in vivo* puede ser un factor importante en la anemia falciforme homocigota (HbSS). La vitamina E es el principal antioxidante liposoluble en plasma, y esta vitamina, así como el colesterol, es transportada -en plasma- casi exclusivamente por lipoproteínas. Los bajos niveles de vitamina E plasmática, están acompañados con bajos niveles de colesterol plasmático. Esto sugiere que los bajos niveles de esta vitamina en plasma en pacientes con anemia falciforme, pueden estar relacionados con el decremento de los niveles de acarreadores de lipoproteínas.[26]

COMPLICACIONES

El carácter de células falciformes y la anemia drepanocítica se han observado casi exclusivamente en la raza negra. La frecuencia del carácter semilunar varía según las diferentes partes del mundo.

La anemia de células falciformes se caracteriza por la aparición de síntomas en prácticamente todas partes del cuerpo; existe una amplia variación en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de células falciformes de un individuo afectado a otro. Muchos investigadores han buscado discernir parámetros que pudieran explicar esta variabilidad. Los parámetros clínicos medidos regularmente son el número de visitas al departamento de urgencias, la frecuencia de hospitalizaciones, niveles de

hemoglobina, cuenta de reticulocitos, edad y falla final orgánica (nefropatía, necrosis avascular de hueso, apoplejía, retinopatía, apoyo en hipoxemia después de síndrome de pecho agudo, úlceras en miembros inferiores, y priapismo con impotencia).[70] A veces estos síntomas son raros, y varían generalmente de un enfermo a otro, y según los momentos en un mismo paciente. Tal es el caso, por ejemplo, de una paciente a quien incidentalmente se le detectó pancitopenia, tras acudir a atención médica por una infección en el tracto urinario; a pesar de que su anemia fue catalogada como "normocítica normocrómica" por un contador electrónico de partículas, la evaluación de la pancitopenia confirmó la sospecha de anemia perniciosa, pudiendo esta estar asociada con cualquier otra hemoglobinopatía conocida.[53] La mayor parte de los enfermos con anemia drepanocítica, niños y adultos, siguen en estado ligero de enfermedad crónica, con valores estables de eritrocitos y bilirrubina sérica, pero casi todos ellos en algún momento presentan episodios de síntomas más graves, las denominadas "crisis".

Manifestaciones Sanguíneas

El tipo degenerativo de crisis hipoplásica, que se manifiesta por hipoplasia o aplasia de eritrocitos en la médula, disminución neta del número de reticulocitos en sangre circulante y anemia rápidamente creciente, suele observarse después de una infección bacteriana o viral y no se acompaña obligadamente de dolor. Existen, además, crisis aplásicas transitorias en pacientes con anemia falciforme, como lo demuestra un estudio realizado en

pacientes jóvenes (hasta de 18 años de edad) en los que se determinó la proporción de casos de este tipo de crisis debido a infección por parvovirus B19. El seguimiento de los estudios serológicos de la infección por este parvovirus fue completado en 8 pacientes. Se examinó el suero para determinar partículas de ADN viral de parvovirus B19 y anticuerpos específicos IgG e IgM anti-parvovirus B19. Las partículas de ADN viral del parvovirus B19 fueron detectados en 11 (21%) de 53 pacientes con crisis aplásica transitoria (TAC). Se detectaron anticuerpos específicos IgM en 34 (64%) de los 53 pacientes. En total, 36 (68%) de los 53 pacientes con TAC tuvieron evidencia de infección aguda por parvovirus B19 como lo demostró la detección de ADN de parvovirus y/o anticuerpos IgM específicos en la fase sérica aguda. El seguimiento de los estudios serológicos en 8 pacientes con infección aguda revelaron la desaparición de partículas de ADN viral de parvovirus B19 y de anticuerpos IgM y la persistencia de anticuerpos específicos IgG después de 3.5 años del diagnóstico de la infección aguda del parvovirus B19. Los pacientes no presentaron evidencia de infección aguda o recurrente de parvovirus B19. Aproximadamente el 70% de los casos con TAC en pacientes con anemia falciforme identificados en un periodo de 7 años fueron causados por una infección aguda por parvovirus B19. Una vez detectada, anticuerpos IgG específicos para parvovirus B19 permanecen detectables en diferentes años. No existe evidencia de una infección recurrente o crónica por parvovirus B19 en pacientes con anemia falciforme.[92]

Manifestaciones Vasculares

Los eventos de tromboembolias son inusuales en pacientes con células falciformes, particularmente en ausencia de hipoxia, sin embargo, se han reportado casos de pacientes con episodios múltiples de trombosis venosa grave en las extremidades inferiores, siendo el único factor de riesgo, identificado como tal, para una trombosis venosa recurrente, la presencia de células falciformes. Se cree que las citocinas inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral (FNT), pueden tener un papel prominente en la mediación de los eventos que conducen a una oclusión vascular en la anemia falciforme. Lo anterior se desprende de un estudio realizado sobre eritrocitos de pacientes con anemia falciforme añadidos a endotelio vascular tratado con FNT, observándose que estos eritrocitos incrementaban su adherencia de manera muy significante; es probable que los factores que contribuyen a dicho incremento sean la poca superficie de intercambio de los eritrocitos falciformes, los elevados niveles de fibrinógeno y el factor de von Willebrand en el plasma de los pacientes.[50,66]

Otro tipo de ataque calificado de"crisis" es el que se acompaña de signos de localización de la enfermedad. Se cree que resultan de eritrostasis y anoxia o infarto. Los infartos de bazo, riñón, hueso y pulmón, y las lesiones neurológicas localizadas, son ejemplos de este tipo. Los pacientes con anemia falciforme también pueden tener otros trastornos, como

apendicitis aguda, cólico renal y enfermedades de la vesícula biliar, que deben distinguirse de los periodos de "crisis".

Manifestaciones Genitourinarias

No son frecuentes los síntomas atribuibles al aparato genitourinario, pero las complicaciones a este nivel pueden ser espectaculares y graves. Puede haber episodios de hematuria complicando tanto el carácter como la enfermedad de eritrocitos falciformes. La hemorragia suele ser unilateral, recurrente, a veces intensa. Algunos pacientes han sido operados por sospecharse tumor al aparecer hematuria unilateral acompañada de pielografía intravenosa anormal. Se ha observado un defecto en la capacidad renal de concentrar la orina en la mayor parte de pacientes con anemia de glóbulos rojos falciformes y muchos con carácter de drepanocitosis. El defecto puede corregirse temporalmente por transfusión de glóbulos rojos normales en pacientes jóvenes, pero no suele ocurrir así en adultos que han tenido tiempo de sufrir una lesión estructural irreversible de la médula renal. La patogenia de la hematuria y la hipostenuria no es bien conocida. La forma semilunar de los glóbulos rojos de pacientes con esta enfermedad, o con carácter de drepanocitosis, se cree que se produce en los capilares medulares a consecuencia de la combinación de una tensión reducida de oxígeno y una hiperosmolalidad (y quizá reducción de pH). La ingurgitación resultante y la obstrucción vascular resultan particularmente manifiestas en las zonas peritubulares; se cree que la isquemia local origina degeneración del epitelio tubular, extravasación de

sangre alrededor de los túbulos colectores y, en ocasiones, necrosis papilar.

Dentro de los trastornos genitourinarios, la anemia celular falciforme es conocida como una causa de glomerulopatia, incluyendo la glomeruloesclerosis focal segmental (FSGS). Se considera que los pacientes que tienen glomerulopatia celular falciforme con FSGS tienen un pronostico muy pobre, en comparación con los pacientes tienen glomerulopatia celular falciforme sin esta lesión. Los pacientes anteriores sufren más frecuentemente de proteinuria persistente y eventualmente desarrollan la etapa final de lesión renal. Se ha presentado el caso de un paciente con glomerulopatia celular falciforme y FSGS siendo más joven que los pacientes con hallazgos similares reportados previamente. La histopatología de su lesión renal está remarcada por cambios ultraestructurales en los segmentos en las membranas basales de los glomérulos y en las células endoteliales. Quienes estudiaron este caso han especulado que estos cambios son precursores de la patogénesis de la esclerosis glomerular en pacientes con anemia celular falciforme.[101]

Se ha observado priapismo en cierto número de pacientes; a veces persiste 10 a 36 días, y suele ir seguido de impotencia completa.

Manifestaciones Gastrointestinales

Casi todos los pacientes con anemia de células falciformes en uno u otro momento de su evolución sufren molestias gastrointestinales, anorexias, náuseas, vómitos e ictericia.

Puede haber dolor intenso en cualquier parte del abdomen; a veces es difícil decidir si está o no indicada una intervención quirúrgica. Tales dolores pueden depender de infarto del bazo u otro órgano, o estar relacionados con colelitiasis, que se ha dicho tiene frecuencia del 25%. En un grupo de 47 pacientes homocigotos de 12 a 58 años de edad con anemia falciforme, el estudio indicaba que la tercera parte de los enfermos de más de 10 años de edad tenían cálculos biliares y colecistitis crónica, aunque menos de 10% presentaban signos atribuibles a tal complicación.[213] Se ha recomendado efectuar la colecistectomía a pacientes con cálculos biliares porque el peligro operatorio no parece mucho y es difícil distinguir la ictericia por colangitis y cálculos biliares, de la ictericia causada por la drepanocitosis y la estasis hepática. Las complicaciones que se presentan alrededor de los procedimientos quirúrgicos se encuentran frecuentemente en pacientes con anemia falciforme. Se han revisado pacientes con hemoglobinopatías, a quienes se les ha efectuado colecistectomía de 1978 a 1991 para evaluar su manejo perioperatorio y su resultado clínico. Veintidós niños con hemoglobinopatía falciforme mayor, sufrieron colecistectomía, por colelitiasis sintomática. Los 22 fueron transfundidos para lograr una elevación en sus niveles de hemoglobina en más de 9 g/dL y una hemoglobina S menor al 37%. A 14 de ellos se les practicó, de manera preoperatoria e inmediata, un intercambio eritrocitario. La media de Hb anterior al intercambio en estos pacientes, fue de 8.1 g/dL. Su HbS media fue de 84%. A estos pacientes se les colocó un catéter de aféresis bajo anestesia local seguido de un

intercambio de células rojas. El volumen medio del paquete globular intercambiado fue de 28.1 ml/kg. La HbS media después de la transfusión fue de 21% y la Hb media fue de 10.6 g/dl. Otros 8 pacientes sufrieron transfusiones secuenciales (3 después de un intercambio por una crisis vasoclusiva pulmonar aguda). Estos pacientes fueron preparados sobre un intervalo de 2 a 8 semanas previas a la operación y recibieron un promedio de 26.9 ml de paquete de glóbulos rojos/kg. Siguiendo la transfusión secuencial, la media de Hb fue de 11.8 g/dl y la HbS media fue de 19% en el periodo de cirugía. Todos los pacientes recibieron un antígeno extendido proporcional a la sangre recibida. Las complicaciones de la transfusión preoperatoria fueron menores, e incluyeron reacciones febriles y alérgicas y una flebitis superficial poco severa inducida por el catéter.[79,86] Algunos pacientes con anemia de eritrocitos falciformes presentan dolor en el cuadrante superior derecho, hipersensibilidad, aumento rápido e intenso del volumen del hígado, e incremento considerable de la bilirrubina sérica de reacción directa. En tales pacientes quizá sea difícil decidir si lo que ha ocurrido es un ataque de hepatitis fulminante grave, posiblemente por transfusiones, trombosis de vena hepática, o congestión hepática generalizada con eritrocitos semilunares.

En enero de 1993 se reportó un caso de pancreatitis que ocurrió como una complicación de crisis vasoclusiva en un niño con anemia falciforme. Los autores consideran a esta complicación como una causa de dolor abdominal en niños con enfermedades multisistémicas, particularmente en aquellas que pueden causar

daños en órganos isquémicos tal como ocurre en el caso de la anemia falciforme.[80]

Mientras que el secuestro esplénico agudo y el infarto esplénico son observados comunmente en los infantes y en los jóvenes con anemia falciforme, estas alteraciones son raramente observadas en adultos con hemoglobina S homocigota dado que el infarto esplénico recurrente que tiene lugar durante la infancia es típicamente seguido por una cicatrización, atrofia y fibrosis esplénicas. Tanto el secuestro esplénico agudo, como el infarto esplénico tienen una permanencia relativamente común en los adultos con las otras hemoglobinopatías falciformes. Estos episodios son casi ciertamente una consecuencia de la persistencia extendida y distendida del bazo que frecuentemente permanece presente en estas condiciones. Se ha referido el caso de dos pacientes adultos con hemoglobina SC: uno de ellos desarrolló secuestro esplénico agudo y el otro un infarto esplénico. En ningún caso hubo antecedentes de un viaje aéreo reciente o de exposición a la altitud. Dado que algunas veces puede haber dificultad en la identificación de estas formas de manifestación de alguna otra, y debido a que una falla en la identificación del secuestro esplénico agudo puede ser catastrófica, estas dos entidades deben ser incluidas en el diagnóstico diferencial para cualquier paciente con hemoglobina SC que presente un inexplicable descenso en su hemoglobina, dolor en el cuadrante superior izquierdo, fiebre sin causa aparente, o esplenomegalia sintomática.[99]

Aunque la presencia del carácter drepanocítico no suele acompañarse de ninguna manifestación patológica, hay excepciones importantes. La hematuria, que puede ser persistente y muy molesta, se observa en pacientes con carácter de drepanocitosis. Pacientes con carácter de células falciformes volando a grandes alturas han sufrido infartos de bazo; otros han muerto bruscamente mientras estaban efectuando un ejercicio físico agotador. En estos dos últimos casos la anoxia, la deshidratación y la acidosis probablemente sean la causa de los ataques.

La asplenia funcional, posiblemente a consecuencia de una desviación del riego del bazo por cortos circuitos intravasculares, se ha señalado en niños con esplenomegalia; la función esplénica se restableció cuando las transfusiones elevaron el número de eritrocitos normales al 50%, probablemente disminuyendo la viscosidad de la sangre.

Un tercer tipo de "crisis" dolorosas es el más complicado de todos. El comienzo es bastante brusco y puede ocurrir cuando un paciente despierta por la mañana o después de una siesta por la tarde. El ataque suele empezar con un dolor intenso en una o ambas rodillas o piernas. Aumenta constantemente de gravedad y extensión, y muchas veces progresa hacia la espalda, abdomen, ambos brazos, cuello y cabeza. El dolor puede afectar casi todo el cuerpo en unos pocos minutos o después de varias horas; en ocasiones no progresa más allá de una o varias extremidades a un lado del cuerpo. En ocasiones las crisis son ligeras y sólo duran uno o dos días; sin embargo, es más frecuente el dolor

intenso y quizá no se alivie completamente con aspirina o narcóticos. La frecuencia de estos ataques varía mucho; a veces en pocas semanas, otras veces al año, y en otros enfermos sólo con intervalos de varios años. Casi todos los pacientes insisten en la brusquedad del comienzo del ataque. Algunas crisis van precedidas de infecciones respiratorias, picaduras de insectos, fiebre, nerviosismo y otras indicaciones diversas, pero a veces el paciente se siente perfectamente bien y sin realizar ninguna actividad fatigosa, instantes antes de presentarse la crisis. No siempre hay fiebre, los recuentos en sangre periférica se conservan sin cambio y el enfermo no manifiesta cianosis, choque ni insuficiencia vascular localizada.

Manifestaciones Neuronales

El ataque, especialmente el infarto cerebral, es la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños con anemia celular falciforme. La prevención primaria a través de una terapia de transfusión puede ser factible si existe un medio para identificar a los pacientes de alto riesgo. La ultrasonografía Doppler transcraneal puede medir la velocidad de flujo en las grandes arterias intracraneales. El estrechamiento de estas arterias, lo que conduciría a un infarto cerebral, es caracterizado por un incremento en la velocidad de flujo sanguíneo. Usando ultrasonografía Doppler transcraneal, se ha medido prospectivamente la velocidad de la sangre cerebral en niños y adultos jóvenes que presentaron anemia celular falciforme. Los resultados fueron clasificados como normal o

anormal en base a la velocidad máxima de flujo en la arteria cerebral media. La velocidad anormal fue definida como un flujo mayor o igual a 170 cm/seg, una definición determinada por análisis cuya meta era maximizar el valor predictivo de la prueba. El punto final fue un clinicamente aparente primer infarto cerebral. Con este método se realizaron 283 ultrasonidos transcraneales en 190 pacientes con anemia celular falciforme (edades de entre 3 a 18 años). Después de un prorrateo en 29 meses, se diagnosticó infarto cerebral en 7 pacientes. En 23 pacientes los resultados del ultrasonido fueron anormales, y normales en 167. Las características clínicas y hematológicas de los dos grupos fueron similares, pero 6 de los 7 ataques ocurrieron entre los 23 pacientes cuyos resultados en el ultrasonido fue anormal. En este grupo, el riesgo relativo de ataque fue de 44 (con un intervalo de confianza de 95%, 5.5 a 346). La ultrasonografía transcraneal puede identificar a niños con anemia celular falciforme que tienen un alto riesgo de infarto cerebral. Los ultrasonidos periódicos y el uso selectivo de terapia de transfusión podría ser un objetivo para lograr una prevención primaria de los ataques cerebrales.[100]

Se han revisado estudios correspondientes al funcionamiento neurocognocitivo de niños en los que se ha diagnosticado anemia falciforme, y los hallazgos sugieren una deficiencia neurocognocitiva difusa, con mucha variabilidad en estos sujetos; se ha concluido que los problemas conductuales, bajo amor propio (autoestima) y disturbios en la imagen corporal, son características frecuentes de estos niños. Dentro de las

recomendaciones sobre el apoyo sicológico para estos pacientes se incluyen una educación especial temprana y la intervención de programas psicosociales para niños con anemia falciforme.[81]

Manifestaciones Oftálmicas

Es frecuente observar anomalías vasculares conjuntivales características, consistentes en segmentos capilares con forma de coma que parecen aislados del resto de la red vascular empleando una lupa o una lámpara de hendidura en pacientes con anemia de eritrocitos falciformes. El examen de fondo de ojo en pacientes con anemia falciforme o con carácter de drepanocitosis puede demostrar tortuosidad intensa y dilatación de los vasos retinianos. Puede descubrirse neovascularización y microaneurismas, estasis o trombosis de vasos y hemorragias de la retina.[102]

La retinopatía en la célula falciforme, ha sido descrita desde 1930 y su investigación ha sido progresiva como parte de la patofisiología de la enfermedad, sus efectos sobre el ojo y el tratamiento conseguido. Se han identificado las etapas de la enfermedad y se han establecido las modalidades del tratamiento para cada etapa. Los resultados de la investigación y los casos reportados han sido publicados en revistas médicas disponibles para los médicos. De cualquier forma, no existen publicaciones identificadas aplicadas al cuidado técnico requerido para enfrentarse con esta enfermedad. Los cuidados oftálmicos podrían ser conocidos para la enfermedad de la célula falciforme y específicamente para la retinopatía.[54,78]

Manifestaciones Auditivas

Actualmente, se sabe que existen problemas auditivos asociados con la anemia falciforme. Se examinó el sistema auditivo de 34 sujetos adultos con anemia falciforme usando técnicas de examen audiométrico estándar. Los resultados del estudio indicaron que los pacientes con anemia falciforme corren riesgo de una disfunción retrococlear así como coclear del sistema auditivo. Sin embargo, no hay patrones audimétricos patognomónicos de esta anemia falciforme. Los resultados indicaron que el estado auditivo debería ser cuidadosamente monitoreado en todos los pacientes adultos con anemia falciforme. En otro estudio reciente, que involucró a 75 pacientes adultos con anemia falciforme, se examinó también el estado auditivo de los mismos. En este estudio, 31 de los sujetos (41%) fracasaron en la investigación auditiva.[55,56]

Manifestaciones Oseas

La anemia falciforme suele acompañarse de síntomas o signos atribuibles a esqueleto y articulaciones.

Se ha señalado osteomielitis de salmonella en cierto número de pacientes con anemia de células falciformes, y se ha comprobado una frecuencia elevada de esta infección en pacientes con la enfermedad. Los pacientes con anemia falciforme son más susceptibles a la osteomielitis y a la artritis séptica, que la población que no la padece. Se realizó un estudio en 78 pacientes

con estas condiciones de abril de 1988 a marzo de 1991, 30 tuvieron anemia falciforme, 14 con rasgos falciformes y 34 tuvieron una electroforesis normal. La tibia, seguida por el fémur y el húmero, fueron los huesos más comunmente afectados, y la rodilla fue la articulación más frecuentemente afectada. El microorganismo más común en la osteomielitis y en la artritis séptica en la anemia falciforme, fue la Salmonella, mientras que el estafilococo lo fue en los pacientes normales y en aquellos que presentaron rasgos falciformes. Los antibióticos específicos para estos organismos, deben ser considerados en los pacientes con anemia falciforme que presenten sospecha de osteomielitis o artritis séptica.[62,67] Hay bacteremia y focos múltiples de participación, sobre todo en huesos largos. El pus puede acumularse por debajo de la piel o en las articulaciones después de rotura espontánea de un absceso subperióstico a través del periostio. El motivo del aumento de suceptibilidad de los pacientes drepanocitémicos no está claro; quizá intervenga el hecho de que los macrófagos tengan disminuida la capacidad de fagocitar y matar salmonellas a consecuencia de la eritrofagocitosis por las células reticuloendoteliales. También puede tener importancia la isquemia o el infarto locales y la atrofia esplénica acompañada de asplenia funcional.

Las anomalías esqueléticas suele demostrarse sólo con radiografías; las manifestaciones más comunes son la forma en "cola de pescado" de los cuerpos vertebrales y las zonas transparentes a rayos X de necrosis en estos u otros huesos. A veces se observa el aspecto de "pelo cortado" del cráneo, pero no

es frecuente. Otras anomalias que pueden demostrarse radiológicamente en algunos paciente son cálculos biliares, infartos pulmonares y agrandamiento del corazón. En niños pequeños son comunes las crisis de dactilitis, sobre todo en las manos.

Desde hace tiempo se conoce el infarto de médula ósea, manifiesto por el aspecto necrótico del producto obtenido por aspiración, como posible fuente de embolias pulmonares y cerebrales; más recientemente se ha sospechado que eran causa de crisis dolorosa.

Manifestaciones en Recién Nacidos

En lactantes la anemia falciforme es una enfermedad particularmente grave. En un informe, 10 de 64 pacientes murieron durante el primer año de vida; las causas de la muerte fueron neumonia, crisis, septicemia de meningococos, pseudomonas y salmonellas, y diarrea. La enfermedad se manifestó primero por dactilitis, en particular de las manos, pero también de los pies, eventualmente con anomalias radiológicas, crisis y síntomas no especificos calificados de "crecimiento dificil".[102,103]

Otras Manifestaciones

La neumococcemia fulminante puede terminar en la muerte a las pocas horas de iniciada. Pueden ser factores predisponentes una deficiencia de la actividad sérica de opsonización de neumococos y asplenia funcional que se han observado en la anemia falciforme. En algunos de los niños con septicemia hubo

coagulación intravascular. También se observó la muerte repentina de niños durante una crisis.

Recientemente se ha descrito una causa de obstrucción nasal en la anemia falciforme que no ha sido previamente tratada en la literatura. La patofisiología es la misma que la del priapismo dadas las similitudes en el arreglo vascular de los turbinatos y el pene. Se consideran varias opciones de tratamiento, pero la que mejor resultado ha dado es la reducción quirúrgica de los turbinatos (cornetes) inferiores.[96]

HEMOGLOBINA C (HbC)

DESCRIPCION

Estructuralmente, el defecto de la hemoglobina C se sitúa a nivel de la sexta posición del extremo amino terminal de la cadena beta, en donde el ácido glutámico es substituido por lisina.[103]

La hemoglobina C se descubrió estudiando pacientes diagnosticados de anemia drepanocitica atipica, pero luego se comprobó que tenian la enfermedad de los glóbulos rojos falciformes con hemoglobina C. La presencia de ambas, hemoglobina C y hemoglobina S, se comprobó por electroforesis. En los casos publicados, la mayor parte de hemoglobina ha sido de tipo C. El conocimiento concerniente a la heterogeneidad de los eritrocitos SS (homocigotos para el gen beta S) ha sido útil para comprender la patofisiologia de la anemia de las células falciformes. No existe información equivalente para los eritrocitos heterocigotos compuestos por los genes beta S y beta C (SC). Estos eritrocitos son conocidos por ser más densos que las células sanguineas normales y más constantes que la mayoria de las células en la sangre SS. Analizando las caracteristicas de la heterogeneidad de los eritrocitos SC se ha encontrado que: (1) Las células SC exhiben caracteristicas morfológicas inusuales, particularmente la tendencia por poseer membrana "plegable" (son comunes el plegamiento múltiple, el desplegamiento y las formas triangulares; (2) Los eritrocitos contienen cristales y algunos

contienen agregados circulares de hemoglobina (células en forma de bola de billar), que son detectados en la sangre SC circulante; (3) En contraste con los reticulocitos normales, los cuales se encuentran principalmente en una fracción de eritrocitos de baja densidad, los reticulocitos SC se encuentran en la fracción más densa de los eritrocitos SC; y (4) Tanto la desoxigenación como la substitución de Cl^- extracelular por NO_3^- (ambos inhibidores del cotransporte K:Cl) condujeron a una moderada disminución de la fracción densa y a un cambio muy evidente de los reticulocitos a las fracciones de baja densidad.[19,63]

Las siguientes observaciones se aplican también a otras hemoglobinas como la D, E, K y L entre otras. El homocigoto presenta un cuadro clínico grave; el heterocigoto puede ser normal, o sufrir solamente una anemia leve.

En el homocigoto, son muy notables las células en diana, y por lo tanto, la fragilidad osmótica es menor. El diagnóstico se establece por electroforesis. Así como en el caso de otras hemoglobinas, se han descrito hemoglobinopatías mixtas, por ejemplo una combinación de HbC/HbE, y HbC con talasemia.[102]

La enfermedad por hemoglobina C (HbC), es un desorden poco severo que ocurre predominantemente en personas de descendencia africana, y es usualmente detectada durante rutinas de investigación. Estos pacientes son, frecuentemente, asintomáticos. El pH intraeritrocitario se ve disminuido, siendo responsable de un cambio hacia la derecha en la curva de

disociación de oxígeno. Los agregados intracelulares de hemoglobina interfieren con la plasticidad celular y con su capacidad de filtración, dando como consecuencia una predisposición a la fragmentación, formación de esferocitos y secuestro esplénico. No se requiere de una terapia específica. El estado heterocigoto de hemoglobina C es, clínicamente, silencioso. Aproximadamente el 4% de los estadounidenses de origen africano son heterocigotos.[122]

COMPLICACIONES
Manifestaciones Auditivas

En un estudio que involucró a 75 pacientes (en el que se estudió también a la hemoglobina S) con anemia falciforme, se examinó también el estado auditivo de los mismos. Al examinarse el tipo de hemoglobina se encontró que las personas con células falciformes C tuvieron una mayor incidencia de daño auditivo, no obstante, todos los grupos de sujetos exhibieron una mayor prevalencia de coeficientes que en la población general.Cuando se examinó el tipo de hemoglobina se encontró que las personas con células falciformes C tuvieron una mayor incidencia de daño auditivo, no obstante, todos los grupos de sujetos exhibieron una mayor prevalencia de coeficientes que en la población general. Esto confirma la necesidad de implementar una rutina de valoración audiológica que pueda ser incorporada dentro del examen médico regular para adultos con anemia falciforme.[55,56]

Otras manifestaciones

El bazo se encuentra dilatado en el 90% de los casos. Se ha reportado la ruptura espontánea de este órgano, sin embargo, su función no parece ser afectada de manera adversa. En este tipo de pacientes, se ha observado que la frecuencia de colelitiasis se ha incrementado. La anemia va de poco severa a moderada, con un conteo de reticulocitos del 2 al 6%. Son frecuentes las células blanco (como se mencionó anteriormente), y se han observado, en los eritrocitos de sangre periférica, cristales de hemoglobina.[122]

Los caracteres clínicos de la enfermedad SC han sido descritos por varios autores. El proceso es mucho más leve que la anemia drepanocítica, pero en algunos pacientes se producen periódicamente crisis importantes; el embarazo puede acompañarse de complicaciones graves. En el adulto el bazo suele estar considerablemente aumentado de volumen, en contraste con la anemia de células falciformes, donde casi siempre el bazo es pequeño. La anemia suele ser ligera o de grado moderado, y los valores de hematocrito y hemoglobina varían del 70 al 100% de los normales, excepto durante la crisis. El número de reticulocitos es normal o algo elevado. En frotis de sangre del 50 al 100% de los eritrocitos son en diana y contienen cristales de hemoglobina en pacientes esplenectomizados. Puede demostrarse la forma semilunar en preparados húmedos. La fragilidad osmótica de los eritrocitos está disminuida. El diagnóstico se establece por electroforesis; hay ambas hemoglobinas (S y C). Se ha señalado que la transfusión de recarga durante el último trimestre del embarazo era eficaz para disminuir las complicaciones.

HEMOGLOBINA M (HbM)

En presencia de aire u oxigeno, la hemoglobina se oxida gradualmente a metahemoglobina. En esta oxidación, el hierro del hem pasa de la variedad ferrosa (Fe^{++}) a la férrica (Fe^{+++}), fijando un grupo hidroxilo. En tubo de ensayo, la hemoglobina se transforma en metahemoglobina por oxidantes como el ferrocianuro de potasio, o mediante el tratamiento de los eritrocitos con nitrito. En los globulos rojos del organismo, las peroxidasas y otros factores facilitan la formación de metahemoglobina, pero existen cuatro sistemas reductores que combaten esta tendencia, de modo que el contenido de metahemoglobina de la sangre normal rara vez pasa del 0.5% de la hemoglobina total. Estos sistemas, en orden de importancia, son la diaforasa de DPNH (73%), el ácido ascórbico (12%), el glutatión (9%) y la diaforasa de TPNH (6%).[102,106]

DESCRIPCION

Como en el caso de otras hemoglobinopatias, la hemoglobina M difiere de la hemoglobina normal por substitución de un aminoácido en las cadenas alfa o beta. En el caso particular de la hemoglobina M, la substitución parece encontrarse cerca del hierro del grupo hem correspondiente, y ser capaz de reaccionar con dicho hierro cuando este se oxida a la variedad férrica. Esto impide la función normal de la diaforasa de DPNH para reducir la metahemoglobina. Además durante la transformación de

metahemoglobina en cianometahemoglobina, la unión entre la cadena polipeptídica y el hierro debe romperse. En las variedades de HbM con substitución en la cadena alfa (HbM_{boston}, HbM_{b}, y HbM_{Iwate}, HbM_{I}), la unión entre el nuevo aminoácido parece ser muy fuerte, y en consecuencia la reacción con cianuro es incompleta, muy lenta, obteniéndose un espectro de absorción anormal de la cianometahemoglobina. En el caso de las variedades HbM en las cuales la substitución del aminoácido tiene lugar en las cadenas beta, como en la $HbM_{Saskatoon}$ (HbM_{S}) y la $HbM_{Milwaukee-1}$ (HbM_{M-1}) la unión entre el aminoácido y el hierro férrico no es tan potente, y los espectros de las cianometahemoglobinas en la región de la luz visible son normales.[102,103]

La metahemoglobinemia es una enfermedad hereditaria dominante, y los individuos afectados tienen cerca del 30 al 50% de metahemoglobina. Los pacientes presentan una apariencia cianótica, aunque realmente no sean cianóticos. Su color obscuro es debido al color chocolate de la metahemoglobina circulante. Usualmente tienen una eritrocitosis compensatoria. El diagnóstico se realiza mediante la medición de los niveles de metahemoglobina y demostrando la presencia de una hemoglobina anormal, normalmente por electroforesis. La enzima reductora de metahemoglobina es normal en este síndrome. Usualmente no se requiere tratamiento.[122]

COMPLICACIONES

Esta enfermedad, ataca por igual a ambos sexos, heredandose como factor recesivo autosómico. Los padres de los niños

afectados son aparentemente normales y no sufren metahemoglobinemia. pero en sus eritrocitos la actividad de diaforasa de DPNH es aproximadamente la mitad de lo normal. En los sujetos afectados, puede presentarse como metahemoglobina de 20 a 50% de la hemoglobina total; pero son raros los síntomas de anoxia. La cianosis tiene un tinte gris chocolate, como ya se había mencionado antes. En los casos en los que existen antecedentes familiares de la anormalidad, es frecuente que la condición se reconozca en el momento del parto, o poco después de éste. A veces sólo se identifica en la adolescencia o en la edad adulta.[102]

Ha sido frecuente el retraso mental en los casos familiares, pero puede deberse a un defecto genético concomitante, y no a la anoxia.[102]

OTRAS HEMOGLOBINAS ANORMALES

Carrell y Lehman han usado el término "anemia hemolítica de hemoglobina inestable" para referirse a un grupo de síndromes patológicos similares, cuyo cuadro clínico se caracteriza por anemia hemolítica congénita, inclusiones en los glóbulos rojos que son cuerpos de Heinz típicos, eliminación de un dipirrol de tipo bilifuscina-mesobilifuscina en la orina, y esplenomegalia. La hemoglobina es termolábil y precipita cuando se incuba un hemolizado a 50°C durante una horas. En un tiempo, la mayor parte de estos trastornos probablemente se catalogaron como anemia hemolítica congénita con cuerpos de Heinz.

Se han descrito más de 20 hemoglobinas anormales de este tipo (hemoglobinas Zurich, Colonia, Ginebra, Sidney, Hammersmith, Gun Hill, Seattle, Olmsted, Santa Ana y otras). Estas hemoglobinas anormales tienen en común una substitución de aminoácido en la región donde el hem se une a la globina, que se ha denominado la "bolsa de hem". La estabilidad relativamente elevada de la hemoglobina normal depende de la interacción entre la molécula de globina y los grupos hem; la substitución de aminoácidos a este nivel hace que la molécula se vuelva inestable.

La anemia de estos pacientes suele ser ligera, excepto si se exponen a drogas oxidantes. Tal exposición origina un episodio hemolítico agudo similar al observado cuando hay deficiencia de deshidrogenasa de 6-fosfato de glucosa. El principal tratamiento es evitar las drogas oxidantes, pero la esplenectomía también ha

sido útil para algunos de estos pacientes. La substitución de aminoácido suele ser "silenciosa", por cuanto la movilidad electroforética es normal y debe procederse al análisis de aminoácidos para establecer el diagnóstico. De todas maneras, puede efectuarse un diagnóstico de presunción al demostrar hemoglobina termolábil y cuerpos de Heinz en los glóbulos rojos. Se han publicado varias revisiones sobre hemoglobinas inestables y otras hemoglobinopatías.[103]

HEMOGLOBINAS D Y G

La hemoglobina D se caracteriza por una anemia hemolítica poco severa y una esplenomegalia que va de leve a moderada. El estado heterocigoto es asociado con anormalidades que no son clínicas ni hematológicas.

Se ha comprobado que la hemoglobina D es más común en personas que no son de raza negra en diversas partes del mundo, pero más frecuente en los negros que en los caucásicos en Estados Unidos. Allí la frecuencia en personas de raza negra se ha señalado que era de 1:1000 y de 4:1000.

La enfermedad drepanocítica con hemoglobina D ha sido objeto de varios trabajos. Los pacientes que sufren este trastorno están normalmente desarrollados, muchas veces siguen asintomáticos durante largo tiempo, y pueden tener poca o ninguna anemia. La concentración de hemoglobina S puede variar entre 25 y 75% en estos pacientes. Sufren crisis que se parecen a episodios ligeros de anemia drepanocítica.

Las propiedades electroforéticas y de solubilidad de la hemoglobina G son similares a las de la hemoglobina D, de tal manera que generalmente no son diferenciadas. De las 16 variantes que satisfacen los criterios de solubilidad y electroforesis para HbD o HbG, al menos 9 han sido reconocidas en asociación con HbS. Con una excepción, los estado de doble heterocigoto de HbS y HbD o HbG, son clínicamente silenciosos. La HbS/D-Punjab se manifiesta en sí misma como una anemia poco severa.[122]

HEMOGLOBINA SAINT NAZARIE

La Hb Saint Nazarie (beta 103[G5]Phe----Ile) fue encontrada en cuatro familias francesas, sin relación aparente entre ellas. Los cinco pacientes portadores de esta hemoglobinopatía fueron detectados debido a una moderada eritrocitosis. La anormalidad estructural de la Hb Saint Nazarie (Hb_{SN}) está relacionada con el mismo residuo de la hemoglobina Heathrow (beta 103[G5]Phe----Leu. Un estudio funcional comparativo entre estas dos variantes, demostraron que el incremento en la afinidad de oxígeno es mucho menor en la Hb_{SN} que en la hemoglobina de Heathrow. La substitución de fenilalanina en G5, la cual está localizada dentro del paquete del hem, por una leucina, anula diferentes contactos entre el hem y la globina y condujo a un medio ambiente de este hem, con algunas similitudes respecto al observado en la mioglobina. En contraste, la substitución de G5 por una isoleucina, probablemente produzca modificaciones estructurales menores.[109]

HEMOGLOBINA ROTHSCHILD

Otra hemoglobina anormal descrita recientemente, es la hemoglobina Rothschild (beta 37 Trp----Arg) (Hb_R). Mediante microspectrofotometria de absorción polarizada, se ha investigado el comportamiento del oxigeno ligado a cristales de hemoglobina Rothschild (beta 37 Trp----Arg) en la estructura cuaternaria T. Estos cristales fueron cubiertos con soluciones de polietilenglicol, mismas que contienen bajas concentraciones de sales. En ausencia de cloruro, estos cristales tienen una afinidad por el oxigeno significantemente mas alta que los cristales de hemoglobina A humana cubiertos de manera similar, exhibiendo un coeficiente de Hill menor a 1. No se presenta un efecto Bohr en un pH entre 6 a 9. Hemos encontrado que el cloruro disminuye la afinidad de oxigeno en los cristales de la hemoglobina de Rothschild, un efecto que está ausente en los cristales de HbA. Es casi un hecho que esta dependencia de la afinidad sobre el cloruro, esté asociada con los sitios de unión del cloruro, los cuales han sido localizados como los residuos de arginina mutada. Ya que el cloruro ligado parece disminuir la afinidad al oxigeno de las cadenas alfa y beta, el enlace entre la ligadura de oxigeno y la disociación del cloruro resulta en una cooperación significante en el oxigeno ligado a los cristales.[112]

HEMOGLOBINA QUESTEMBERT

La Hemoglobina Questembert (HbQ) (alfa 131[H14]Ser-----Pro) fue encontrada en varios miembros de una familia francesa que padece de anemia congénita con cuerpos de Heinz. La hemoglobina inestable fue expresada en los eritrocitos de la circulación sanguínea periférica, en muy bajos niveles: Los estudios de la globina biosintética revelaron una elevada actividad específica de la cadena anormal y una proporción alfa/beta(marcada) similar a la de los rasgos beta-talasémicos. La Hb Caen (alfa 132[H15]Val----Gly) es otra variante inestable con la misma anormalidad en la biosíntesis de la globina. En ambos casos, la modificación estructural está localizada al final de la hélice H, una región codificada por el tercer exón. Aún no está claro el mecanismo para el desequilibrio en la síntesis de la globina. Puede estar relacionado: 1) a un defecto en el ensamble de la cadena, 2) a un incremento en la proporción de degradación de la cadena variante, seguido por la liberación de cadenas beta no marcadas desde la hemoglobina anormal conduciendo así a una aparente supresión de la síntesis de la cadena beta, o 3) a una estabilidad modificada del ARNm de la globina alfa normal.[114]

HEMOGLOBINA ALTDORF

Una mujer sueca de 38 años, fue investigada a causa de una anemia poco severa, resistente a la terapia férrica. Esta enfermedad hemolítica poco severa, se encontró en un examen rutinario de sangre. Ni la HPLC (cuantificación de HbA_{1c}), ni la electroconvergencia de Hb revelaron ninguna fracción principal

anormal, a pesar de que el examen in vitro de la inestabilidad de la hemoglobina, indicaron la presencia de una hemoglobina inestable. La PCR fue usada para amplificar las regiones de codificación del gen de la beta-globina. La secuencia directa de los nucleótidos de este material reveló una hetrocigosidad para una substitución que corresponde a la variante de hemoglobina alfa 2 beta 2 135([H13]Ala----Pro. Esta variante claramente inestable, denominada hemoglobina Altdorf, ha sido descrita con anterioridad sólo en una familia de descendencia italiana. El examen de los genes de beta-globina de 6 miembros de la familia se realizó por PCR seguido de un desdoblamiento específico con la enzima de restricción Ban 1, y se encontró la mutación en dos de los hijos, pero no en sus padres o hermanos. Esta caso demostró que las variantes de la hemoglobina no pueden ser descartadas como una causa de enfermedad hematológica, incluso si los padres carecen de síntomas y los exámenes ordinarios, tales como la HPLC y la electroforesis/electroconvergencia, no revelen mayores anormalidades.[119]

HEMOGLOBINAS DIVERSAS

La hemoglobina Memphis tiene glutamina en lugar de ácido glutámico a nivel de la posición vigésima tercera de la cadena alfa. Los pacientes doblemente heterocigotos para esta hemoglobina y hemoglobina S no pueden distinguirse del enfermo más frecuente con carácter de drepanocitosis. Sin embargo, cuando se observa hemoglobina Memphis junto con hemoglobina S homocigótica, el cuadro clínico es mucho más leve que el que se

observa de ordinario en la drepanocitosis. La anemia no es muy diferente, pero las crisis dolorosas son raras. Esto se ha atribuido a una disminución de la viscosidad por la substitución en la cadena alfa. El cuadro electroforético es el de hemoglobina SS; se necesita un análisis de aminoácidos para establecer el diagnóstico.

Se han descrito dos hemoglobinas anormales que producen hematies semilunares y emigran electroforéticamente como la hemoglobina C. Tienen una substitución de valina en lugar de ácido glutámico de la hemoglobina S, pero además, una segunda substitución de aminoácido en la cadena beta. En la hemoglobina Harlem, la segunda substitución es aspargina en lugar de ácido aspártico en la posición septuagésima tercera; en la hemoglobina Georgetown la segunda substitución no está descubierta todavía. Sólo se han observado pacientes heterocigotos con estas hemoglobinopatías. No presentan enfermedad clínica manifiesta, excepto los heterocigotos para hemoglobina Harlem que tiene un defecto renal de concentración.[103]

TALASEMIA
HEMOGLOBINA H y HEMOGLOBINA E

El término talasemia se refiere a la síntesis reducida de una o más de las cadenas de hemoglobina. De este modo es un defecto cuantitativo más que cualitativo de la hemoglobina. Las cadenas importantes en la vida post-gestacional son las cadenas alfa y beta, y las talasemias en general son clasificadas bajo el nombre de α- o ß-talsemias, dependiendo de cual de las cadenas esté involucrada. En la Tabla 2 se muestran algunos genotipos comunes que conducen a varios tipos de severidad clínica de talasemia.

Una clasificación adicional usa las manifestaciones clínicas como factor determinante, dando como resultado los términos de *Talasemia mayor*, *Talasemia intermedia* y *Talasemia menor*, dependiendo principalmente de la severidad de la anemia.

Los cuadros clínico y patológico en las talasemias, dependen de la severidad de la enfermedad, pero todas tienen características generales afines, sin tomar en cuenta el tipo de etiología que las produjo. Una característica central de la enfermedad es la anemia hipocrómica microcítica, la cual es muy similar a la deficiencia férrica. Tanto en la talasemia como en la deficiencia férrica, la falla en la síntesis adecuada de hemoglobina -aunque por diferentes razones- causa este tipo de fenotipo celular.

TABLA 2. Algunos tipos de severidad clínica de talasemia.[102]

Tipo de severidad clínica		
Alelo	Heterocigoto	Homocigoto
Beta°	Menor	Mayor
Beta+media	Menor	Mayor
Beta+African	Menor	Intermedia
Alfa-talasemia 1	Menor	Letal
Alfa-talasemia 2	Portador silencioso	Menor
Hbconstant spring	Portador silencioso	Menor

DESCRIPCION

La talasemia fue la primera hemoglobinopatía para la cual se estableció con seguridad una relación familiar. También se le conoce como anemia de Colley, leptocitosis hereditaria y anemia mediterránea. Existen varios tipos bioquímicos y dos entidades clínicas principales. Esta enfermedad no es un cuadro único, sino que comprende un grupo de trastornos bioquímicamente parecidos, ligados por una síntesis anormal de hemoglobina y una anemia hipocrómica microcítica.

Los trastornos bioquímicos mejor conocidos son la talasemia alfa, la beta, y la alfa-beta de reciente descripción; estos nombres se refieren a la formación anormal de las cadenas polipeptídicas alfa, beta y alfa-beta, respectivamente. Se ha sugerido el término de "talasemia mayor" para indicar la forma grave de la enfermedad, y que correspondería a la condición homocigota; el término "talasemia menor" hará entonces referencia a la forma más leve, siendo correspondiente al estado heterocigoto.[102]

Los sindromes talasémicos pueden considerarse resultado de un defecto bioquímico en la síntesis de hemoglobina. No se ha demostrado ninguna substitución de aminoácidos, y la hemoglobina una vez formada, tiene estructura normal. La explicación de la disminución de la síntesis de hemoglobina en la talasemia no está muy clara; probablemente incluya cierta alteración del ARNm que dirige la síntesis de una cadena hemoglobínica específica. La deleción del gen correspondiente a las síntesis de cadenas alfa puede ocasionar variedades graves de talasemia alfa.

Un defecto en la síntesis de las cadenas beta, es el tipo más frecuente de talasemia. Cuando el paciente hereda un gen anormal de ambos progenitores y es homocigoto para el defecto, hay anemia grave y talasemia mayor. Cuando el paciente es heterocigoto para el defecto, la anemia es ligera y el proceso se llama talasemia menor (lo que se había mencionado con anterioridad). Por motivos todavía no aclarados, algunos pacientes homocigotos presentan un curso más ligero de lo corriente, y algunos de los heterocigotos una evolución más grave de lo usual. De estos pacientes, se dice que tienen una talasemia intermedia.[102,103,106]

TALASEMIA MAYOR

En la talasemia mayor, la falla en la síntesis de hemoglobina es tan severa que las células son extremadamente hipocrómicas, pero en adición a algunas células cuyo inicio es microcítico, existe, usualmente una extrema poiquilocitosis y anisocitosis. La médula ósea, obviamente, presenta una extrema hiperplasia eritroide. El fierro es abundante de manera constante en

pacientes no transfundidos, lo que es un importante diagnóstico diferencial respecto de la deficiencia férrica. Como resultado de una larga vida con hiperplasia de médula ósea, los huesos pueden llegar a presentar una cierto número de trabéculas con adelgazamiento vertical en el examen de rayos X. Como resultado de la síntesis de un tipo de cadena (por ejemplo, la cadena alfa) y una inadecuada síntesis de otra (por ejemplo la cadena beta), la cadena libre (en este caso la cadena alfa) precipita dando como resultado anticuerpos de inclusión, los cuales son más fácilmente observados en pacientes esplenectomizados. Muchas de las células parecen sufrir daños, y muchas de ellas parecen ser destruidas en la médula ósea. Este proceso es llamado eritropoyesis infectiva y es una característica general de la talasemia severa. En adición, el periodo de vida de los eritrocitos que son producidos, se ve reducido. La naturaleza exacta del daño que causa la eritropoyesis infectiva y la reducción de la vida media de los eritrocitos, no estan claros todavía. La precipitación del exceso de las cadenas de hemoglobina y la excesiva unión de la hemoglobina a la superficie del citoplasma de la membrana es, probablemente, la principal causa del daño. Es claro que algún tipo de stress, incrementa la producción de oxidantes. No es bien sabido si el daño oxidativo es el principal causante, pero en cualquier caso, las células exhiben una gran variedad de anormalidades intracelulares y de membrana.[122] En la talasemia mayor, hay una disminución neta de la síntesis de cadena beta y parece existir un aumento compensador de hemoglobina F, que va del 20 al 90%. La mayor

parte de los pacientes con talasemia menor tienen una cantidad de hemoglobina F normal o sólo ligeramente aumentada, pero un incremento notable de la hemoglobina A_2 del orden del 3 al 7%. Unos pocos pacientes con talasemia menor tienen aumentada la hemoglobina F en lugar de la A_2; se piensa que esto sea una variante.[22]

La talasemia alfa homocigota no suele ser compatible con la vida; el producto muere en el útero o poco después de nacer. El estudio de la sangre de estos recién nacidos ha demostrado una hemoglobina compuesta de cuatro cadenas gamma que se denomina hemoglobina de Bart. Esta hemoglobina practicamente no tiene efecto Bohr (disminución en la afinidad de la hemoglobina para el oxigeno cuando disminuye el pH de la sangre) y fija oxigeno en forma casi irreversible con la tensión de oxigeno de los tejidos. Los lactantes con carácter de talasemia alfa también pueden tener pequeñas cantidades de hemoglobina de Bart al nacer, pero desaparece cuando cesa la sintesis de cadena gamma.[106]

TALASEMIA INTERMEDIA

Como se indicó anteriormente, la clasificación de las talasemias en categorias mayor, intermedia y menor, está basada en la severidad de la enfermedad. Muchos genotipos diferentes pueden producir talasemia intermedia.

El cuadro clinico en la talasemia intermedia es considerablemente menos severo que en la talasemia mayor con niveles tipicos de hemoglobina como se muestra en la tabla adjunta. Los eritrocitos son hipocrómicos microciticos, pero los

cambios son menos severos, y se observan células blanco. La poiquilocitosis y la anisocitosis también es menos severa. La médula ósea muestra una hiperplasia eritroide poco severa, y el fierro se encuentra presente, usualmente, en abundancia. Los cambios en el hueso no son una parte prominente de la enfermedad, dado que la hiperplasia de la médula ósea es confinada, principalmente, a los sitios normales destinados a la médula ósea activa. Es tipica una cierta eritropoyesis infectiva y la vida media de los eritrocitos se ve reducida; de este modo, el sistema reticulo endotelial es hiperplásico, comunmente, con una hepatosplenomegalia moderada.

El exceso de cadenas de hemoglobina también precipitan en esta clase de enfermedad, originando cuerpos de inclusión que aparecen en pacientes esplenectomizados. Los eritrocitos sufren daños oxidativos y posiblemente otro tipo de daños provocados por el acortamiento de su vida media asi como por la misma eritropoyesis infectiva. La colelitiasis es frecuente a causa de la hemólisis. La anemia, por si misma no es lo suficientemente severa como para requerir transfusión.

Generalmente, los pacientes sobreviven hasta la etapa adulta y pueden tener una vida normal. La muerte prematura puede ser originada por algunos tipos de procesos benignos de la talasemia mayor, pero se presentan tipicamente en la edad adulta.

Es la talasemia beta heterocigota la que manifiesta interacciones con otros tipos de hemoglobinopatias de cadena beta. Estos heterocigotos dobles pueden sintetizar muy poca hemoglobina A, produciéndose el cuadro clinico del homocigoto

para la otra hemoglobina anormal. Esto es lo que ocurre en la enfermedad drepanocitosis-talasemia, en la que casi toda la hemoglobina puede estar formada por hemoglobinas S y F.[122]

Otra variante de la talasemia beta es la hemoglobina Lepore, que se manifiesta por anemia hipocrómica ligera y eritrocitos con morfología característica de talasemia. En estas condiciones, no sólo está disminuida la síntesis de cadenas beta, hay también una alteración estructural de dichas cadenas. La hemoglobina Lepore se acompaña de disminución de hemoglobina A, ligero aumento de hemoglobina F, y una cantidad normal o disminuida de hemoglobina A_2.[103]

Los pacientes heterocigotos para talasemia alfa presentan un cuadro clínico similar al de la talasemia beta heterocigota, con anemia hipocrómica microcítica ligera, acompañada de eritrocitosis y poiquilocitosis. Se diferencia de la talasemia beta en cuanto a que no está aumentada la producción de hemoglobina A_2 o F dado que está disminuida la producción de cadenas alfa contenidas en estas hemoglobinas. La talasemia alfa no manifiesta interacciones con hemoglobinopatías de cadena beta, como la HbS o la HbC, pero sí con hemoglobinopatías que afectan la cadena alfa (HbI y HbQ).[118]

TALASEMIA MENOR

Esta clase de talasemia presenta una anemia moderada del tipo hipocrómico microcítico. A menos que el paciente sea descubierto como parte de un estudio familiar en el sea el individuo más

severamente afectado, la anemia es detectada de manera incidental durante un contacto médico con otros propósitos.

En adición a las moderadas anormalidades hipocrómicas microcíticas, los eritrocitos de estos pacientes exhiben una leve poiquilocitosis y formación de células blanco. La médula ósea presenta una moderada hiperplasia eritroide. La vida media de los eritrocitos puede verse levemente reducida, y puede detectarse un bazo palpable. Se pueden detectar cuerpos de inclusión derivados de las cadenas de globina en pacientes esplenectomizados. Puede presentarse una eritropoyesis infectiva en grado moderado.

HEMOGLOBINA H (HbH)

La enfermedad de hemoglobina H (HbH), es otra forma de talasemia alfa que ocurre en familias con talasemia alfa heterocigota. El cuadro clínico se parece mucho al de la talasemia intermedia. La hemoglobina H está formada por un tetrámero de cuatro cadenas beta y probablemente sea resultado de un aumento en la síntesis de cadenas beta, mayor que de cadenas alfa, con polimerización del exceso de cadenas beta para formar la hemoglobina H. Esta hemoglobina emigra más rápidamente que la hemoglobina A en electroforesis de bloque de almidón, y puede corresponder del 10 al 34% de la hemoglobina total. Como la hemoglobina de Bart, la HbH tiene mucha afinidad por el oxígeno, lo que dificulta proporcionar oxígeno a los tejidos. La hemoglobina H es inestable y susceptible de oxidación, precipitándose en voluminosos cuerpos de Heinz que pueden

observarse con tinción supravital en frotis de sangre, sobre todo después de la esplenectomía. Existen algunas pruebas de la duplicación del foco de la cadena alfa en el hombre, de manera que las variaciones en cuanto a la gravedad de la talasemia alfa podrían obedecer a la herencia de un número variable también del mismo gen para talasemia, así como al hecho de que genes diferentes puedan ocasionar una enfermedad de gravedad variable.[103]

La producción de α-talasemia mayor se debe típicamente a una condición de doble heterocigoto, tal como una α-talasemia 1/α-talasemia 2, donde sólo uno de los cuatro genes alfa es funcional. El cuadro clínico y hematológico es similar al descrito para la talasemia mayor. El diagnóstico específico de la α-talasemia mayor se establece mediante el laboratorio, con la presencia de hemoglobina de Bart y hemoglobina H. Se encuentra una pequeña cantidad de HbA, tal vez un 25%. Si uno de los alelos es una hemoglobina mutante del tipo talasémico, tal como la hemoglobina de Constant Spring, podría estar presente también en pequeñas cantidades. Con una enfermedad de este grado de severidad, el paciente es normalmente transfusión-dependiente. Dado que un alelo de α-talasemia 1 se encuentra normalmente presente en este síndrome, nuevamente es más comunmente encontrado en el sureste asiático, aunque se ven casos de manera frecuente en poblaciones mediterráneas.[122]

Aunque los síntomas clínicos de la talasemia son de tipo alfa y beta, se ha descrito una disminución en la síntesis de cadenas gamma y delta, pero sin secuelas clínicas.[103]

Se han identificado a 7 pacientes con enfermedad de HbH como homocigotos para una mutación en el sitio de poliadenilación (AATAA----AATAAG), y comparado sus datos hematológicos con aquellos de pacientes HbH que tienen otros tipos de determinantes δ-talasémicos. Los 7 pacientes exhibieron una anemia moderada con microcitosis e hipocromia siendo similar a lo observado en los otros pacientes. En relación con una heterocigosidad para esta mutación, los pacientes estarían en la frontera de la microcitosis y de la hipocromia sin una anemia significante, pero con una baja proporción de la síntesis in vitro de las cadenas alfa/beta. Los análisis de los componentes de la hemoglobina identificaron bajos niveles de HbA_2 y HbH, que fueron comparables a aquellos encontrados en otros pacientes con enfermedad de HbH; el nivel de la cadena zeta fue bajo (una media de 0.14%).[121]

HEMOGLOBINA E (HbE)

Se considera a la hemoglobina E como una variante de talasemia, por lo que se le asocia, frecuentemente, a los trastornos que esta ocasiona.[34]

La enfermedad de la hemoglobina E se caracteriza por una anemia microcítica normocrómica poco severa, con muchas células blanco. En algunos sujetos se presenta esplenomegalia. Tanto la fragilidad osmótica como la vida media de los eritrocitos están disminuidas. El estado heterocigoto es clínicamente silencioso.[122]

Las enfermedades de talasemia-hemoglobina C y talasemia-hemoglobina E son procesos clínica y hematológicamente similares. En ambas hay esplenomegalia, ligera anemia hipocrómica, células

en diana, y aumento de resistencia a las soluciones salinas hipotónicas.

Se realizó un estudio en el que se colectaron muestras de sangre con un porcentaje incrementado de células blanco de pacientes con enfermedad hepática, talasemia, homocigotos de hemoglobina E (E/E) y casos no identificados. También se incluyeron en el estudio, como controles, casos normales sin antecedentes de enfermedad hepática y con hemoglobina normal. Los pacientes con enfermedad hepática, tuvieron un alto porcentaje de células blanco con MCV normal, mientras que los otros tres grupos también tuvieron un incremento en el porcentaje de células blanco, pero un MCV disminuido. La diferencia fue más obvia cuando se compararon los casos de enfermedad hepática y los de HbE homocigótica. Estos dos grupos tuvieron porcentajes comparables de células blanco (14.36 +/- 4.77 en enfermedad hepática, y 14.22 +/- 1.59 en HbE homocigótica) y un grado comparable de anemia (nivel de Hb en enfermedad hepática = 11.19 +/- 0.39, y 11.30 +/- 0.16 en hemoglobina homocigótica HbE) pero demostraron una significancia estadística (p menor a 0.0001) entre MCV (79.66 +/- 2.18 fL en enfermedad hepática, y 60.40 +/- 0.75 fL en HbE homocigótica). Es, por lo tanto, necesario discernir entre ambas enfermedades.[64]

Winichagoon y cols., estudiaron factores genéticos que determinan la severidad de la anemia de la ß-talasemia y de la enfermedad producida por HbE, en 90 pacientes quienes tuvieron niveles de hemoglobina, en estado constante, en un rango de 4.2 a

12.6 g/dl. La co-herencia de la α-talasemia 2 y la hemoglobina Constant Spring, podrian disminuir de manera significante la severidad de la enfermedad. La herencia de un cromosoma ß-talasemia con un sitio de división Xmn 1 en posición -158 del gen de la globina G gamma el cual fue vinculado al haplotipo -+-++ O ++-++, se asoció con una anemia poco severa. Fueron necesarias dos copias de estos alelos para producir un efecto clinicamente significante. La expresión incrementada del gen de la globina G gamma y la elevada producción de la hemoglobina F, la cual podria reducir, de manera general, el desequilibrio de la cadena de globina, se asociaron también con homocigotos para el sitio de división Xmn 1 y asi, con una anemia menos severa. Sin embargo, este efecto no se observó en el sitio de división Xmn 1 de los heterocigotos. Si los efectos del polimorfismo del sitio Xmn 1, la concentración de HbF y la relación G gamma/A gamma actúan separadamente o a través de mecanismos comunes en la reducción de la anemia, es algo que deberá ser comprobado.[113]

Como se mencionó anteriormente, las hemoglobinas E y Constant Spring (CS) son conocidas por presentar efectos semejantes a los de la talasemia. Realizando una investigación sobre los cambios fisicos en los eritrocitos, en estas dos anormalidades, para poner en claro la diversidad de cambios eritrocitarios entre la talasemia propiamente dicha y los rasgos talasémicos provocados por hemoglobinas anormales (HbE, representante de la ß-talasemia, y HbCS, representante de la α-talasemia), se llevó a cabo un estudio en el que se incluyeron 11 casos de HbCS homocigota (CS/CS), 7 sujetos HbE homocigotos (E/E) y un caso doble

heterocigoto con HbCS y HbE. Los eritrocitos fueron analizados en un analizador H*1. Los eritrocitos E/E tuvieron un MCV significativamente menor al de los eritrocitos CS/CS ($p<0.001$). La disminución del MCV de los eritrocitos E/E fue atribuido a un marcado incremento en el porcentaje de microcitos y a una importante disminución en el porcentaje de macrocitos, comparados con los de los eritrocitos CS/CS. El grado de heterogeneidad en el volumen celular, como indica la anchura de distribución de los eritrocitos, no fue tan diferente entre las dos hemoglobinas anormales contenidas en los eritrocitos. También fue notorio que los casos de CS/CS tuvieron un incremento más significante en los eritrocitos pequeños, que los casos de E/E.

La baja concentración de hemoglobina intraeritrocitaria de las células CS/CS comparada con la de las células E/E, muestra lo siguiente: concentración media de hemoglobina celular (CHCM) ($p<0.001$), por ciento de eritrocitos hipercrómicos ($p<0.001$), y anchura de distribución de hemoglobina (HDW) ($p=0.0367$). Fueron encontrados valores elevados para el MCH ($p<0.001$) y en el porcentaje de células hipocrómicas ($p<0.001$) de las células CS/CS. Los eritrocitos de ambos fenotipos tuvieron un decremento significante en la deformabilidad.[116]

COMPLICACIONES

Manifestaciones Cutáneas

Las manifestaciones cutáneas más frecuentes de la enfermedad son úlceras o cicatrices no dolorosas de extremidades inferiores,

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

que pueden observarse en aproximadamente el 75% de los adolescentes o adultos que sufren la enfermedad. Las úlceras son raras en sujetos muy jóvenes (niños).[83] Estas lesiones, de bordes netamente definidos, suelen ser únicas, pero en ocasiones son múltiples y bilaterales. 100 pacientes con ß-talasemia homocigota o doble homocigota (62 con la forma mayor y 38 con la forma intermedia) fueron examinados por signos de pseudoxantoma elástico (PXE). Se diagnosticaron lesiones en la piel de 16 pacientes con cada una de las formas de la enfermedad básica. El 20% de todos los pacientes tuvieron venas angioides (AS); ambas lesiones se encontraron en el 10% de los pacientes; 26% tuvieron una o ambas de estas manifestaciones. Se encontró una correlación positiva entre la presencia de una o ambos tipos de lesiones y la edad de los pacientes (P= 0.032). No existen diferencias para tomar en consideración la ferritina ni los niveles de hematocrito, número de unidades transfundidas, terapia de quelación y el estado esplénico entre los pacientes en los que se encontraron con hallazgos de PXE/AS y aquellos que no los tenían. La patogénesis de estas manifestaciones del tejido conectivo en tan elevada frecuencia en la ß-talasemia, no está clara; se discuten las posibilidades de su existencia, contraída o heredada, siendo esta última la interpretación más aceptable.[91]

Manifestaciones Cardiacas

Se han señalado varios tipos de anomalías cardiacas en una proporción que varía del 50 al 91%. El más corriente es un soplo sistólico o apical, en la mayor parte de los casos. Aunque raros,

se han señalado soplos mitrales, aórticos y pulmonares diastólicos. El agrandamiento cardiaco, que suele afectar ambos ventrículos, es común y se ha atribuido a la anemia crónica. De hecho, la falla por congestión cardiaca es la causa más común de muertes en jóvenes con talasemia mayor.[93] En algunos pacientes se desarrolla corazón pulmonar, probablemente en consecuencia de infarto de los pulmones e hipertensión de la pequeña circulación. Se observan anomalías electrocardiográficas, como prolongación del intervalo PR y cambios menores en segmentos ST y onda T, pero no son específicos.

Manifestaciones Hepáticas, Renales y Esplénicas

Las manifestaciones más frecuentes de choque son palidez extrema, debilidad, letargia, taquicardia y piel fría y húmeda. El signo principal en la autopsia ha sido una intensa congestión de órganos internos, especialmente hígado y bazo, con eritrocitos semilunares. El tratamiento de lo que se ha llamado "crisis de secuestro esplénico" consiste fundamentalmente en corregir la hipovolemia por transfusiones de sangre. En 1991, se describió un caso de crisis de secuestro esplénico fatal agudo en un paciente con β-talasemia. Anteriormente, no se había descrito un caso como este.[97]

En pacientes de mayor edad puede observarse insuficiencia renal crónica. La congestión glomerular y el agrandamiento en fase temprana de la enfermedad, seguido de isquemia progresiva,

fibrosis y obliteración de los glomérulos, se cree que es la causa de la disminución progresiva de la filtración glomerular en el curso del trastorno. La infección crónica con el virus de la hepatitis C (HCV) y la sobrecarga de hierro son las causas principales de la enfermedad crónica hepática en sujetos con ß-talasemia homocigota. Se ha demostrado también, que la aplicación de α-interferón reduce la viremia y la necroinflamación en pacientes con hepatitis C.[77]

Dado que los pacientes con talasemia mayor dependen de transfusiones, tienen particularmente un alto riesgo de contraer una hepatitis post-transfusional. En 1993, 36 niños transfusión-dependientes (T-P) fueron estudiados para evidenciar la hepatitis viral. De 23 pacientes con incremento en sus niveles de transaminasa, 17 tuvieron anticuerpos de citomegalovirus (CMV) y 12 resultaron con anticuerpos de hepatitis viral C (HCV) positivos, 9 fueron positivos tanto para CMV como para HCV. De 13 niños con niveles normales de transaminasa, 5 fueron CMV positivos y 3 fueron HCV positivos. Estos resultados demuestran que el CMV puede ser una causa muy común de hepatitis no-A y no-B en los niños talasémicos T-P.[84]

Manifestaciones Nerviosas

Dentro de las alteraciones del sistema nervioso central que se han relacionado con procesos ß-talasémicos, se encuentra la compresión crónica del cordón espinal por hematopoyesis epidural extramedular. Esto se detectó en un individuo de 27 años de edad con ß-talasemia/HbE que se presentó con signos y síntomas de

compresión medular. En este paciente, la imagen por resonancia magnética nuclear demostró una constricción del cordón espinal y atrofia del mismo sugiriendo que este proceso patológico fue antiguo. En las imágenes transversales se observó una elevada intensidad dentro del cordón espinal que sugiere una mielomalacia del cordón espinal postcompresiva o bien una gliosis.[62,89]

Manifestaciones Oftálmicas

La alfa+-talasemia homocigota (alfa-/alfa-) mejora algunas de las manifestaciones clínicas de la anemia falciforme homocigota (SS), pero sus efectos sobre las complicaciones retinianas permanece desconocida. Estas han sido valoradas mediante el examen visual y por angiografía con fluoresceína. Los resultados indican que la alfa+-talasemia homocigota reduce la extensión del cierre de los vasos periféricos de la retina, pero no tiene un efecto aparente sobre la frecuencia de la retinopatía falciforme proliferativa.[54,78]

Manifestaciones Oseas

En la talasemia mayor, el contenido mineral y la densidad ósea sufren una disminución a nivel del sistema trabecular; esta disminución es del orden del 34% en el caso del contenido mineral, y del 4% en el caso de la densidad ósea. También la región cortical se ve afectada con una disminución de los parámetros anteriores siendo ésta del orden del 24% en el caso del contenido mineral, y del 3% en el caso de la densidad ósea. Como es evidente, los pacientes que sufren una frecuencia mayor

de fracturas de miembros superiores, son aquellos cuya disminución ósea es mayor; esta disminución se presenta de manera más constante en pacientes que reciben un número proporcionalmente menor de transfusiones sanguíneas y en los que su tratamiento incluye la administración de desferrioxiamina en cortos periodos de tiempo.[38,52]

Entre los pacientes afectados con talasemia, existe una elevada frecuencia de anormalidades osteoporóticas. En un estudio que involucró a 72 pacientes con ß-talasemia homocigota, a quienes se examinó clínica y radiológicamente, se detectó una elevada incidencia de cambios esqueléticos, incluyendo una alta discrepancia en la longitud de los miembros (16.6%), una desviación axial de los miembros (8.3%), osteoporosis (2.7%) y osteopenia (25%). Estas lesiones, se supone que son causadas principalmente por hiperplasia de la médula ósea, la hiperactividad de la misma médula que provoca a su vez el ensanchamiento del espacio medular y el consecuente incremento de la presión intramedular causante de la osteoporosis.[42,44]

El dolor en las articulaciones es frecuente, pero el edema de las mismas es raro. Desde 1977, se han publicado varios reportes concernientes al sistema locomotor implicados en la talasemia menor. De manera general, el 52% de los pacientes con talasemia menor tiene dentro de su historial clínico complicaciones variables en este sistema, siendo la artralgia el hallazgo más frecuente y las articulaciones principalmente involucradas son manos (muñecas) y hombros.[49]

Manifestaciones Fetales

La hidropesía de Bart, es la forma más severa de la α-talasemia. Un estudio hemodinámico de esta alteración demostró que los fetos tuvieron un estado circulatorio hiperdinámico y fueron también más acidóticos, hipóxicos e hipercárdicos que los fetos normales. Los defectos moleculares más comunes de la Hb de Bart en la hidropesía fetal fue del tipo supresión. El diagnóstico prenatal de la hidropesía fetal por Hb de Bart y de la HbH ha sido llevado a cabo usando muestras de vellosidades coriónicas o de sangre fetal.[94]

Otras Manifestaciones

En los últimos 18 años se han observado 24 casos de hipoparatiroidismo (HPT) en talasemia mayor. En el presente, 4.5% de pacientes seguidos regularmente, tienen esta complicación. El HPT está llamado a ser principalmente la consecuencia de deposición de fierro en las glándulas paratiroides. La edad de los pacientes, cuando les fue diagnosticado el HPT, oscilaba en un rango de 11 a 24 años (media de 16.5 años). Sus niveles de ferritina sérica cubrieron un rango de 810 a 15,200 ng/ml (media de 3,772 ng/ml). La severidad del HPT fue muy variada. Sólo en 3 pacientes se presentó hipocalcemia severa con signos de tetania, ataques o fallas cardíacas. El ataque de HPT fue precedido o seguido en la mayoría de los pacientes por otras complicaciones cardíacas o endocrinas. No se ha encontrado una clara relación entre el HPT y los niveles de ferritina sérica en los pacientes, sugiriendo cada uno de ellos una sensibilidad individual a la

toxicidad férrica o daño temprano en la glándula paratiroides antes de la quelación, presentando una reducción en la sobrecarga de hierro. Sin embargo, el diagnóstico de casos no recientes de HPT, en los últimos 3 años, coinciden con el gran mejoramiento de las terapias de quelación sugiriendo que ésta puede ser de gran ayuda para la prevención del desarrollo de HPT.[83]

Al parecer, también existe una relación estrecha de la talasemia con la caries dental y la gingivitis. 21 pacientes pediátricos con talasemia mayor y 83 controles sanos (infantes) fueron examinados por caries dental y gingivitis. Se colectaron, de cada niño, las secreciones estimuladas de la glándula parótida. Se midió la proporción del flujo de saliva de la parótida y las muestras de saliva se estudiaron para determinar calcio, fósforo, potasio, urea, lisozima y niveles de inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM). Los resultados demostraron que los casos de caries dental fueron significativamente más altos en el grupo de talasemia mayor. Las proporciones en el flujo de saliva en los pacientes con talasemia mayor no fueron muy diferentes del grupo control. Sin embargo, las concentraciones medias de saliva respecto al fósforo e IgA fueron significativamente más bajas en los pacientes que en los controles. La concentración de lisozima fue también menor en el grupo de talasemia mayor, pero la diferencia no fue estadísticamente significante. Los hallazgos podrían proporcionar una explicación para las elevadas experiencia de caries dental y gingivitis observadas en el grupo de talasemia mayor.[90]

La necesidad imperiosa de recibir transfusiones sanguineas, de los pacientes ß-talasémicos dependientes transfusionales, causa a su vez, que estos estén expuesto a cualquier tipo de infección relacionada con la sangre. Tal es el caso de la infección producida por el HIV y el HILV. En un total de 1305 pacientes con ß-talasemia, en 1990, se detectaron anticuerpos para HIV-1, HIV-2, HILV-1 y HILV-11 en 2.76, 0, 0.23 y 0.08% de los pacientes, respectivamente. El riesgo residual de una infección por HIV-1 en una transfusión directa, después de la implementación de la búsqueda de anti-HIV-1 en sangre de donadores, fue de aproximadamente 1:50,000 unidades de sangre; esto basado en un número aproximado de 200,000 unidades de sangre administrados al grupo de 1305 pacientes estudiados, de 1986 a 1990.[95]

PRUEBAS DIAGNOSTICAS

En este capitulo, se tratarán los métodos de diagnóstico más recientes, para la identificación de las diversas hemoglobinas anormales. Evidentemente, varios de estos métodos harán referencia a las hemoglobinopatias más comunes, ya sea por su frecuencia o bien por la importancia clinica que estas representen.

En estos últimos años, el diagnóstico y la consideración de lás personas afectadas de enfermedades genéticas han experimentado un cambio enorme. Hace algunas décadas, sólo podia basarse en la interpretación de los síntomas para establecer un diagnóstico. Frecuentemente, se trataba de la presencia de células anormales, visibles en microscopia óptica. De este modo, se descubrió que individuos de raza negra afectados por episodios agudos de ataques cardiacos poseian glóbulos rojos en forma de hoz. Paralelamente a los progresos de la bioquimica, algunas de estas enfermedades celulares pudieron explicarse por la existencia de anomalias en ciertas proteinas. Asi, los quimicos L. Pauling y V. Ingram demostraron en 1949 que la drepanocitosis se debe a una forma de hemoglobina anormal (hemoglobina S), incapaz de fijar correctamente el oxigeno.[104]

Fuera del ámbito netamente bioquimico, nos encontramos ahora con diagnósticos basado en el empleo de técnicas genéticas que nos permiten identificar y diagnosticar de manera eficaz, rápida y confiable, los desordenes moleculares que se traducen en

enfermedades dificilmente detectables mediante las técnicas ordinarias de laboratorio.

El diagnóstico de cualquier desorden sanguineo inicia con una historia concisa y un examen médico completo.

DREPANOCITOSIS (HbS)

En el paciente común, con anemia de células falciformes, la hemoglobina y el número de glóbulos rojos están disminuidos hasta aproximadamente la mitad de los valores normales. La anemia es normocítica y normocrómica, a menos que hayan factores de complicación. En el frotis teñido de sangre periférica suelen observarse unas pocas formas semilunares, pero lo mas notable es la intensidad de anisocitosis, poiquilocitosis, y presencia de células en diana; también es frecuente la presencia de eritroblastos. Se han observado células fragmentadas y otras anomalías, como suelen verse en la hemólisis por impacto en pacientes con drepanocitosis y embolias pulmonares. El número de leucocitos suele hallarse entre 12000 y 16000 por mm^3; se han señalado valores entre 4000 a 69000 por mm^3. El número de plaquetas suele ser normal pero no son raros valores mayores a $1x10^6$ por mm^3.[74]

Se observan los signos de laboratorio de proceso hemolítico, a menos que se trate de una fase aplásica. El número de reticulocitos suele ser mayor de 20%. La cantidad de bilirrubina de reacción indirecta en el suero está aumentada, pero no suele exceder de 3 mg/100 ml, a menos de que exista alguna complicación hepatobiliar. La excreción diaria de urobilinógeno fecal varía

espontáneamente, y disminuye después de transfusiones de sangre completa. El hierro plasmático es normal o está aumentado, y la capacidad de fijación del mismo es normal.

El examen de la médula ósea suele revelar hiperplasia eritrocítica del tipo normoblástico, acompañada de hiperplasia de células mieloides. En ocasiones, una hiperplasia prolongada de la médula origina deficiencia de folato, que puede manifestarse por eritropoyesis del tipo megaloblástico. Durante una crisis hipoplásica se ha observado aplasia aguda pasajera de la médula. Pueden observase formas semilunares de eritrocitos adultos y de glóbulos rojos nucleados con material obtenido de la médula. Se ven eritrocitos filamentosos largos más frecuentemente en preparaciones de médula que en las obtenidas de sangre periférica.[58]

Existe un parámetro interesante en lo que respecta a los niveles de fosfatasa alcalina sérica, las isoenzimas de fosfatasa alcalina y la excreción de hidroxiprolina urinaria. La fosfatasa alcalina total es significativamente elevada en pacientes jóvenes con anemia falciforme. En las pruebas de inactivación por calor y electroforesis de las isoenzimas, indican que es en el hueso donde está la isoenzima predominante en los pacientes. La excreción de hidroxiprolina es evidentemente mayor en los pacientes con anemia falciforme que en los sujetos sanos y la fosfatasa alcalina sérica total se relaciona de una manera contundente con la excreción de hidroxiprolina urinaria en los pacientes con anemia falciforme. Tanto la fosfatasa alcalina como la hidroxiprolina se incrementaron con la edad en los pacientes

con esta enfermedad. Lo anterior sugiere que el retraso del crecimiento y/o la destrucción ósea pueden contribuir a los niveles elevados de la fosfatasa alcalina y de la hidroxiprolina urinaria.[59]

En pacientes cuyos glóbulos rojos adoptan forma semilunar la velocidad de sedimentación no está tan aumentada como suele ocurrir en pacientes con un grado similar de anemia. La estasis prolongada de la sangre venosa disminuye la velocidad de sedimentación porque se produce deformación falciforme.

Los eritrocitos de la anemia drepanocítica son anormalmente resistentes a las soluciones salinas hipotónicas. En una serie, el valor medio para iniciar la hemólisis era de 0.35%, y para completarla de 0.22%. Algunos de los glóbulos no se hemolisaban en agua destilada. La fragilidad mecánica de los glóbulos es normal cuando tiene forma discoide, pero aumenta si se produce deformación semilunar por exposición al anhídrido carbónico.

El fenómeno característico de la adopción de forma semilunar puede demostrarse en preparaciones húmedas con cubreobjetos bien cerrados, según la técnica de Emmel. Los inconvenientes del método de cubreobjetos son el tiempo necesario para que ocurra el cambio de forma que se vuelve semilunar, incluso en pacientes con anemia drepanocítica, y la observación de resultados negativos falsos. Se han descrito por lo menos otras 14 pruebas que producen formas semilunares. De acuerdo a la experiencia, resulta satisfactorio el método del metabisulfito sódico.

También es útil el método de la electroforesis de la hemoglobina para distinguir muchos pacientes con anemia

drepanocitica de los que tienen simplemente el carácter falciforme combinado con alguna otra anemia independiente, y de los pacientes que son heterocigotos para dos hemoglobinas anormales. Es fundamental recurrir a la electroforesis durante el estudio de los pacientes en quienes las pruebas preliminares, por ejemplo la prueba Sickledex, basadas en la anomalias de solubilidad de la hemoglobina S dieron resultados anormales.

No suele haber dificultad para establecer el diagnóstico de anemia drepanocitica si se piensa en ella. Una prueba positiva de adopción de forma semilunar indica que el paciente tiene el carácter heterocigoto o sufre anemia drepanocitica. La demostración de la aparición de células falciformes en un paciente anémico no establece el diagnóstico de la anemia drepanocitica, porque el carácter falciforme es común en pacientes de raza negra que pueden sufrir anemia por cualquier otra causa. Cabe efectuar un diagnóstico equivocado de anemia drepanocitica en pacientes que tienen el carácter falciforme y han perdido sangre en forma crónica o sufren anemia perniciosa, a menos que se lleven a cabo los estudios adecuados. Si el paciente no ha recibido transfusiones en fecha reciente, el diagnóstico de anemia drepanocitica casi siempre puede establecerse o excluirse por electroforesis de la hemoglobina. El descubrimiento de una anemia relativamente leve acompañada de prueba positiva de aparición de formas semilunares en un paciente que tiene esplenomegalia intensa debe hacer sospechar que sufre una combinacion de carácter semilunar y otra anomalia hemoglobinica,

como hemoglobina C, más que anemia drepanocítica. La electroforesis de la hemoglobina constituye el método más útil para distinguir la anemia drepanocítica de la enfermedad semilunar por hemoglobina C y otros trastornos que dependen de la existencia simultánea de hemoglobina semilunar con otra hemoglobina anormal. Cuando se produce la substitución del segundo aminoácido de la hemoglobina Memphis junto con la presencia de hemoglobina S homocigótica, hay una mejoría de la viscosidad de la sangre drepanocítica, de manera que las crisis dolorosas son raras. Es necesario el análisis de los aminoácidos para establecer el diagnóstico, pues la imagen electroforética es la de una hemoglobina S homocigótica.

Si no se piensa en un diagnóstico de drepanocitosis, la enfermedad puede considerarse erróneamente fiebre reumática cuando un paciente sufre anemia, molestias articulares, fiebre, agrandamiento cardíaco y soplos en el corazón. La ausencia de dolores intensos, hinchazón e hipersensibilidad de las articulaciones, que suelen observarse en la fiebre reumática, puede ayudar a distinguir estas dos enfermedades. En otros pacientes con signos de proceso intrabdominal agudo, puede ser difícil establecer el diagnóstico adecuado porque enfermos con anemia drepanocítica a veces sufren urgencias quirúrgicas como cualquier otra persona, pero también desarrollan signos de enfermedad intrabdominal aguda a consecuencia de la simple anemia falciforme. Hay que tener presentes ambas posibilidades cuando se ve al paciente; la decisión se establecerá fundándose en los

signos del momento. La anemia de células falciformes debe diferenciarse de otras enfermedades que causan úlcera de las extremidades, y de las que producen síntomas y signos de participación del sistema nerviosos central. La drepanocitosis se ha confundido con artritis reumatoide, osteomielitis, poliomielitis, meningitis, accidentes vasculares cerebrales, hepatitis y otros procesos.

TALASEMIA MAYOR

La talasemia mayor se caracteriza por anemia de tipo microcítico hipocrómico, suele ser intensa, pero el número de eritrocitos puede variar entre 1 y 4 millones por mm^3. El VCM suele ser menor de 60 a 70 milímicras cúbicas. La CCMH no es tan intensa como la disminución de la HCM. Puede disminuir la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos. Comparando la fragilidad osmótica con la inclusión marcada de HbH modificada, se encontró que ésta última prueba fue superior con un 100% de sensibilidad en la detección de α-1-talasemia heterocigótica, y fue, además, específica como un examen confirmatorio de talasemia. Los índices eritrocitarios son, sin embargo, las herramientas de búsqueda básicas y pueden ser usados junto con la inclusión marcada de HbH modificada. La fragilidad osmótica no es mejor que los índices eritrocitarios y tampoco es una prueba confirmatoria.[14]

Suelen observarse, en la talasemia mayor, otros caracteres comunes a casi todas las anemias hemolíticas: aumento de la bilirrubina de reacción indirecta del suero y de urobilinógeno en

heces y orina, incremento del hierro férrico y disminución de la capacidad latente de fijación de hierro. Además, los eritrocitos son anormalmente resistentes a la hemólisis en solución salina hipotónica; la hemólisis puede no ser completa en solución al 0.2% o incluso en agua destilada.

Uno de los caracteres hematológicos típicos de la talasemia es la presencia de grandes cantidades de hemoglobina F. Esta hemoglobina constituye del 50 a más del 90% de la total en algunos pacientes con talasemia mayor. La presencia de hemoglobina A_2, generalmente en cantidades aumentadas, se observa en casi todos los pacientes con talasemia menor al efectuar electroforesis de hemoglobina sobre láminas de algodón. Algunos pacientes presentan cantidades normales de hemoglobina A_2 con aumento de la hemoglobina F; una proporción todavía menor de pacientes muestra aumento de las dos variedades.

El aspecto del enfermo típico de talasemia mayor puede hacer sospechar el diagnóstico. No suele ser difícil por la evidente hepatosplenomegalia, la anisopoiquilocitosis, células en diana y normoblastos en los frotis sanguíneos, signos de hemólisis y presencia de cantidades aumentadas de hemoglobina F.

Aunque el diagnóstico de talasemia mayor raramente resulta difícil, no siempre es fácil distinguir las formas más ligeras de talasemia de otros tipos de anemia hemolítica y de diversas hemoglobinopatías. La aparición de microcitosis hipocrómica (con anemia o sin ella), células en diana, glóbulos rojos nucleados y hematíes punteados en sangre periférica de una persona joven con hepatosplenomegalia hará sospechar el diagnóstico. En otros

momentos, el problema puede plantearlo una anemia microcítica hipocrómica que deba distinguirse de una ferropenia. En casos dudosos, es muy útil la determinación de la concentración sérica de hierro (baja en la ferropenia y normal o alta en la talasemia) o la estimación de las reservas de hierro en la médula ósea. Hallar policitemia microcítica a veces constituye la primera indicación de talasemia. De hecho, las dos causas principales de la anemia microcítica hipocrómica son la deficiencia de hierro y la talasemia. Los análisis discriminantes basados en una simple combinación de los índices eritrocitarios clásicos, han sido usados para diferenciar entre una anemia y una talasemia con diversos grados de precisión. Se dispone ahora de dos nuevos índices, gracias a los modernos contadores de células: la amplitud de la distribución de los eritrocitos (RDW) y la distribución de la concentración de hemoglobina (HDW). Los análisis discriminantes sugieren que la RBC, el MCHC y el RDW contribuyen significativamente a la diferenciación entre la anemia por deficiencia de hierro y la talasemia, tanto en donadores sanos como en pacientes hospitalizados. En el proceso discriminatorio, trabajos previos han pasado por alto la heterogeneidad de la anemia entre los diferentes grupos ahémicos, así como las diferencias biológicas en el volumen medio corpuscular (MCV) y la hemoglobina media corpuscular (MCH) entre los sujetos con alfa y beta talasemia. Se ha probado que la diferenciación entre la deficiencia de hierro y la talasemia por análisis discriminantes, es clínicamente confiable y se ve poco afectada por la severidad de la anemia. La selección de los

índices eritrocitarios que contribuyen a la discriminación de la anemia microcítica hipocrómica, estuvieron basados en consideraciones biológicas y estadísticas.[15] En 113 individuos se identificaron 18 mutaciones diferentes correlacionadas con valores de volumen corpuscular medio y, estadísticamente, los valores de MCV de estos individuos se encontraron dentro de un rango muy amplio (56.3 a 87.3 fl)). En casi todos los casos, los portadores de grado de mutación beta tuvieron un MCV por abajo de 67 fl, mientras que apenas unos pocos heterocigotos beta+ tuvieron MCVs cerca de este límite. La media de MCV de portadores de grado beta fue, estadísticamente, más bajo que la de heterocigotos beta+. Las diversas mutaciones beta+ fueron asociadas con diferencias significantes en los valores medios de MCV. Por el contrario, todas las mutaciones que no eran de grado beta tuvieron virtualmente rangos idénticos de MCV. Los resultados indican que el grado de reducción en MCV está directamente relacionado con la severidad de la mutación. Las desviaciones, en 4 casos, fueron asociadas con rearreglos comunes del gen alfa, mientras que en otros 3 casos, el MCV de heterocigotos β-talasémicos es un parámetro valorable en estrategias de planificación para una rápida identificación de mutaciones en poblaciones con una gran diversidad mutacional. Este uso puede ser particularmente ventajoso en el marco del diagnóstico prenatal. El patrón de los valores de la MCH fue similar al patrón de MCV. Sin embargo, los resultados sugieren que la MCH puede ser prioritaria para realizar una detección en una población de investigación.[16]

Se ha planteado una funcion discriminante entre los genotipos para hemoglobina H y para hemoglobina H/SC. Esta función refiere la relación entre el porcentaje de hipocromia y el porcentaje de microcitos (Hipo/Micro). En este planteamiento, se determinaron el volumen eritrocitario y la concentración de Hb en los eritrocitos individuales de 62 pacientes con enfermedad de HbH (37 con genotipo H <α-talasemia 1/α-talasemia 2> y 25 con genotipo H/SC <α-talasemia 1/Hb de Constant Spring>); las determinaciones fueron realizadas en un analizador celular del tipo H*1. Los 25 casos con genotipo H/SC, el más severo, tuvieron microcitos (volumen menor a 60 fl) menor al 35%, e hipocromia (concentración de Hb menor a 28 g/dl) mayor al 35%. El 76% de los pacientes (H/SC) tuvo una Hipo/Micro mayor a 2.5, mientras que en los pacientes con HbH (82%) fue menor de 2.5. El histograma del volumen eritrocitario fue también notablemente diferente entre los dos genotipos: el H/SC tuvo un pico máximo entre 60 y 90 fl, mientras que el genotipo H presentó un pico muy cerrado en 60 fl, indicando un mayor grado de microcitosis. El incremento de la hipocromia con una ligera disminución en el tamaño celular de los eritrocitos H/SC, sugieren que el pobre grado de hemoglobinización no estuvo vinculado o poco tuvo que ver en los disturbios de la síntesis de proteínas de membrana y en su montaje sobre la membrana plasmática.[30]

Es importante comprender la patofisiología de las talasemias humanas severas representadas por la ß-talasemia intermedia y la HbH (α-talasemia). Se ha demostrado previamente que las

propiedades de los materiales del eritrocito y su membrana son diferentes en la α- y ß-talasemia, y se ha demostrado también que esta diferencia es probablemente causada por la acumulación de cadenas de α-globina en el citoesqueleto de la ß-talasemia, mientras que las cadenas de ß-globina son asociadas con el citoesqueleto en el caso de la α-talasemia. Tanto en la α- como en la ß-talasemia, algunas de estas cadenas de globina se oxidan, siendo esto evidenciado por la pérdida de tioles libres. Además, hay evidencia similar en la oxidación de proteína 4.1 en la ß-talasemia, en tanto que la ß-espectrina parece ser sujeta a la oxidación en la α-talasemia. Estas observaciones apoyan la idea de que la asociación de la oxidación parcial de las cadenas de globina con el citoesqueleto conlleva a una oxidación de las proteínas esqueléticas adyacentes. La anormalidad de la proteína 4.1 en la ß-talasemia es congruente con la observación anterior respecto a la conocida importancia de esta proteína en la conservación de la estabilidad de la membrana, una propiedad que es anormal en las membranas ß-talasémicas.[57]

También recientemente, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal murino (mAb) específico para la cadena delta de la hemoglobina A_2, que no ocasiona reacción cruzada con las cadenas alfa, beta o gamma. El mAb reacciona con la hemoglobina P-Nilotic (híbrida beta delta), pero no con la Hb/Lepore-Boston (híbrida delta beta) indicando un "epítope" acorde con las posiciones 116 (Arg) y 117 (Asn) o 125 (Gln) y 126 (Met) de la cadena delta. Usando este anticuerpo, se estableció una prueba de ELISA rápida

y simple para la detección y cuantificación de HbA_2 en adulto, cordón y hemolisados fetales. Esta técnica supone una valiosa adición a los métodos corrientes para el diagnóstico de ß-talasemia basados en la cuantificación de HbA_2.[1]

Como ya se mencionó anteriormente, los frotis teñidos de sangre periférica muestran grados intensos de poiquilocitosis, anisocitosis y policromatofilia. Los eritrocitos se ven pequeños e hipocrómicos. Hay muchos hematíes punteados y "en diana". Los eritroblastos, que casi invariablemente existen, muchas veces se observan en gran número, incluso mayor que el de los leucocitos. Suele haber reticulocitosis, acompañada de hiperplasia normoblástica de la médula ósea. El número de leucocitos varía entre 10,000 y 25,000 por mm^3; a veces aparecen formas no maduras en la sangre periférica; el número de plaquetas suele ser normal.

TALASEMIA MENOR

En talasemia menor el número de glóbulos rojos suele ser normal o está aumentado, a pesar de que la hemoglobina y el hematocrito se hallan disminuidos. Los pacientes con ß-talasemia menor heterocigota tienen un decremento en el hematocrito (Hto). Ya que el Hto es un determinante primario de la viscosidad de la sangre total, la conocida reducción de este parámetro en la ß-talasemia menor podría conducir a una reducción medible de la viscosidad de la sangre total. La influencia del relativamente bajo volumen medio corpuscular y la consecuente elevación en la cuenta de eritrocitos y la ß-talasemia menor sobre la viscosidad de la sangre total usando un viscómetro microporoso, no ha sido

previamente objeto de investigación. Dado la anterior, la sangre de un grupo de sujetos normales y con ß-talasemia menor fue examinada con un viscómetro microporoso para elucidar posteriormente las relaciones entre la viscosidad de sangre total, el Hto y la cuenta de eritrocitos. Los datos muestran que para los sujetos normales y con ß-talasemia menor, existe una correlación positiva ($r = 0.65$, p menor a 0.01) entre el Hto y la viscosidad de la sangre total. Sin embargo, la pendiente de la regresión de la sangre total y del Hto de los sujetos con ß-talasemia menor, fue significativamente más alta que la de los sujetos normales ($z = 3.14$, p menor a 0.001). De este modo, para cualquier Hto dado, la viscosidad de la sangre total correspondiente fue más alta que los normales. Los estudios de la relación del conteo de eritrocitos con la viscosidad de la sangre total, indican que la elevada viscosidad a un Hto dado estuvo relacionada a la cuenta de los eritrocitos en los sujetos con ß-talasemia menor. A causa de las interacciones contrarias del Hto y de la cuenta de eritrocitos, la viscosidad media de la sangre total del grupo de sujetos con ß-talasemia menor examinado no fue significativamente más baja que la de los sujetos normales.[73]

En algunos de tales casos puede haber reticulocitosis con hiperbilirrubinemia ligera. En el frotis de sangre periférica son manifiestas las células en diana; existen anisocitosis, poiquilocitosis, policromatofilia y hematies punteados, mucho más prominentes de lo que podría suponerse por el grado de anemia presente.

El examen a simple vista de la fragilidad osmótica en un sólo tubo de ensaye de los eritrocitos se realizó, en un estudio, a sujetos divididos en cuatro grupos: (i) normal; (ii) portadores de rasgos ß-talasémicos probados; (iii) anemia por deficiencia de hierro; y (iv) otras hemoglobinopatías, para probar su eficacia como detector de ß-talasemia menor. La prueba tuvo éxito en la detección de 105/110 sujetos con rasgos de ß-talasemia. La sensibilidad del examen fue de 95.5% y su especificidad del 87%. El valor predictivo de la prueba positiva fue de 70.5%, en tanto que el de la prueba negativa fue de 98.3%. Esta prueba también fue positiva en 9/17 sujetos con HbS, 3/3 sujetos con HbD y en 1/1 sujetos con HbE. La prueba demostró ser simple, económica, fácil de realizar y adaptable para el campo de la investigación.[1]

En la talasemia la permeabilidad del catión en el eritrocito se ve incrementada, pero el incremento del bombeo del catión dependiente de ATP-asa mantiene una concentración normal de Ca^{++}, Na^{++} y K^{+}. Investigando las concentraciones eritrocitarias de Mg^{++} en ß-talasemia heterocigótica y en anemia sideropénica microcítica, fueron estudiados 25 controles sanos, 40 heterocigotos ß-talasémicos y 25 pacientes con anemia sideropénica. El Mg^{++} eritrocitario se ensayó mediante absorción atómica o por métodos estándar de laboratorio. El Mg^{++} fue significativamente menor en el grupo de ß-talasemia en comparación con los otros dos grupos (p menor a 0.001). El magnesio sérico fue ostensiblemente menor en los pacientes con anemia sideropénica con respecto a los pacientes ß-talasémicos y a los controles (p menor a 0.01), mientras que estos últimos dos

grupos presentaron valores similares. Estos resultados sugieren que el incremento en el bombeo del catión dependiente de ATP-asa no es suficiente para mantener las concentraciones eritrocitarias normales de Mg^{++} en la ß-talasemia heterocigota. En la anemia sideropénica la permeabilidad del catión no se ve incrementada, por lo tanto el Mg^{++} eritrocitario es normal. Los bajos niveles séricos de Mg^{++} en la anemia sideropénica podria ser explicada por un déficit primario de Mg^{++} asociado con la sideropenia misma.[48]

Tanto la demostración de un aumento en la resistencia de los eritrocitos a las soluciones salinas hipotónicas, como la de un aumento de hemoglobina A_2 por electroforesis, confirman el diagnóstico de talasemia. Puede ser difícil reconocer la presencia del gen de talasemia en pacientes que sufren alguna otra hemoglobinopatia hereditaria. Por ejemplo, una persona heterocigota para hemoglobina S y para ß-talasemia puede clinicamente sufrir anemia de células falciformes y presentar en la electroforesis solamente hemoglobinas S y F, por supresión de la hemoglobina A. Quizá sea necesario estudiar otros miembros de la familia para descubrir la verdadera índole del trastorno. En un estudio reciente (1991), la amplificación de genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido aplicada al diagnóstico prenatal de α- y ß-talasemias (1 y 5 casos respectivamente), HbLepore/ß-talasemia (1 caso) y fibrosis cistica (14 casos). Se emplearon muestras de vellosidad coriónica de diez semanas de embarazo y, en forma paralela, se analizó ADN

mediante mapeo convencional de genes. El diagnóstico definitivo o la exclusión de un feto afectado, fue posible en 17 de 21 casos así examinados. Según este estudio, la PCR reduce el tiempo requerido para el diagnóstico prenatal. La contaminación del ADN es una fuente potencial de error.[2]

Las enfermedades de talasemia-hemoglobina C y talasemia-hemoglobina E son procesos clínica y hematológicamente similares. En ambas hay esplenomegalia, ligera anemia hipocrómica, células en diana, y aumento de resistencia a las soluciones salinas hipotónicas.

TALASEMIA INTERMEDIA

En pacientes con talasemia intermedia en quienes la hiperabsorción de hierro puede originar serias disfunciones orgánicas, un medicamento de hierro quelado oralmente efectivo podría tener más ventajas terapéuticas, especialmente para los muchos pacientes con esta anormalidad en el Tercer Mundo.[39] En este contexto, pero en relación con la hemoglobina E, la afluencia de inmigrantes del sureste asiático hacia California en años recientes, ha dado como resultado un incremento dramático en los desórdenes de HbE, detectados en recién nacidos. Los patrones iniciales de la hemoglobina de FE (HbF/HbE) no distinguen entre los EE homocigotos, un estado benigno, y la E/ß-talasemia, un desorden clínicamente importante y que es, frecuentemente, transfusión-dependiente. Desde que las costumbres culturales y de lenguaje advierten frecuentemente la necesidad de examinar a los padres (los cuales pueden excluir los desórdenes talasémicos),

el diagnóstico en el neonato no es posible mediante los índices eritrocitarios normales y el estudio mediante una metodología de ADN es relativamente costosa, se ha propuesto un método de investigación alternativo. Con este método se investigaron los porcentajes relativos de HbF y de HbE obtenidos en los resultados de HPLC de recién nacidos de la región californiana, y se encontró que los porcentajes de HbE fueron marcadamente menores en los neonatos con HbE/ß-talasemia versus los homocigotos EE. Del mismo modo, las relaciones F/E fueron diferentes en el grupo de E/ß-talasemia comparado con el grupo EE. Este análisis puede por lo menos minimizar el número de examenes de ADN requeridos, y con más datos de E/ß-talasemia, puede probar ser un substituto confiable.[120]

Un método rápido, no radioactivo, para el diagnóstico de las mutaciones ß-talasémicas más frecuente, está basado en una PCR alelo-específica del tipo multiplex. Este método permite la detección directa de alelos normales o mutados sobre el ADN genómico. En la realización de este método, fueron usados tres oligonucleótidos alelo-específicos por cada mutación: uno común cebado a contracorriente y otros dos diferentes en su nucleótido terminal 3' (uno específico para el alelo normal y otro específico para el alelo mutado). Por cada muestra estudiada se realizaron, en paralelo, dos reacciones de PCR usando, en un caso IVS-1 nt 110 y el codón 39 cebado normal en el segundo caso, usando el correspondiente cebado mutado. En ambos casos, se visualizaron los diferentes fragmentos de PCR. Después de la

optimización, estos fragmentos dirigieron sólo la amplificación de sus alelos complementarios. Se realizó un estudio simple ciego sobre el ADN de 18 individuos homo o heterocigotos para este tipo de mutaciones. En comparación con una investigación paralela, todos los resultados fueron inequívocos. Este método de diagnóstico, que resultó ser rápido, fácil, directo y económico, permite la investigación de un grupo poblacional, incluyendo heterocigotos, lo cual es requerido desde el punto de vista epidemiológico y antropológico. Esto podría ser extendido a las grandes series de investigación de haplotipos antes de seguir el rumbo diagnóstico de varias enfermedades genéticas.[41]

La enfermedad de hematíes semilunar-talasemia fue descrita por primera vez en 1946, antes de que se hicieran estudios electroforéticos de hemoglobina. La inmensa mayoría de los casos se han observado en pacientes de raza caucásica de origen griego o italiano. Se ha podido comprobar que estos enfermos son de tipo doble heterocigoto, para los dos genes anormales provenientes de sus progenitores. Esta enfermedad se parece a la anemia de glóbulos rojos falciformes, pero la gravedad de la anemia, la frecuencia de las crisis dolorosas y las úlceras de las piernas, y el grado de esplenomegalia varían considerablemente según los pacientes. Las características hematológicas son la anemia hipocrómica microcítica, la forma semilunar de los eritrocitos en preparaciones húmedas, y la presencia de gran número de células en diana en frotis teñidos y fijados. Suele haber reticulocitosis. Es en el tipo beta de talasemia donde se

observan interacciones con la hemoglobina S, ya que ambos genes afectan a la cadena beta. En algunos pacientes prácticamente toda la hemoglobina es S y F, de manera que se necesitan estudios de familia para establecer el diagnóstico de enfermedad de hematies semilunar-talasemia.

HEMOGLOBINA SC

La detección de la simple base de mutaciones dobles en el codón 6 del gen de la ß-globina es importante para el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme y de la enfermedad SC. Se ha diseñado un procedimiento nuevo para crear un sitio de restricción en los alelos beta A y beta C para facilitar la discriminación de las hemoglobinas A, S y C. El principio general de este procedimiento es el de ampliar enzimáticamente el ADN genómico usando un "cebo" modificado que contiene un nucleótido alterado en la terminal 3' para crear estos sitios de restricción. Después de que este "cebo" modificado ha sido eficientemente incorporado dentro de el ADN amplificado, los productos de la PCR son digeridos con las enzimas de restricción Ava 1 y Sty 1. Ava 1 reconoce un sitio en el ADN amplificado que contenga un alelo beta A, y Sty 1 reconoce un sitio en el ADN que contenga un alelo beta C. Ya que los alelos beta A y beta C pueden ser distinguidos directamente por la presencia de un sitio de restricción, el alelo beta A puede se identificado indirectamente. Los tres alelos de las ß-globinas son fácilmente distinguidos por el tamaño y patrón de los fragmentos electroforéticos sobre gel de agarosa. Este procedimiento es

específico y sensitivo, permitiendo así un diagnóstico rápido y económico de la anemia falciforme y la enfermedad SC.[68]

HEMOGLOBINA D

Puede haber dificultad al distinguir entre el trastorno ocasionado por la hemoglobina D y la anemia drepanocítica porque en ambas enfermedades se observa la aparición de glóbulos falciformes en preparaciones de sangre fresca, y en la electroforesis de papel a pH 8.6 sólo se ve un máximo que tiene la movilidad de la hemoglobina S. En algunos pacientes la diferenciación puede lograrse comparando las solubilidades de las formas reducidas de hemoglobina, porque la solubilidad de la hemoglobina D reducida es normal, mientras que la de la hemoglobina S reducida está disminuida.

Los estudios efectuados de solubilidad diferencial pueden no resultar concluyentes; en tales circunstancias cabe emplear la electroforesis en agar a pH 6.2 para distinguir las dos hemoglobinas. También se ha señalado la enfermedad por hemoglobina D homocigótica.

HEMOGLOBINA G (HbG)

La hemoglobina G, se encuentra, en muchas ocasiones combinada con otras hemoglobinas, como la HbA y la HbS. Su determinación se realiza normalmente mediante pruebas de solubilidad y corrimientos electroforéticos. Después de una electroforesis alcalina a la muestra por estudiar, si se encuentra un corrimiento que corresponda a una hemoglobina AS, se debe

realizar una prueba de solubilidad que en su resultado negativo indicará la existencia de hemoglobina AG, misma que se corrobora con la aplicación de una tinción de benzidina. Cuando el resultado de la prueba de electroforesis a pH alcalino nos indica la existencia inicial de hemoglobina SS, se realiza un corrimiento posterior en agar de citratos, lográndose identificar una banda específica que corresponde a la hemoglobina SG, en caso de que ésta se encuentre presente.[122]

HEMOGLOBINA M (HbM)

En la determinación de hemoglobina M se debe tener en consideración que la determinación de esta haemoglobina no es exacta por medio de la medición de metahemoglobina a través de pruebas de absorbancia. La demostración de la hemoglobina anormal, debe realizarse mediante electroforesis. En el caso de las variedades de HbM en las que la substitución del ácido aminado tiene lugar en las cadenas beta, se forma un complejo entre el ácido aminado substitutivo y el hierro férrico, siendo entonces difícil e inexacta la medición de la concentración de metahemoglobina por el método de la cianometahemoglobina; incluso algunas variedades de HbM no reaccionan en absoluto con el cianuro. En la Tabla 3, se presentan algunos tipos de HbM con la medición de los espectros de cianometahemoglobina y el máximo de absorción de metahemoglobina.[102]

TABLA 2. Algunos tipos de severidad clínica de talasemia.[122]

Tipo de severidad clínica		
Alelo	Heterocigoto	Homocigoto
Beta°	Menor	Mayor
Beta+Mediterraneo	Menor	Mayor
Beta+African	Menor	Intermedia
Alfa-talasemia 1	Menor	Letal
Alfa-talasemia 2	Portador silencioso	Menor
Hbconstant spring	Portador silencioso	Menor

TÉCNICAS DE RUTINA

Las técnicas que a continuación se describen, son aquellas que, de manera rutinaria, se emplean en el trabajo diario encaminado a la detección de hemoglobinas anormales.

IDENTIFICACION DE HEMOGLOBINAS ANORMALES

Se recomienda usualmente, una electroforesis en acetato de celulosa seguida por una electroforesis en agar de citrato, como un procedimiento inicial para la detección de hemoglobinas anormales. Puede también realizarse un examen para hemoglobinas "falciformes" para confirmar la identificación de hemoglobina S. Los dos procedimientos electroforéticos mencionados anteriormente, pueden diferenciar la hemoglobina S de las hemoglobinas D y G, y las hemoglobinas C, E y O de cualquier otra hemoglobina.

Para facilitar el diagnóstico de los síndromes talasémicos, se añade a las electroforesis de acetato de celulosa y de agar de citrato una cuantificación de hemoglobinas A_2 y F. La cuantificación de HbA_2 se realiza usualmente por la elución de la banda de acetato de celulosa después de la electroforesis a un pH de 8.6 o bien mediante microcromatografía. Una cantidad elevada de HbA_2 sugiere un rasgo de β-talasemia, mientras que una disminución es característico de una α-talasemia.[122]

Los niveles de hemoglobina F, son solicitados de manera rutinaria por la mayoría de los médicos, pero rara vez son útiles. La hemoglobina F cuantificada por densitometría puede ser

inexacta en aquellos casos en los que puede ser más útil. Esta cuantificación debera realizarse usando un procedimiento de desnaturalización alcalina y podria limitarse a la confirmación de una elevada cantidad de HbF observada en la electroforesis en acetato de celulosa. La HbF se encuentra elevada en las talasemias, especialmente en la ß-talasemia y en la S-ß-talasemia, asi como en la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH). Los niveles de HbF son variables en una amplia variedad de desordenes falciformes. El examen de elución ácida de HbF puede diferenciar entre una distribución homogénea (HPFH) y una distribución heterogénea (la mayoria de las talasemias) de hemoglobina F dentro de los eritrocitos.

La prueba de precipitación de isopropanol es el procedimiento de búsqueda más útil para una hemoglobina inestable. Algunos laboratorios realizan de manera rutinaria esta prueba en todos los desarrollos de hemoglobinas anormales. El frotis de sangre periférica provee de mucha información y puede suministrar los primeros indicios de una variante de hemoglobina que pudiera estar presente. Los indices eritrocitarios, especialmente el MVC, es muy útil en la diferenciación de las anemias hipocrómico-microciticas de los eritrocitos normales. Otros exámenes especiales incluyen una electroforesis a pH normal para distinguir la hemoglobina H y la hemoglobina de Bart de otras variantes y la prueba del azul brillante de cresilo para cuerpos de inclusión de hemoglobina H y algunas otras hemoglobinas inestables. Pueden ser necesarios estudios de funcionalidad hemoglobinica, de sintesis de las cadenas de globinas, analisis

de ADN y estudios estructurales de las globinas, para precisar la identificación de una hemoglobinopatía.[102,103,122]

MUESTRAS DE SANGRE (COLECCION Y PREPARACION)

La colección de las muestras de sangre y su preparación son un importante aspecto en la evaluación de las hemoglobinopatías, frecuentemente menospreciados por los laboratoristas. A pesar de que muchos de los métodos de colección estándar pueden proporcionar muestras de sangre satisfactorias para procedimientos de búsqueda, la extracción de sangre venosa de 5 a 7 ml en tubos vacutainer que contengan un anticoagulante (EDTA preferentemente, ACD, heparina) es muy útil. Estas muestras permiten realizar varios procedimientos de una sola recolección. La sangre también puede ser colectada en capilares heparinizados (tubos de hematocrito), de un dedo o de un pinchazo en el talón, siendo especialmente útil en el recién nacido. Un tercer procedimiento también útil en la búsqueda sobre recién nacidos, o en muestras enviadas a un laboratorio central, es la colección de sangre capilar o del cordón umbilical sobre papel filtro. La sangre capilar y venosa, pueden ser almacenadas a 4°C por más de 28 días sin dificultad en la interpretación de los patrones electroforéticos. La sangre colectada, almacenada y transportada en papel filtro, es menos estable y deberá ser examinada de 7 a 10 días.

Se recomienda la conversión de una muestra de sangre total a un hemolisado celular lavado. Este procedimiento purifica la hemoglobina, mediante la remoción de células blancas, plaquetas,

células del estroma y proteinas plasmaticas. También permite el ajuste de la solución de hemoglobina a aproximadamente 10 g/dl siendo adecuado para muestras de sangre anémica o con policitemia. El uso de hemolisado para la electroforesis de hemoglobina servirá, por lo tanto, para reducir las bandas de proteinas superficiales no hemoglobinicas, manchas y otros artefactos que interfieren con el análisis.

El método para el reactivo de hemolisado se resume abajo. Otros procedimientos pueden ser preferidos para tipos especificos de variantes de hemoglobinas. Por ejemplo, la hemoglobina H y las hemoglobinas inestables se desnaturalizan con solventes orgánicos. Estas células deberán ser lisadas con 4 volúmenes de agua destilada y los sedimentos celulares deberán ser separados mediante centrifugación de alta velocidad (18000 rpm x 20 min) a 4°C.

METODO PARA EL REACTIVO HEMOLISANTE

Este es el método de elección para los procedimientos de búsqueda de rutina. Sin embargo, no resulta conveniente su empleo para preparar muestras cuyo examen requiere de grandes cantidades de hemolisado, como por ejemplo el análisis estructural de hemoglobina.

1. Prepare EDTA o reactivo hemolisante saponificado.
   a. Reactivo hemolisante de EDTA: Disuelva 0.25 g de sal tetrasódica de EDTA y 5 mg de KCN en 100 ml de agua destilada.

b. Reactivo hemolisante saponificado: Disuelva 100 mg de saponina y 5 mg de KCN en 100 mg de agua destilada.

2. La muestra apropiada de sangre es mezclada con el reactivo hemolisante para lisar las células.

a. Lavado de las células: Coloque dos gotas de sangre en un tubo. usando una pipeta capilar. Lave las células 3 veces con 0.85 g/dl de NaCl. Deseche el sobrenadante después del último lavado. Añada 3 gotas de reactivo hemolisante. Agite vigorozamente durante 15 segundos.

b. Sangre total: Coloque una gota de sangre en un tubo usando una pipeta capilar. Añada 3 gotas de reactivo hemolisante. Agite vigorozamente durante 15 segundos.

c. Tubo capilar: Centrifugue durante 5 minutos en una centrifuga de hematocrito. Marque el tubo capilar con una lima a una distancia de 1.6 cm del paquete celular. Asegúrese de medir cerca del paquete y abajo del plasma. Rompa el tubo donde fue marcado. Coloque el paquete celular en un tubo que contenga 6 gotas del agente hemolisante. Agite vigorozamente durante 15 segundos.

d. Papel filtro: Perfore un disco de papel filtro con la muestra de sangre, de 0.5 cm de diámetro, usando una perforadora. Coloque el disco en un tubo y añada 3 gotas del reactivo hemolisante. Mezcle

perfectamente y déjelo reposar durante 45 minutos para eluir la hemoglobina. Retire el papel filtro del tubo, exprimiendo cualquier fluido residual con un aplicador (barra de vidrio).

La principal fuente de contaminación en un hemolisado bien preparado, es la presencia de anhidrasa carbónica, una proteina no hemoglobinica. Esta proteina de poca coloración en la región de la hemoglobina A_2 a un pH de 8.6, marca una banda electroforética con Ponceau S y puede causar confusiones. La metahemoglobina se acumula en muestras de sangre vieja e interfiere la interpretación de la electroforesis. La adición de KCN convierte la metahemoglobina en cianometahemoglobina, eliminando este problema.

ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA (EAC)

Propósito

La EAC es el procedimiento inicial en la búsqueda de hemoglobinas anormales. La técnica es sensible a muestras de sangre total en cualquier etapa de la vida (recién nacidos, sangre de cordón, edad adulta).

Principio

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. La hemoglobina se carga negativamente a un pH entre 8.4 a 8.6 y migra hacia el ánodo en un campo eléctrico con acetato de celulosa como medio de soporte. Durante la electroforesis muchas variantes de hemoglobina se separan debido

a las diferencias de carga resultantes de alteraciones en su estructura primaria. Esta separación permite una identificación preliminar de estas hemoglobinas.

Reactivos

1. Buffer: Tris-ácido etilendiamintetraacético (EDTA)-buffer de ácido bórico (TEB), pH 8.4

   Tris(hidroximetil)aminometano..... 10.2 g

   Acido etilendiamitetraacético..... 0.6 g

   Acido bórico..... 3.2 g

   Agua destilada..... cbp 1 l

2. Colorante: 0.5 g/dl de Ponceau S

   Ponceau S..... 0.5 g

   Acido tricloracético..... 5.0 g

   Agua destilada..... cbp 100 ml

3. Solución reveladora

   Acido acético glacial..... 50.0 ml

   Agua destilada..... cbp 100 ml

4. Metanol absoluto

5. Solución aclaradora

   Metanol absoluto..... 80.0 ml

   Acido acético glacial..... 20.0 ml

Equipo

1. Cámara de electroforesis y fuente de poder
2. Placas de acetato de celulosa
3. Aplicador (en algunos sistemas, es necesario que la muestra esté perfectamente alineada a la base)

4. Mechas y papel teñido
5. Tubos capilares de hematocrito o micropipetas
6. Contenedores para el colorante
7. Estufa o plancha caliente
8. Balanza y pHmetro
9. Envolturas plásticas

Procedimiento

Se resume aqui el procedimiento general para la EAC. Los diversos fabricantes, tienen diferentes procedimientos. Es necesario seguir las instrucciones del fabricante para el uso de productos especificos.

1. Coloque 50 ml de buffer TEB en cada una de las dos celdas de la cámara; remoje y coloque la mecha.
2. Remoje las placas de acetato de celulosa en buffer TEB por lo menos 5 minutos antes de usarlas. Baje lentamente las placas dentro del buffer evitando la formación de burbujas de aire en la membrana.
3. Coloque la placa de acetato de celulosa entre dos piezas de papel absorbente de manera rápida y uniforme para remover el exceso de humedad.
4. Aplique las muestras hemolisadas sobre la placa, del lado del acetato de celulosa.
5. Coloque la placa en la cámara con el lado del acetato de celulosa hacia abajo y coloque sobre la placa una lente de microscopio para permitir un buen contacto.
6. Aplique 450 V durante 20 minutos a temperatura ambiente.

7. Con la cámara apagada, quite la placa y tíñala durante, por lo menos, 3 minutos con Ponceau S.
8. Saque la placa de la tinción y lávela tres veces consecutivas, durante 2 minutos cada vez, con ácido acético al 5%.
9. Fije la placa con metanol absoluto de 3 a 5 minutos.
10. Aclare la placa con la solución respectiva durante 5 minutos.
11. Seque en la estufa durante 7 minutos a 65°C.
12. Coloque la placa en una envoltura de plástico y etiquétela.

Control

Se aplica una muestra de control, que contenga al menos 2 hemoglobinas conocidas, en cada placa con muestra desconocida. Se recomienda emplear un control con hemoglobinas A, F, S y A_2. Los patrones de las muestras desconocidas deberán compararse con los de los hemolisados de muestras conocidas. Los controles pueden obtenerse en laboratorios comerciales, o bien, procesarse en nuestro propio laboratorio.

Nota: Una variación en el procedimiento de acetato de celulosa involucra una doble o triple aplicación de la muestra. Siguiendo con la electroforesis, la placa es contrastada con benzidina como se describe en el procedimiento de la electroforesis a pH neutro para la hemoglobina H. Cuando una variante (X) está presente, la fracción $aXSA_2$ aparece como una banda azul muy pequeña detrás de la mancha roja de la anhidrasa carbónica.

Interpretación de resultados

Los patrones de una electroforesis normal para variantes de hemoglobina normales, se representan en la Fig. 1. La movilidad de la electroforesis del acetato de celulosa se da hacia la parte alta de la figura. El origen (cátodo) se da en el lado izquierdo de la banda. Las hemoglobinas migran hacia el ánodo. La principal hemoglobina normal en el adulto (también llamada hemoglobina A_1) se separa de las otras hemoglobinas normales que se encuentran en el adulto. La hemoglobina A_2 se observa como una banda menor cerca del origen. Ocasionalmente, la anhidrasa carbónica, una enzima eritrocitaria que cataliza la hidratación reversible de CO_2, es observada entre el origen y la banda de la hemoglobina A_2. Las hemoglobinas C, E y O también migran a la misma área que la hemoglobina A_2, mientras que las hemoglobinas D y G migran con la hemoglobina S entre las hemoglobinas A_2 y A. Las hemoglobinas H y de Bart, se observan frecuentemente en la sangre del cordón, migrando más rápidamente que la hemoglobina A, lo mismo que un gran número de variantes denominadas hemoglobinas "rápidas", como se representa en la Fig. 1.

El rasgo falciforme, es el resultado de una mayor cantidad de HbA más HbS, con una cantidad normal de HbA_2. La enfermedad de hemoglobina SC tiene una banda ancha en el área de la HbA_2, la que, con la combinación de una banda S, podría permitir un diagnóstico presuntivo de hemoglobinopatía SC. La anemia falciforme no tiene bandas A o C, aunque ocasionalmente se ha observado una banda de A_2. Los homocigotos de HbC tienen una

FIG. 1. Corrimiento de diferentes hemoglobinas en acetato de celulosa a un pH de 8.4.[122]

banda ancha en el área de C/A_2 sin bandas A o S. La sangre del cordón en neonatos normales tiene una predominancia de HbF, con una pequeña cantidad de HbA. La S-β-talasemia, donde la producción de cadenas β-A está disminuida o ausente, tienen una predominancia de HbS, un porcentaje mayor al 30% de HbA y cantidades variables de HbA_2 y HbF.

Todas las electroforesis de hemoglobina deberán contener un control para hemoglobinas A, F, S y C. Estos controles pueden prepararse en el laboratorio o bien, pueden obtenerse comercialmente. Los patrones de electroforesis en agar de citrato de algunas hemoglobinopatías comunes están representadas en la Fig. 2. El cátodo está a la derecha. En un rango de pH de

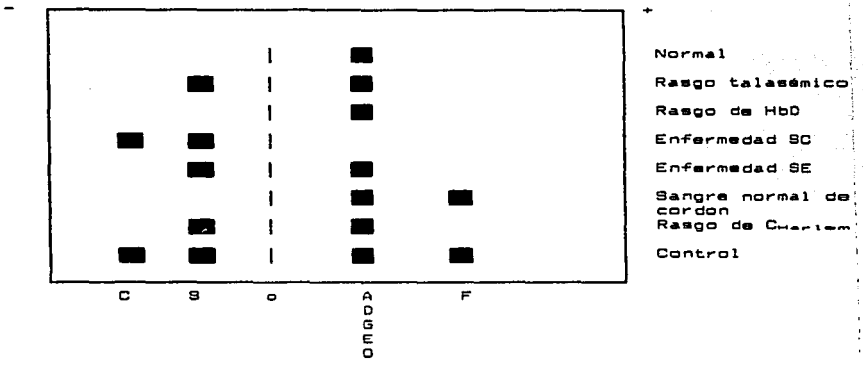

FIG. 2. Corrimiento de diferentes hemoglobinas en agar de citrato a un pH de 6.0-6.2.[122]

6.0 a 6.2. la HbC migra hacia el ánodo y de esta manera se separa de la HbE, mientras que la HbD migra con la HbA. La HbF migra más catódicamente, en tanto que la HbS lo hace cerca del origen. El uso frecuente de estos dos métodos electroforéticos permiten la diferenciación de las hemoglobinas D y G de la S y también distinguen las hemoglobinas E y O de la hemoglobina C. Normalmente, la HbA_2 no se observa en la electroforesis de agar de citrato.

La electroforesis de hemoglobina permite el análisis cualitativo de un presuntivo fenotipo hemoglobinico. Un diagnóstico más definitivo, requiere de estudios bioquimicos adicionales. Las cantidades y tipos de hemoglobinas determinados

por medios bioquimicos no reflejan necesariamente un cuadro genético completo y el genotipo no siempre puede ser inferido del fenotipo. "Un diagnóstico preciso sólo puede asegurarse después de que los datos clínicos y bioquímicos sean suplementados por un estudio familiar". Una transfusión sanguínea reciente en el paciente puede complicar la interpretación de los resultados de la electroforesis.

El fenotipo presuntivo de la hemoglobina se designa en orden decreciente de concentración como es observado en la electroforesis. De este modo, si dos hemoglobinas migran de manera semejante a las hemoglobinas A y S con A mayor que S, se determina un diagnóstico presuntivo de HbAS (rasgo falciforme). Si S es mayor que A, el diagnóstico probable sería entonces de HbSA (S-ß-talasemia).[68,105,122]

ELECTROFORESIS EN AGAR DE CITRATO

Propósito

La electroforesis de hemoglobina en agar de citrato en un pH ácido, es el método de elección para confirmar los resultados obtenidos a pH alcalino en la electroforesis en acetato de celulosa. La técnica permite una excelente separación de las hemoglobinas A y S en recién nacidos.

Principio

La electroforesis en agar de citrato involucra el movimiento de las hemoglobinas en un campo eléctrico con 1 g/dl de agar como medio de soporte. El buffer de trabajo es de citrato de sodio

0.05M, a un pH de 6.0 a 6.2. La separación de varias hemoglobinas en este medio está basada en la carga electroforética y en la adsorción de la hemoglobina en el agar. Esta adsorción puede estar relacionada con la solubilidad de la hemoglobina. De este modo, la separación de la hemoglobina difiere de aquellos sistemas en los que la migración se basa principalmente en la carga electroforética, como en el caso de la electroforesis en acetato de celulosa. La electroforesis en agar de citrato, es especialmente útil en la diferenciación de HbS, de HbD o de HbG y de HbC de HbE o HbO_{Arab}.

Reactivos

1. Buffer de citrato 0.5M, a pH 6.0 a 6.2

   Citrato trisódico..... 147.0 g

   Acido citrico..... 4.3 g

   Agua destilada..... cbp 1 l

2. 30 g/dl de ácido citrico

   Acido citrico..... 30.0 g

   Agua destilada..... cbp 100 ml

3. Agar

   Bacto-agar..... 1.0 g

   Agua destilada..... cbp 100 ml

4. Tinción de benzidina

   3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (u otros derivados de benzidina)..... 1.0 g

   Acido acético glacial..... 25.0 ml

   Agua destilada..... cbp 100 ml

Vacie la benzidina; añada el ácido y agite hasta que se disuelva; luego añada el agua destilada.

5. Peróxido de hidrógeno al 3% (v/v).

Procedimiento

1. Prepare portaobjetos de 5 x 7.5 cm con 0.1 g/dl de agar disuelto en agua destilada. Aplique de manera uniforme aproximadamente 3 ml de la solución caliente, sobre los portaobjetos y déjelos secar sobre una superficie lisa, uniforme a temperatura ambiente. Estas placas pueden ser almacenadas durante varios meses antes de su uso.
2. Diluya el buffer de citrato 0.5M en una relación 1:10 con agua destilada. Coloque aparte 100 ml de este buffer de trabajo sin ajustar el pH. Ajuste el pH del resto del buffer de 6.0 a 6.2 con 30 g/dl de ácido cítrico y refrigérelo.
3. Para preparar 1 g/dl de solución de agar, mida 1 g de Bacto-agar (o Difco certificado) y agréguelos a los 100 ml del buffer de trabajo de citrato que se menciona en el punto anterior. Caliente la solución en baño María hasta que el agar esté completamente disuelto.
4. Diluya todo el hemolisado con agua destilada para preparar una concentración menor a 1 g/dl.
5. Llene cada uno de los compartimentos externos de la cámara con 100 ml del buffer de trabajo frío a que se refiere el punto 2, el cual ha sido ajustado a un pH de 6.0 a 6.2 con 30 g/dl de ácido cítrico. Llene cada uno de los compartimentos de la cámara con 50 ml del buffer frío.

6. Remoje el papel de cromatografía (5 x 22 cm) en el buffer y coloquelo sobre las divisiones de la cámara cromatografica de modo que la parte inferior de la mecha esté sumergida en el buffer tanto en los compartimentos internos como en los externos.
7. Coloque la cámara en refrigeración o en paquetes con hielo.
8. Coloque de 3.5 a 4.0 ml de la solución de 1 g/dl de agar caliente sobre portaobjetos de 5 x 7.5 cm que han sido colocados sobre una superficie plana y con la cara cubierta hacia arriba. Extienda rápidamente sobre toda la superficie del portaobjetos. Permita que el agar se extienda perfectamente, moviendo el portaobjetos.
9. Llene 7 de los depósitos de una placa de muestra con hemolisado diluido (un portaobjetos de 5 x 75 cm deberá acomodar un total de 7 muestras incluyendo el control).
10. Coloque el portaobjetos cubierto con agar sobre una base alineada de tal modo que las muestras puedan ser aplicadas en la parte media de la placa.
11. Prepare el aplicador volteándolo varias veces y apliquelo lentamente sobre la superficie del gel. No corte el agar con el aplicador, pero suavemente toque el agar, permitiendo un contacto de 6 a 8 segundos.
12. Coloque la placa de agar con el gel hacia abajo, sobre las mechas a través de los desniveles de la cámara. Aplique de 15 a 17 mAmps de corriente por portaobjetos (70 a 90 volts), durante 70 minutos

13. Prepare la tinción mientras inicia la ejecución de la electroforesis. Diluya la solución de benzidina en relación 1:1 con agua destilada. Añada 5 ml de peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) por cada 50 ml de tinción diluida.
14. Retire la placa de la cámara y colóquela en la bandeja de tinción, con la cara del gel hacia arriba.
15. Aplique la tinción con agua oxigenada sobre la placa de agar, permitiendo que la tinción desarrolle un color azul obscuro.
16. Lave las placas en 4 cambios de agua destilada. Permita que se remojen toda la noche (o durante varias horas) en agua destilada.
17. Retire suavemente el agar de las placas con una espátula y deslícelo sobre una superficie blanca (una cartulina) para marcarla, o bien, deje el agar sobre el portaobjetos. Seque el agar en una estufa a 80°C durante aproximadamente 2 horas o déjelo secar a medio ambiente. Las cartulinas o las placas pueden ser marcadas fácilmente con un marcador para fieltro y almacenarse permanentemente.

Control

A cada placa, deberá aplicarse un control de hemoglobina A que contenga al menos dos diferentes hemoglobinas conocidas, junto con las muestras desconocidas. Los patrones de los hemolisados desconocidos deberán compararse con los de los hemolisados conocidos.

Interpretación de resultados

La migración de los patrones obtenidos con la electroforesis en agar de citrato se muestra en la Fig.2.

Precauciones

1. Deben determinarse el voltaje apropiado, tiempo corrimiento y fuerza iónica del buffer para cada sistema de prueba. Refiérase a un método confiable en donde estas variables hayan sido establecidas, así como también se hayan dado migraciones de hemoglobinas conocidas.
2. Cheque el pH del buffer preparado al principio y el de las separaciones pobres (escasas).
3. Refrigere y desecha el buffer si se torna turbio o es contaminado.
4. Revise el equipo de acuerdo a los procedimiento de control de calidad establecidos por el fabricante.
5. Lávese las manos antes de manejar el acetato de celulosa, el almidón o las placas de agar. Tóquelos sólo por las orillas o use fórceps. La contaminación de las placas con sangre o proteínas puede añadir artefactos a los patrones.
6. Equilibre las bandas de acetato de celulosa en el buffer durante, al menos 20, minutos antes de que sea aplicada la muestra. Lave las bandas suavemente dentro del buffer para evitar cadenas de trampas de aire o la formación de burbujas, las cuales pueden distorsionar el movimiento directo de las proteínas en la lámina o arruinar

completamente la banda. Algunas bandas comerciales deberán ponerse a flotar sobre la superficie del buffer antes de usarse. Debe asegurarse el seguir las instrucciones del fabricante.

7. Tiña las placas de acetato de celulosa cuidadosamente; éstas no deberán tener exceso de humedad (de buffer o condensación), cuando sean aplicadas las muestras. La muestra deberá penetrar libremente la matriz de acetato de celulosa y no "correr". Seque las placas y evite la tinción excesiva de tal modo que el exceso de buffer no sea reabsorbido en el medio colocado en la cámara (esto causará un movimiento excesivo, no deseado, de buffer).
8. Aplique la muestra tan rápidamente como sea posible, coloque la banda o placa sobre la cámara y aplique la corriente tan pronto como sea posible para evitar la difusión.
9. Aplique la muestra cuidadosamente. La aplicación de la muestra no deberá ser gruesa o "ancha" dado que esto provocará una resolución pobre.
10. Lave el aplicador después da cada aplicación de muestra. Cebe una o dos veces cada vez que aplique una nueva muestra si esto es necesario.

ELECTROFORESIS DE LA CADENA DE GLOBINA

Propósito

La electroforesis de la cadena de globina permite la caracterización de otras hemoglobinas que tiene movilidades similares sobre acetato de celulosa o agar de citrato. La

realizacion de la electroforesis de la cadena de hemoglobina a pH ácido o alcalino permite la diferenciación de muchas variantes de hemoglobina, sin el extenso tiempo requerido en el análisis estructural disponible sólo en laboratorios especializados. Las movilidades relativas de algunas variantes de hemoglobina, están representadas en la Fig. 3.

Principio

Los grupos hem son separados de las cadenas de globina por el 2-mercaptoetanol. La urea separa las cadenas alfa de las demás cadenas. Los grupos hem migran fuera de la banda. Las cadenas de globina migran a diferentes rangos en buffers ácido o alcalino. La migración diferencial de las cadenas de globina en la electroforesis en acetato de celulosa a pH 6.0 y pH 8.6, permite la detección de una cadena de globina anormal, así como otras diferenciaciones entre variantes de hemoglobina.

Reactivos

1. Stock de ácido tris-etilendiamitetraacético (EDTA)-buffer de ácido bórico (TEB), a pH de 8.6.

   Tris(hidroximetil)aminometano..... 10.2 g
   EDTA..... 0.6 g
   Acido bórico..... 3.2 g
   Agua destilada..... cbp 1 l
   Almacenar a 4°C.

2. Tinción: El Ponceau S es usado de manera rutinaria en la electroforesis de hemoglobina.

3. Urea

4. 2-mercaptoetanol

5. Acido citrico, 30 g/dl

Acido citrico..... 30.0 g

Agua destilada..... cbp 100 ml

Equipo

1. El mismo equipo requerido para la electroforesis en acetato de celulosa.
2. Campana de vapor.

Procedimiento

1. El dia de la prueba, prepare el buffer de trabajo añadiendo 108 g de urea a 210 ml del buffer de TEB. Este es el buffer alcalino. Para la electroforesis de una cadena de globina acida, ajuste el pH de 6.0 a 6.2 con 30 g/dl de acido citrico. Mezcle hasta que se disuelva.
2. Añada 50 microlitros del buffer de trabajo, 50 microlitros de mercaptoetanol y 50 microlitros de hemolisado a un pequeño tubo de ensaye. Mezcle y déjelo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Todo el procedimiento con 2-mercaptoetanol debera llevarse a cabo en una campana de vapor.
3. Añada 2 ml de 2-mercaptoetanol al buffer de trabajo remanente. Mezcle. Baje lentamente las bandas de acetato de celulosa dentro del buffer para prevenir la formación de trampas de aire en la membrana. Remoje las bandas de acetato de celulosa en este buffer durante 30 minutos.
4. Vierta 50 ml de buffer en cada lado de la cámara. Moje y coloque las mechas.
5. Seque el exceso de las bandas con una toalla de papel. No permita que las bandas se sequen totalmente.

6. Aplique las muestras en el centro de la banda usando un aplicador #8. Aplique ligeramente para lograr una buena resolución.
7. Cuelgue inmediatamente la banda a través del soporte de la cámara de modo que la parte inferior de la banda esté dentro del buffer.
8. Realice la electroforesis durante 85 minutos a 150 volts. La cámara puede contener hasta tres bandas.
9. Quite la banda de la cámara y colóquela en 0.5 g/dl de tinción de Ponceau durante al menos 30 minutos.
10. Aclare con ácido acético o agua destilada hasta que el fondo quede decolorado. Lea mientras la banda aun esté húmeda.
11. Permita el secado al medio ambiente.

Control

En cada banda con la muestra desconocida, deberán aplicarse al menos dos hemoglobinas conocidas diferentes, que sirvan como control. Los patrones de las muestras desconocidas deberán ser comparadas con los de los hemolisados conocidos, ya sea que estos hemolisados sean obtenidos por medio de laboratorios comerciales o bien, en el mismo laboratorio de trabajo.

ELECTROFORESIS A pH NEUTRAL PARA LA HEMOGLOBINA H Y LA HEMOGLOBINA DE BART

Propósito

La electroforesis en acetato de celulosa a un pH neutral, permite la diferenciación de las hemoglobinas H y de Bart de otras hemoglobinas de movilidad rápida.

Principio

La electroforesis a pH neutral (6.9 a 7.1) se basa en la absorción de la hemoglobina en el medio de acetato de celulosa debido a la diferencia en los puntos isoeléctricos de las hemoglobinas. La separación de las hemoglobinas H y de Bart de otras variantes de movilidad rápida se lleva a cabo, a pesar de que algunas otras variantes de rápidas se mueven ligeramente hacia el ánodo desde el origen, y solamente las hemoglobinas H y de Bart, se mueven más cerca del ánodo que cualquier otra hemoglobina. El resto de las hemoglobinas permanecen en el origen. La técnica también permite la identificación de bandas difusas de hemoglobinas H y de Bart que frecuentemente son pasadas por alto en la electroforesis en acetato de celulosa, dado que usualmente estas representan una pequeña porción de la hemoglobina total.

Reactivos

1. Stock 0.1M de buffer monobásico de sodio fosfato

   $NaH_2PO_4.H_2O$..... 13.8 g

   Agua destilada..... cbp 1 l

Tolueno (para almacenamiento)..... 1 gota

2. Stock 0.1M de buffer dibasico de sodio fosfato

Na_2HPO_4. anhidro..... 14.2 g

Agua destilada..... cbp 1 l

3. Tinción de Ponceau S, 5 g/dl

Ponceau S..... 0.5 g

Acido tricloroacético..... 5.0 g

Agua destilada..... cbp 100 ml

4. Solución aclaradora

Agua destilada..... cbp 1 l

Acido acético glacial..... 50.0 ml

5. Stock de tinción de benzidina

3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina..... 1.0 g

Acido acético glacial..... 25.0 ml

Agua destilada..... cbp 100 ml

Triture la benzidina; añada el ácido y agite hasta que se disuelva, luego añada el agua destilada.

6. Peróxido de hidrógeno al 3% (v/v).

Equipo

1. Cámara de electroforesis y fuente de poder
2. Placas de acetato de celulosa
3. Aplicador, cajas de muestra y base de alineación
4. Mechas y papel secante
5. Tubos capilares para hematocrito o micropipetas
6. Estufa o "plato" caliente
7. Balanza y pHmetro

Procedimiento

1. Para preparar el buffer de trabajo, añada 39 ml del stock de buffer monobásico a 61 ml del stock buffer dibásico. Lleva hasta un volumen de 200 ml con agua destilada. Mezcle y verifique una lectura de pH de 6.9 a 7.1.
2. Vierta 50 ml del buffer de trabajo en los compartimentos externos de la cámara. Remoje y coloque las mechas.
3. Remoje las placas de celulosa (60 x 76 cm) apoyadas una contra otra, en el buffer de trabajo durante, al menos, 5 minutos antes de usarlas. Evite las trampas de aire deslizando lentamente las placas dentro del buffer.
4. Quite el exceso de humedad de las placas colocándolas rápidamente entre dos piezas de papel absorbente. No permita que la placa de seque totalmente.
5. Aplique las muestras en el centro de la placa de acetato de celulosa. Permita que los extremos del aplicador permanezcan en contacto con la placa de 3 a 5 segundos.
6. Coloque la placa en la cámara, con la celulosa hacia abajo, de modo que las mechas estén en contacto con el acetato de celulosa. Ponga un portaobjetos sobre la placa para asegurar un buen contacto.
7. Realice la electroforesis a 150V (5mA por placa) durante 30 minutos.
8. Retire las placas de la cámara y tiña durante al menos 3 minutos con tinción de Ponceau S.

9. Retire las placas de la tinción y colóquela en 3 lavados consecutivos de 3 minutos cada uno de ácido acético al 3% (v/v).
10. Retire las placas del enjuague final y revélelas con benzidina preparada diluyendo el stock de benzidina con agua destilada en relación 1:1. Por cada 50 ml de tinción diluida añada 5 ml de peróxido de hidrógeno al 3% (v/v).
11. Enjuague la placas en varios cambios de agua destilada e identifique los patrones mientras aún estén húmedas. Permita remojar durante toda la noche.
12. Remueva las placas del agua y permita secar al aire libre.

Control

Junto con cada espécimen desconocido en cada placa, deberán correrse una muestra conocida de HbH, o sangre de cordón que contenga Hb de Bart, una muestra conocida con Hb normal y una muestra conocida de hemoglobina de movilidad rápida (por ejemplo, HbJ).

Interpretación de resultados

La mayoría de las hemoglobinas no se mueve fuera del origen. Algunas variantes rápidas se mueven lentamente hacia el ánodo. Sólo las hemoglobinas H y de Bart se mueven significantemente hacia el ánodo, más la primera que la segunda. Por consiguiente, la mayoría de las hemoglobinas de movimiento rápido pueden ser diferenciadas de las hemoglobinas H y de Bart, por este método. Dado que las hemoglobinas inestables se desnaturalizan, esta prueba debe realizarse sólo con sangre fresca (una semana o menos

de su extracción). Para preparar el hemolisado, use el método de agua destilada.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD PARA HEMOGLOBINAS "FALCIFORMES"

La prueba de solubilidad es un examen rápido y simple, en la búsqueda de hemoglobinas que ocasionan rasgo falciforme en los eritrocitos. Es usada como una prueba confirmatoria para la hemoglobina S y otras variantes falciformes después de su detección mediante electroforesis en acetato de celulosa y agar de citrato. También es útil en situaciones de emergencia en las que debe ser determinada la presencia o ausencia de una hemoglobina "falciforme". No deberá ser usada como una prueba primaria de búsqueda genética.

Principio

Una hemoglobina "falciforme" en estado reducido (desoxigenado), es insoluble cuando se le coloca en un medio de buffer fosfato de elevada molaridad y luego forma polimeros (tactoides) que refractan y deflectan los rayos de luz, produciendo una solución turbia. Mientras las hemoglobinas "falciformes" (S, C-Harlem, C-Ziguinchor, S-Travis, etc.) son insolubles, y dan una prueba positiva, todas las otras hemoglobinas permanecen solubles bajo estas condiciones.

Reactivos

1. Potasio fosfato dibásico, anhidro (K_2HPO_4)..... 216.0 g

2. Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)..... 169.0 g
3. Hidrosulfito de sodio ($Na_2S_2O_4$)..... 5.0 g
4. Saponina..... 1.0 g
5. Agua destilada..... cbp 1 l

   Añada 500 ml de agua destilada a un matraz de 1 l y disuelva los reactivos, uno a la vez. Ajuste a un litro con agua destilada después de que todos los reactivos se hayan disuelto.

Equipo

1. Tubos de ensaye de 12 x 75 mm y rejilla para los tubos
2. Micropipetas de 20 microlitros
3. Pipetas de 5 ml
4. Tarjetas blancas con líneas negras
5. Balanza

Procedimiento

1. Pipetear 2 ml del reactivo en un tubo marcado.
2. Permita que el reactivo se caliente a la temperatura ambiente.
3. Añada 50 microlitros de sangre total con EDTA o heparinizada.
4. Mezcle y espere 5 minutos.
5. Coloque el tubo a 2.5 cm al frente de una tarjeta blanca con líneas negras.
6. Lea la turbidez de la solución.

Control

Corra un control positivo y otro negativo para cada grupo de pruebas de solubilidad. La mezcla del reactivo con la sangre.

toma un color que va de ligeramente rojo a rosa. Un color ligeramente anaranjado indica el deterioro del hidrosulfito de sodio en el reactivo.

Interpretación de resultados

La prueba positiva para una hemoglobina falciforme está dada por una solución muy turbia. Las líneas negras de las tarjetas blancas no pueden observarse a través de la solución. Todas las hemoglobinas "falciformes" (S, C-Harlem o C-Georgetown, C-Ziguinchor, S-Travis, S-Antillas, S-Oman y S-Providencia) dan positivo en la prueba de solubilidad (hemoglobinas con substitución en B6 Glu--Val).

Una prueba negativa para hemoglobinas "falciformes" ocurre cuando las líneas negras pueden ser leídas a través de la solución de sangre-reactivo. La solución pueda parecer clara o ligeramente turbia, pero las líneas, no obstante, son visibles. La mayoría de la hemoglobinas, incluyendo las A, F, C, E, O-Arábiga, D, G, I, y J, dan resultado negativo para esta prueba.

Los resultado falsos positivos se observan en policitemia, o bien cuando la adición de sangre total es excesiva en relación al reactivo. También se dan falsos positivos en la disglobulinemia, transfusión reciente con sangre que contenga alguna hemoglobina "falciforme", e hiperlipidemia. Otra causa de falsos positivos, puede ser la inactivación o caducidad de los reactivos; una transfusión reciente, dado que la sangre normal diluye a la sangre con hemoglobina "falciforme"; en pacientes menores a 6

meses de edad; y en anemias donde los valores de hemoglobina sean menores a 7 g/dl.

CUANTIFICACION DE HEMOGLOBINA A_2

La determinación de la relativa concentración de hemoglobina A_2, es útil para el diagnóstico de talasemia y otros desórdenes relacionados con ella. La HbA_2 se encuentra elevada en desórdenes con rasgo ß-talasémico. También se observan cantidades anormales de HbA_2 en otros desórdenes genéticos y adquiridos, incluyendo la hemoglobinuria paroxística nocturna, la Hb-Lepore, α-talasemias, S-talasemia y en la anemia por deficiencia férrica.

Los métodos siguientes están basados en técnicas bioquímicas. Se ha evaluado la precisión y reproducibilidad de estos métodos. Se obtienen mejores resultados con la cromatografía de columna y elución después de la electroforesis en acetato de celulosa.

CUANTIFICACION POR ELUCION DE ACETATO DE CELULOSA

Propósito

La HbA_2 se encuentra elevada en el rasgo ß-talasémico, haciendo de su cuantificación la prueba más útil para su diagnóstico.

Principio

Después de la separación en acetato de celulosa, la HbA_2 puede ser eluida y medida como un porciento de la hemoglobina total.

Reactivos

1. Tris-EDTA-buffer de acido bórico (TEB): solución stock a pH 8.6: añada un litro de agua desionizada a los siguientes componentes:

   Base tris..... 55.0 g

   EDTA..... 7.0 g

   Acido bórico..... 9.0 g

   Ponga los compuestos y el agua en un agitador magnético hasta que estén perfectamente mezclados. Asegúrese de que el pH sea de 8.6 a 8.7.

2. Para la solución de trabajo diluya el stock de buffer en 1 parte de este más 3 partes de agua destilada.

Equipo

1. cámara de electroforesis y fuente de poder
2. Bandas de acetato de celulosa (Sephraphore III de 2.5 x 15 cm)
3. Aplicador (la caja de muestra y la base de alineación pueden ser necesarios en algunos sistemas)
4. Mechas y papel secante
5. Tubos capilares para microhematocrito o microdispensadores
6. Balanza y pHmetro
7. Tijeras y tubos de ensaye

Procedimiento

1. Vierta 50 ml del buffer TEB en los compartimentos externos de la cámara.
2. Remoje tiras de acetato de celulosa de 2.5 x 15 cm. Gelman Sephraphore III, en el buffer de trabajo durante al menos 10 minutos antes de usarlas. Tíñalas y márquelas al lado

derecho del centro con un tubo capilar con el que se harán las muescas para la aplicación de la muestra en el acetato de celulosa.

3. Asegúrese de las bandas estén perfectamente teñidas, luego colóquelas a través de la cámara, la cual estará rodeada de hielo triturado. No permita que las bandas se sequen totalmente.
4. Aplique la muestra en las muescas con un tubo capilar para microhematocrito (aproximadamente de 5 a 8 microlitros de muestra). Permita que la banda absorba la muestra un poco y aplique más hasta conseguir una aplicación abundante de muestra no teñida.
5. Realice la electroforesis de 1 a 1.5 horas a 1 mA por banda. Realice el análisis por duplicado.
6. Retire las bandas y corte lejos del extremo mojado, de modo que el exceso de buffer no "marque" el remanente de la banda. Coloque el trozo de la banda que contiene la HbA_2 en 1.2 ml de agua destilada. Coloque la banda que contiene HbA u otras hemoglobinas en 10 ml de agua destilada.
7. Permita la elución, con agitación ocasional, durante al menos 30 minutos. Los tubos pueden dejarse reposar toda la noche si se les retira el acetato de celulosa y mantenidos a 4°C tapados herméticamente.
8. Determine la densidad óptica de todas las soluciones a 415 nm con un espectrofotómetro confiable. Use la solución de trabajo como blanco.

9. Calcule el porcentaje de HbA_2 para cada muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{D.O.\ A_2}{8.33\ (D.O.\ A) + O.D.\ A_2} \times 100 = \%\ A_2$$

Interpretación de resultados

Se deberá establecer un rango para cada método, en cada laboratorio para la interpretación de los resultados obtenidos.

En las siguientes páginas, se representan diagramas de flujo propuestos para el seguimiento en la identificación de diferentes hemoglobinas anormales.

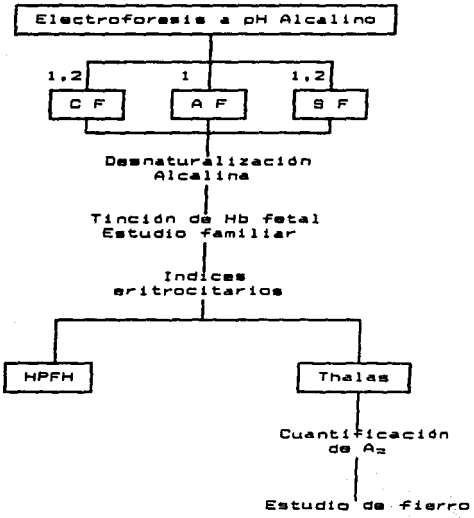

FIG. 4A. Diagrama de flujo para el diagnóstico de hemoglobinas anormales.[122]

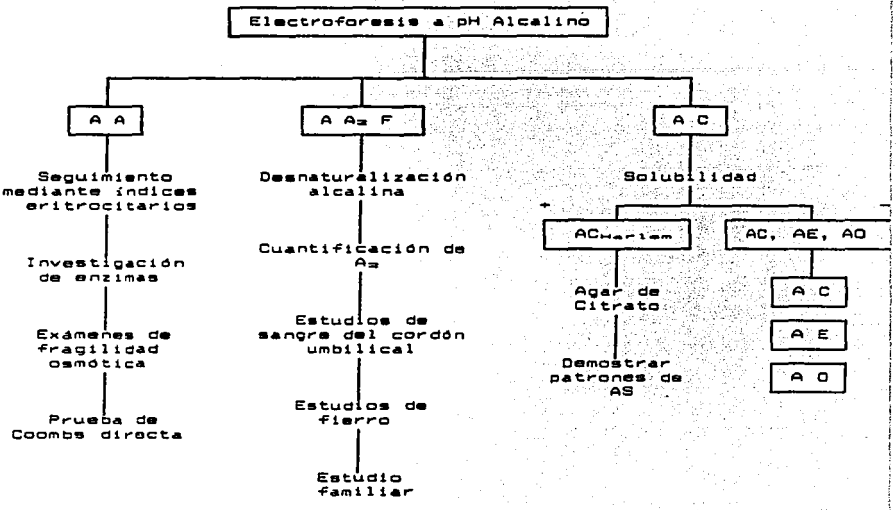
Electroforesis a pH Alcalino
A A
A A_2 F
A C
Seguimiento mediante índices eritrocitarios
Investigación de enzimas
Exámenes de fragilidad osmótica
Prueba de Coombs directa
Desnaturalización alcalina
Cuantificación de A_2
Estudios de sangre del cordón umbilical
Estudios de fierro
Estudio familiar
Solubilidad
+
−
AC_{Harlem}
AC, AE, AO
Agar de Citrato
Demostrar patrones de AS
A C
A E
A O

FIG. 4B

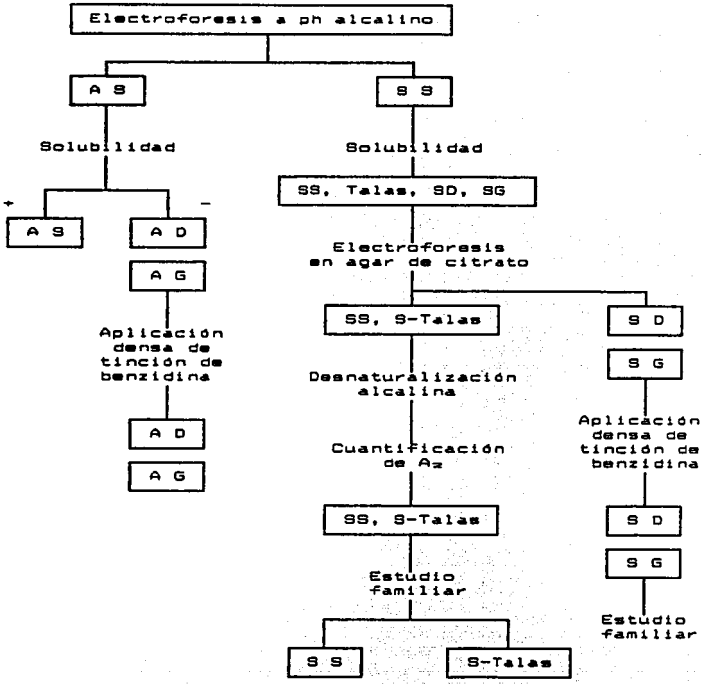
Electroforesis a ph alcalino
A S
S S
Solubilidad
Solubilidad
+
-
A S
A D
A G
Aplicación densa de tinción de benzidina
A D
A G
SS, Talas, SD, SG
Electroforesis en agar de citrato
SS, S-Talas
S D
S G
Desnaturalización alcalina
Cuantificación de A_2
Aplicación densa de tinción de benzidina
SS, S-Talas
S D
S G
Estudio familiar
Estudio familiar
S S
S-Talas

FIG. 4C.

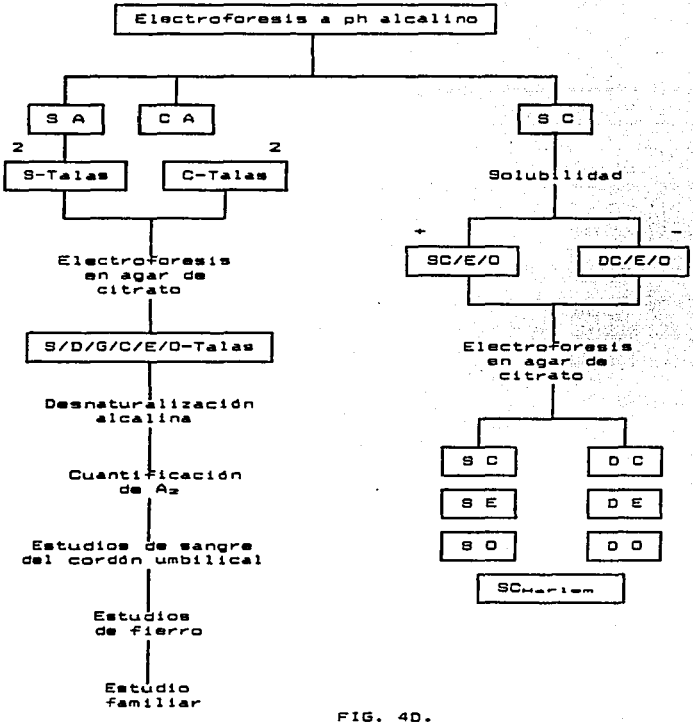
Electroforesis a ph alcalino
S A
C A
S C
2
2
S-Talas
C-Talas
Solubilidad
+
-
SC/E/O
DC/E/O
Electroforesis en agar de citrato
S/D/G/C/E/O-Talas
Desnaturalización alcalina
Cuantificación de Az
Estudios de sangre del cordón umbilical
Estudios de fierro
Estudio familiar
Electroforesis en agar de citrato
S C
D C
S E
D E
S O
D O
SCHarlem

FIG. 4D.

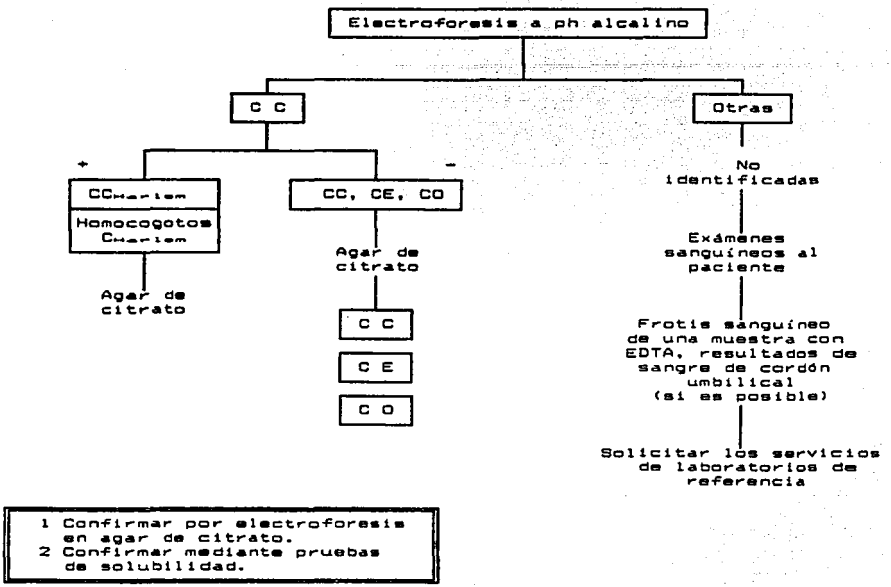
Electroforesis a ph alcalino
C C
Otras
+
-
CCHartem
Homocogotos CHartem
CC, CE, CO
No identificadas
Agar de citrato
Agar de citrato
C C
C E
C O
Exámenes sanguíneos al paciente
Frotis sanguíneo de una muestra con EDTA, resultados de sangre de cordón umbilical (si es posible)
Solicitar los servicios de laboratorios de referencia
1 Confirmar por electroforesis en agar de citrato.
2 Confirmar mediante pruebas de solubilidad.

FIG. 4E.

TÉCNICAS *DE PUNTA*

De esta manera, podemos definir a las técnicas que marcan los últimos avances en la investigación de hemoglobinas anormales. Evidentemente, estas técnicas no son todavia métodos que se empleen en los laboratorios como técnicas de rutina, y por tanto, no existe una "receta" que se pueda seguir de manera estricta, para obtener los resultados deseados en cada caso particular.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA DEL ADN

Las técnicas de biologia molecular constituyen un excelente instrumento diagnóstico, dado que permiten acceder a la información genética mediante el análisis de los acidos nucléicos. Desarrolladas a partir de finales de los años setenta, estas técnicas han sido utilizadas desde mediados de la década pasada. Sin embargo, en 1985, la aparición de la técnica de ampliación in vitro del ADN o PCR (Polimerase Chain Reaction), fue una auténtica revolución. Puesta a punto inicialmente por K.B. Mullis y colaboradores de la empresa Cetus, de Emeryville, esta técnica permite obtener, en un breve lapso de tiempo, un gran número de copias de la porción de ADN que se desee estudiar. La sensibilidad que aporta esta técnica es tal que actualmente es ya posible analizar un gen aunque sólo se disponga del ADN de una célula.[104]

LA TECNICA

El principio de la PCR es sencillo: consiste en copiar hasta mil millones de veces, en un tubo de ensayo, un fragmento del genoma que se desea estudiar.

Los fragmentos de ADN contienen dos hebras enlazadas en doble hélice. Cada hebra está constituida por el encadenamiento de un gran número de nucleótidos (A, T, C, G). Las secuencias de ambas hebras son complementarias (frente a un A en una hebra se encuentra siempre un T en la otra hebra; frente a un C, un G), y están emparejadas con enlaces energéticamente débiles. Esta complementareidad tiene una gran importancia: cuando los enlaces se rompen, por ejemplo a causa del calor, las dos hebras son capaces de reasociarse reproduciendo el emparejamiento inicial. Tal propiedad de emparejamiento específico de las secuencias complementarias ha sido aprovechada por el PCR. Esta técnica se basa en la acción de una enzima, la ADN polimerasa, capaz de copiar, tomando como modelo una de las hebras, una nueva hebra formada por nucleótidos complementarios. La estrategia consiste en hacer funcionar la polimerasa a partir de un pequeño fragmento de ADN complementario del extremo de la región a ampliar, que queda fijado y sirve de cebador. El otro extremo del fragmento está delimitado por un segundo cebador situado 50 a 2500 nucleótidos más lejos, en la otra hebra.

Cada ciclo de ampliación pasa por tres etapas. Primero, la doble hélice de ADN se calienta a 94°C, lo que permite romper los enlaces entre las dos hebras. Luego, la temperatura se rebaja

aproximadamente hasta 50°C en presencia de los cebadores. Entonces, estos se emparejan específicamente en los extremos de la región a ampliar, cada uno en su hebra. Posteriormente, la temperatura se eleva a 72°C; la polimerasa alarga las nuevas hebras del ADN a partir de los cebadores, uniendo nucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Estas operaciones constituyen un ciclo de ampliación. Se dispone entonces de dos nuevas copias del fragmento. En el ciclo de ampliación siguiente, que pasa por las tres mismas etapas (separación de las hebras, emparejamiento de los cebadores, elongación), estas nuevas hebras servirán a su vez, de matrices para la polimerasa. De este modo se obtienen 2n fragmentos después de n ciclos. Por tanto, el aumento del número de moléculas es exponencial. En la práctica, el rendimiento es menor, y desciende cuando el número de copias es demasiado importante respecto al número de principios. Se comprende que la PCR se efectúe con una enzima resistente al calor, la Taq polimerasa, aislada a partir de bacterias que viven en manantiales calientes (Thermus aquaticus), puesto que las enzimas de los mamíferos no resistirían aquellas temperaturas. Esto evita el aporte de enzimas en cada ciclo y permite la automatización de la técnica.

En la práctica, los productos necesarios para la reacción se introducen juntos en un microtubo de ensayo colocado en un bloque calentador cuya temperatura está controlada por un microprocesador. Se efectúan así, de manera automática, de 30 a 40 ciclos (de ahí el nombre de polimerización en cadena). Debido al interés económico de la PCR, se han tratado de desarrollar

procesos de ampliación alternativos, pero éstos son, en general, más difíciles de poner en práctica (requieren varias enzimas o varios cebadores) y dan resultados menos confiables.[104]

CREACION DE LOS CEBADORES

La mayor dificultad de la PCR es elegir el emplazamiento de los cebadores que se emplean. Su creación necesita de manera imprescindible conocer la secuencia de nucleótidos del fragmento, o al menos sus extremos. Pero ciertas argucias permiten también trabajar en fragmentos desconocidos del genoma cuya secuencia se desea conocer. Si el material genético contiene una porción conocida, el fragmento se aisla del resto de ADN gracias a unas enzimas de restricción -que permiten partir el ADN en sitios precisos-, y luego se circulariza. Entonces, ya es posible ampliarlo colocando los cebadores en el fragmento conocido. Es la PCR inversa. De este modo, es posible conocer la secuencia de aminoácidos de una proteína, y si se desea, ampliar el gen correspondiente para estudiarlo. Para ello se recurre al código genético, que a una serie de nucleótidos del ADN, hace corresponder a una serie de aminoácidos. A partir de la secuencia proteica, se construye una serie de cebadores correspondientes a las diferentes secuencias posibles del ADN, que se llaman "degeneradas". Algunos de estos cebadores se fijarán en el gen que hay que ampliar.

Finalmente, si sólo se conoce un extremo del fragmento de ADN, es posible fijar en el otro extremo un "ancla" de secuencia

conocida (generalmente una sucesión de G). En este caso, el segundo cebador está constituido por la secuencia complementaria (una sucesion de C). Esto permite comprender por qué la PCR se ha convertido en un instrumento indispensable para los investigadores de genética molecular. El éxito de una ampliación pasa también por ajustar las condiciones experimentales con el fin de obtener un buen emparejamiento de los cebadores en el fragmento que hay que ampliar. La temperatura a la que se colocan los cebadores es particularmente critica. Si es demasiado elevada, los cebadores se emparejan mal y se corre el riesgo de que los fragmentos no se amplien. En cambio, si la temperatura es demasiado baja, los cebadores se fijan en fragmentos de ADN diferentes del que se desea ampliar, pero de secuencia próxima. La temperatura óptima para una buena "colocación" de los cebadores depende de su longitud y de la proporción de nucleótidos C y G que contienen. Por otra parte, el contenido en iones de magnesio del medio ha demostrado ser también critico, por lo que debe ajustarse a cada caso particular.[104]

ANALISIS DEL ADN AMPLIADO

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR son tan cuantiosos que es imposible que se revelen directamente por electroforesis. No basta con asegurarse que el fragmento ampliado tiene el tamaño correcto, ya que la PCR es una técnica en la que el número de "falsos positivos" es importante. Por tanto, suele ser necesario verificar con otros métodos, que la ampliación es especifica y que se está realmente en presencia del fragmento que se desea. La

secuencia de nucleótidos del fragmento puede determinarse directamente. También es posible recurrir a una sonda marcada (radioactiva, fluorescente, etc.), constituida por una secuencia corta complementaria de una región interna del fragmento en cuestión, en la que habrá de fijarse.

Finalmente, puede procederse a un nuevo ciclo de ampliación, pero esta vez utilizando un cebador marcado, que se fija únicamente en el interior del fragmento deseado, y que autentifica la secuencia ampliada.[104]

La PCR permite una identificación directa de deleciones en un gen determinado. Muchos puntos de mutaciones producen o modifican el sitio de restricción de la endonucleasa blanco. La presencia o ausencia de tales condiciones puede ser comprobada mediante los patrones de digestión del producto de la PCR amplificada. Finalmente, los oligonucleótidos alelo-específicos examinados de los productos de la PCR permite las detección de mutaciones que no alteran los patrones de restricción.

PREPARACION Y MAPEO DEL ADN

Normalmente se preparan de 10 a 20 ml de sangre periférica o de biopsias de vellosidades coriónicas. El mapeo del ADN se realiza de acuerdo al método descrito por Old y Higgs. En un caso, el ADN para la PCR se obtuvo de una mancha Guthrie seca de 5 años. El ADN fue extraído de acuerdo al método descrito por Jinks et. al.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

MATERIAL Y EQUIPO

La amplificación se realiza usando polimerasa de ADN de Thermus aquaticus mediante un método modificado del de Saiki et. al. Los oligonucleótidos cebadores se construyen usando un sintetizador de ADN Applied Biosystems Model 381 A. El contenido de la mezcla de reacción es de 500 ng a 1 microgramo de ADN genómico; 50 mM de cloruro de potasio; 10 mM de Tris a pH 8.3; 1.5 a 3.0 mM de cloruro de magnesio (especificado abajo); 2 cebadores a 1.5 microM cada uno; trifosfato de desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) cada uno a 300 microM; y 100 microgramos/mL de gelatina. La mezcla de reacción se calienta a 94-96°C durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN. Se añaden 2.5 unidades de Taq-polimerasa o bien 1 unidad de Amplitaq (ambas de Perkin-Elmer Cetus Instruments), a temperatura de "recocido" a un volumen total de reacción de 100 microlitros. La mezcla se cubre con 100 microlitros de aceite de parafina. Se pueden realizar hasta 30 ciclos de amplificación con un reciclador Perkin-Elmer Cetus Corporation Autometed Thermal. En cada caso, el cebador endurecido se prepara durante 30 segundos, la extensión del cebador a 72°C durante 40 segundos, y la desnaturalización por 30 segundos a 94°C. Después del paso del endurecimiento en el último ciclo, las muestras se incubaron durante 7 minutos adicionales a 72°C. Posteriormente, se realiza la electroforesis de 10 microlitros de los productos de reacción sobre un minigel de poliacrilamida, al 6 o 12%, (en un aparato

Protean II, Bio-Rad) en buffer de Tris-borato-EDTA, o bien en un minigel de agarosa al 2% en un buffer de gel de agarosa después de haber sido calentada a 72°C durante 3 minutos. Se usa una forma replicativa de ADN (HaeIII digerido, O x 174, de New England Biolabs) como un marcador de medida. El producto de la amplificación se puede visualizar y fotografiar después de teñirlo con bromuro de etidio. Después de una extracción con una solución de fenol-cloroformo y una precipitación con etanol, el ADN amplificado se digiere con 10 U de las enzimas de restricción apropiadas durante 4 horas y sometido a electroforesis como se describió anteriormente.[2]

INVESTIGACION DE OLIGONUCLEOTIDO ALELO-ESPECIFICO (ASO)

Se diluyen 10 microlitros de cada muestra de ADN amplificado en una solución de hidróxido de sodio 0.1 M y cloruro de sodio 3 M, calentada durante 1 minuto y se neutralizan en 10 volúmenes de cloruro de sodio 3 M, Tris 1 M a pH 7.5. Las muestras fueron se aplican en un aparato Bio-Rad de "punto-mancha". Los puntos replicados se preparan por hibridización con los grupos apropiados de ASO. Después de un incremento en 2 x SSC (1 x SSC = cloruro de sodio 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M), el ADN se fija con membranas de nylon mediante radiación UV a los filtros húmedos durante 2 minutos. Los filtros se prehibridizan en una mezcla de cloruro de sodio 0.9 M, fosfato de sodio dihidrogenado 50 mM (pH 7.4), EDTA mM, SDS 0.1% y 10 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón durante 2 horas. La hibridización con 2x106/ml cpm del oligonucleótido 5'-[gamma-32]-marcaje-final examinado en

la solución de prehibridización se realizó durante 6 horas. Se realizan 3 lavados de 15 minutos cada uno a temperatura ambiente en 6 X SSC, seguidos de 5 minutos en una solución que contiene cloruro de tetrametilamonio 3 M, Tris 50 mM a pH 8.0, EDTA 2 mM y SDS al 0.1%. Los filtros se lavan dos veces durante 20 minutos en esta última solución a 55°C. La realiza una autoradiografía durante toda la noche a -70°C usando película Kodak XAR-5 y una pantalla de intensificación DuPont Quanta III.

Al igual que sucede con la HPLC, en esta técnica se requiere de material y equipo sofisticados para realizar pruebas con la sensibilidad y rapidez que se requieren para llevar a cabo estudios de rutina. Esto la hace una técnica cara, pero tal vez muy redituable, dado que puede aplicarse en cualquier investigación de anormalidades genéticas.

Como el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha vuelto una herramienta común en los laboratorios de diagnóstico genético la prevención de la contaminación transferida de amplificaciones previas de PCR ha llegado a ser un tópico urgente. Recientemente se ha descrito una técnica de prevención respecto a esta contaminación en la PCR, utilizando deoxiuridin-trifosfato (dUTP) y uracil-ADN-glucosilasa (UDG). Este reporte refiere la adaptación de esta técnica a un sistema diagnóstico para detectar enfermedades de hemoglobinas SS y SC. Se realizó una excelente amplificación incrementando las concentraciones de dUTP y de $HgCl_2$. El contenido de dU en el ADN se pudo analizar mediante la restricción de endonucleasas para distinguir la forma beta S del gen A usando DdeI, pero otras dos

enzimas de restricción, Bsu361 (reemplazada con Hst11 por el fabricante) y Cun1, no pudieron ser usadas. El contenido de dU en los productos de la PCR conservó su hibridización específica con oligonucleótidos alelo-específicos (ASO) probados para los genes beta A, S y C. A decir de los autores, esta técnica es fácil de usar y toma sólo 20 minutos adicionales, y podría ser extremadamente útil para los laboratorios de diagnóstico genético donde la PCR es repetida diariamente y la contaminación transferida puede de este modo conducir a un diagnóstico erróneo.[40]

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA Y ESPECTROMETRIA DE MASAS POR ELECTROSPRAY

En la determinación de variantes de hemoglobina, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y la espectrometría de masas por electrospray (ESMS), son métodos excelentes por su precisión y exactitud. H. E. Witkowska y cols., realizaron el análisis en microescala de una variante de hemoglobina (Hb) mediante la ejecución combinada de cromatografía líquida de alta eficiencia y la espectrometría de masas por electrospray, y el método podría ser de aplicación casi universal. Se eliminó la escala preparatoria de la HPLC de las cadenas de globina y los semipreparativos, también en el HPLC, en la digestión proteolítica, los cuales han sido usados previamente en la espectrometría de masas. El uso de columnas de HPLC microperforadas reduce el tiempo requerido para el análisis de manera substancial y el uso de solvente en un 100%. Las masas

moleculares de las globinas intactas y las masas y la secuencia de información de los péptidos tripticos, pudieron ser obtenidos sin un orden específico ni analizando en forma separada las fracciones cromatográficas. Como un ejemplo del uso de estos métodos, se reportó la caracterización del caso de una hemoglobinopatia desconocida, que finalmente fue autentificada como Hb P-Galveston (beta 117[G19]His----Arg), usando la siguiente secuencia de análisis: 1) ESMS del hemolisado completo, 2) HPLC analítica de las cadenas de globina, 3) combinación de HPLC microperforada/ESMS de las cadenas de globina para determinar sus masas moleculares, 4) derivación de cisteína y digestión tríptica de la mezcla de todas las globinas, seguidas por la separación (en las microperforaciones) de los péptidos, determinación de la masa molecular, y generación de patrones de fragmentación permitiendo la confirmación de la secuencia del aminoácido. Esta estrategia de cuatro partes permitirá la caracterización de casi todas las variantes de hemoglobina. Las excepciones podrían ser las mutaciones en regiones de las cadenas de globina, las que darían una elevación para pequeños péptidos tripticos (menos cuatro residuos), ya sea de modo normal o producida por adición de nuevos sitios tripticos y mutaciones que inducen sólo pequeñas diferencias en el peso molecular de los péptidos tripticos. Dado que sólo el 10% de cada péptido separado es masa analizada, el 90% está disponible para la colección y posteriores identificaciones estructurales (por ejemplo un tándem de espectrometría de masas o para una secuencia de Edman), si la identificación es todavía dudosa.[111]

La caracterización de la hemoglobina a través de la separación del total de sus proteínas y el mapeo por digestión tríptica, permitió la identificación de variantes estructurales de hemoglobina, las cuales dan origen a hemoglobinopatías. El mapeo por digestión tríptica mediante la cromatógrafo-electroforesis bidimensional convencional, en papel, proporciona una alta resolución pero requiere de 48 hr, mientras que la fase inversa por gradiente de concentración mediante HPLC, es más rápida (1.5 hr), pero disminuye la resolución del estudio. El análisis por electroforesis capilar (CE), proporcionó una rápida separación con una alta separación. Ross y colaboradores, han usado la CE para optimizar la digestión tríptica de la globina purificada de la hemoglobina normal humana (HbA) y para analizar la digestión tríptica de la hemoglobina normal. La optimización de las separaciones y del pico se realizaron empleando un detector de UV.

En la optimización de la separación por digestión tríptica, se pudieron resolver más de 28 picos en menos de 20 minutos. Estos picos fueron identificados tanto como fue posible y se construyó un mapa de la digestión, de alta resolución. Las condiciones analíticas de la optimización se usaron para observar los patrones de la separación que fueron obtenidos de la hemoglobina normal del adulto (HbA), las variantes de hemoglobina comunes y algunas variantes raras de hemoglobina.[115]

Para el diagnóstico y comprensión de las hemoglobinopatías, es esencial realizar una identificación y cuantificación precisas de las hemoglobinas. El perfil hemoglobínico de la sangre del

cordón, es sumamente complicado dada la presencia de cantidades relativamente elevadas de hemoglobina fetal. La investigación por electroforesis requiere una combinación de los métodos alcalino (acetato de celulosa) y ácido (agar citrato). A pesar de que las variantes comunes de la cadena beta de las hemoglobinas S y C se observan fácilmente, la diferenciación entre condiciones tales como hemoglobina S heterocigota (HbAS), HbAS-α-talasemia, HbS-β+-talasemia y homocigotos de hemoglobina S (HbSS), resulta, a veces muy difícil.

Recientemente, Ou et. al. describieron un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), usando una columna de intercambio catiónico y un pH combinado y NaCl como gradiente para la separación y cuantificación por detección espectrofotométrica. Para evaluar este método de investigación de sangre en cordón umbilical, se estudiaron las frecuencias de genes de las variantes estructurales de HbS y HbC y la síntesis de variantes de α-talasemia (mediante el ensayo de Hb de Bart) en la sangre del cordón de bebés recién nacidos en la isla caribeña de Curazao. Aunque la frecuencia de α-talasemia es desconocida, parece razonable esperar datos similares a aquellos reportados para la población negra de Estados Unidos y Jamaica.[69,111]

MATERIALES Y METODOS

Las muestras de sangre del cordón, se recolectan después de la ligadura del mismo. Después de esto, la sangre se coloca en tubos de vacutainer conteniendo EDTA (Becton Dickinson Vacutainer System Europe, Meyland France); si es necesario el transporte de

las muestras hasta el laboratorio donde se realizarán las pruebas, este se puede hacer en hielo. Las muestras deben centrifugarse durante 5 minutos a 1500 x g a temperatura ambiente (24°C). Luego de retirado el plasma, se lisan los eritrocitos mediante la adición de un volumen igual de agua bidestilada. Después se añaden 5 microlitros del lisado a 1.0 ml de buffer A (ver abajo), lo mezclamos y luego lo centrifugamos a 6000 x g durante 5 minutos; esta será nuestra solución muestra.

REACTIVOS

[Bis(2-hidroxietil)amino]tris(hidroximetil)metano (Bis Tris)

Cianuro de potasio

Cloruro de sodio

Tritón X-100

Solución de control de hemoglobina (control AFCS), que contenga al menos, cantidades iguales de HbA, HbF, HbC y HbS

PERFIL DE LA HEMOGLOBINA

Se usa el "System Gold" integrado de HPLC de Beckman Instruments (Brea, CA), que consiste de un módulo de distribución de solvente modelo 126, un espectrofotómetro modelo 166 y un integrador modelo 427. El sistema se equipa con una columna de 200 x 4.6 (i.d.) mm empacada con microparticulas de 5 micrómetros de poli(ácido aspártico) silica (poli Cat A) de Custom LC (Houston TX).

En este sistema, la separación de las hemoglobinas es realizado por una combinación de NaCl y gradientes de pH. El buffer A (pH 6.5) contiene 40 mmol de Bis Tris, 4 mmol de KCN y 0.5 ml de Tritón X-100 por litro. El buffer B (pH 6.5) contiene 40 mmol de Bis Tris, 4 mmol de KCN, 200 mmol de NaCl y 0.5 ml de Tritón X-100 por litro. El pH de los buffers se ajustan con 4 mol/l de HCl. Antes de usarse, deben filtrarse a través de una membrana de 0.45 micrómetros de tamaño de poro. Para el análisis de la hemoglobina, se inyectan porciones de 20 microlitros de la solución muestra (ver arriba) con un flujo de 1.0 ml/min. La columna efluente se debe monitorear a 420 nm.

Para identificar las hemoglobinas A, F, C y S en las muestras de sangre del cordón, se comparan los tiempos de retención de los picos de la HPLC con los obtenidos por el control de AFCS. La Hb de Bart se identifica analizando una muestra de sangre de cordón con un gran porcentaje de esta hemoglobina. Los porcentajes del área de los picos sirven para calcular la composición de la hemoglobina, suponiendo que las masas iguales analizadas se incrementan proporcionalmente al área de los picos obtenidos.

GRADIENTE DE pH INMOVILIZADO

Un nuevo método para el análisis de variantes de hemoglobina es el de gradientes de pH inmovilizados. El fraccionamiento isoeléctrico es realizado en geles de poliacrilamida con gradientes de pH copolimerizados, entre pH 7.0 a 8.0. La variantes más comunes de la hemoglobina (HbA, HbF, HbS, HbC, y HbA_2) se resuelven claramente dentro de este rango de pH. El alto

poder de resolución y reproducibilidad de los gradiente de pH combinados con los tiempos de separación extremadamente cortos, hacen de este fraccionamiento una técnica superior a todos los procedimientos electrocinéticos usados para el análisis de hemoglobina. Actualmente, la convergencia isoeléctrica en los gradientes de pH inmovilizados, es una herramienta complementaria para el análisis de la hemoglobina donde las técnicas electroforéticas clásicas no proveen de una resolución suficiente. Se espera que en el futuro esta técnica alcance la popularidad que merece.[117]

RESUMEN

Las hemoglobinopatias son los desordenes genéticos sanguineos más importantes. Estos desordenes, se presentan cuando existe la substitución de alguno de los aminoácidos que componen las cadenas alfa o beta de la hemoglobina. Este tipo de anomalias se heredan siguiendo las leyes de Mendel. El número de mutaciones a este nivel es muy grande, pero son relativamente pocas las hemoglobinas anormales que son clinicamente importantes.

Entre las hemoglobinas de importancia clinica se encuentran las hemoglobinas C,D,M y S incluyendo también a las talasemias, aunque el defecto de éstas no se debe a la substitución en algún aminoácido de las cadenas, sino al desequilibro en la producción de éstas; dentro de las talasemias se encuentran las hemoglobinopatias producidas por las hemoglobinas E y H.

Las hemoglobinopatias se pueden clasificar en 5 grupos; éstos son los siguientes:

1. Hemoglobinas anormales sin alteraciones fisiológicas, cuyo interés es sólo de estudio genético y bioquimico, dado que carecen de significancia clinica. Es el mayor de los cinco grupos.
2. Hemoglobinopatias "de agregación", que producen cambios estructurales en el eritrocito.
3. Sintesis "no equilibrada" de hemoglobina, dentro del que se encuentran los sindromes talasémicos; las cadenas en exceso suelen precipitar en cuerpos de Heinz.

4. Hemoglobinas inestables, las que presentan una substitución de aminoácidos en la región de fijación al hem.
5. Hemoglobinas con función hem anormal, cuyas manifestaciones clínicas son debidas a la alteración en la afinidad por el oxígeno.

Las hemoglobinopatías de importancia clínica presentan complicaciones a diferentes niveles orgánicos, afectando a un órgano en particular hasta todo un sistema.

La hemoglobina S, en la que el ácido glutámico es substituido por valina, presenta complicaciones orgánicas a diferentes niveles sistémicos. De manera muy general, estas complicaciones son, entre muchas otras: crisis hipoplásica, anemia falciforme, tromboembolias, eritrostasis, hematuria, lesión estructural de la médula renal, glomerulopatía, anorexias, vómitos, ictericia, náuseas, dolor intenso en cualquier parte del abdomen, secuestro esplénico, infarto cerebral, alteración del funcionamiento neurocognocitivo, anomalías vasculares conjuntivales, retinopatía, microaneurismas, disfunción coclear y retrococlear, artritis, osteomielitis, deformación de cuerpos vertebrales, infarto de médula ósea. En recién nacidos; anomalías radiológicas, complicaciones de neumonía, diarreas, etc.

La hemoglobina C, en la que el defecto estructural se sitúa en la sexta posición del extremo amino terminal de la cadena beta, donde el ácido glutámico es substituido por lisina, manifiesta complicaciones leves y, en su estado heterocigoto, es

una enfermedad silenciosa. Se han encontrado complicaciones que involucran una disminución en la capacidad auditiva, dilatación esplénica, anemia (de poco severa a moderada), colelitiasis y otras manifestaciones leves, cuya asociación con HbC es difícil de determinar.

En el caso de las Talasemias, estas se consideran como hemoglobinopatías, aunque su defecto se deba al desequilibrio en la síntesis de las cadenas de hemoglobina. Las talasemias se clasifican según sus manifestaciones clínicas en Mayor, Intermedia, y Menor. Las hemoglobinas H y E se consideran como variantes de talasemia. Las manifestaciones clínicas de las talasemias, son generalmente comunes a todos los tipos de ellas y la severidad de estas manifestaciones depende de la condición homocigota o heterocigota de la enfermedad. Entre estas manifestaciones se encuentran úlceras o cicatrices no dolorosas en extremidades inferiores, pseudoxantoma elástico, anomalías cardíacas, secuestro esplénico, insuficiencia renal crónica, compresión crónica de médula espinal, reducción en la oclusión de vasos retinianos, disminución de la densidad ósea, hiperplasia de médula ósea, complicaciones fetales severas, hipoparatiroidismo e incluso, se presume una relación estrecha con caries dental y gingivitis.

Las pruebas diagnósticas para las hemoglobinopatías, podemos dividirlas en técnicas rutinarias y técnicas de punta. Para las primeras, se emplean normalmente las técnicas de electroforesis en acetato de celulosa y en agar de citrato.

Mediante la técnica de electroforesis en acetato de celulosa pueden diferenciarse las hemoglobinas C y A_1, de un grupo formado por las hemoglobinas A_2, C, E y O; también logran diferenciarse las un grupo formado por las hemoglobinas S, D y G, de las hemoglobinas A y F.

La electroforesis en agar de citrato, permite diferenciar a un grupo formado por las hemoglobinas A, D, G, E y O de las hemoglobinas C, S y F. La electroforesis de la cadena de globina permite la caracterización de otras hemoglobinas que tienen movilidades similares sobre acetato de celulosa o agar de citrato; esta electroforesis se realiza tanto a pH alcalino como a pH ácido.

La prueba de solubilidad para hemoglobinas con carácter falciforme, permite identificar de manera rápida y simple a hemoglobinas de este tipo entre las cuales se encuentra la hemoglobina S.

Las técnicas "de punta", son metodologías que se usan normalmente en estudios de investigación, más que como elementos de diagnóstico rutinario.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite obtener, en un breve lapso de tiempo, un gran número de copias de la porción de ADN que se desee estudiar. La sensibilidad que aporta esta técnica es tal que actualmente es ya posible analizar un gen aunque sólo se disponga del ADN de una célula. Su principio es sencillo: consiste en copiar hasta mil millones de veces, en un tubo de ensayo, un fragmento del genoma que se desea estudiar. La

PCR permite una identificación directa de supresiones o mutaciones de un gen determinado.

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia y la Espectrometría de Masas por Electrospray permiten el análisis, en microescala, de variantes de hemoglobina, siendo estos métodos muy exactos y precisos.

Existen otros estudios, como el llamado "Perfil de Hemoglobina", y el gradiente inmovilizado de pH, que utilizan la combinación de dos o más métodos para determinar la presencia y cuantificación de variantes de hemoglobinas, realizando un análisis más profundo de éstas.

BIBLIOGRAFIA

1. Raghavan K; Lokeshwar MR; Birewar N; Nigam V; Manglani MV; Raju NB. *Evaluation of naked eye single tube red cell osmotic fragility test in detecting beta-thalassemia trait.* Indian-Pediatr; 1991 May; 28(5); P 469-72.

2. Lindeman R; Wallace R; Volpato F; Hu SP; Trent RJ. *Utility of the polimerase chain reaction (PCR) for prenatal diagnosis of genetic disease.* Pathology; 1991 Apr; 23(2); P 158-63.

3. Lubin BH; Witkowska HE; Kleman K. *Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies.* Clin-Biochem; 1991 Aug; 24(4); P 363-74.

4. Shyamala M; Kiefer CR; Moscoso H; Garver FA. *Application of a monoclonal antibody specific for the delta chain of hemogobin A2 in the diagnosis of beta thalassemia.* Am-J-Hematol; 1991 Nov; 38(3); P 214-9.

5. Cesana EM; Maiolo AT; Gidiuli R; Damiano I; Massaro P; Polli EE. *Relevance of red cell distribution width (RDW) in the differential diagnosis of microcytic anaemias.* Clin-Lab-Haematol; 1991; 13(2); P 141-51.

6. Bessler M; Fher J. *Fc III receptors (FcRIII) on granulocytes: a specific and sensitive diagnostic test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH).* Eur-J-Haematol; 1991 Sep; 47(3); P 179-84.

7. Mazurova UL; Biriukov VB; Matveeva EV; Rasulov EM; Kolesnikova TN; Kuliev AM. *Prenatal diagnosis of beta-thalassemia.* Akush-Ginekol-(Mosk); 1991 Jul(7); P 16-8.

8. Summers KM; Halliday JW; Powell LW. *Is determination of the hepatic iron index of diagnostic value in patients with thalassemia minor and chronic alcoholic liver disease?* Hepatology; 1991 Nov; 14(5); P 959-60.

9. Mendez-Marco MT; Arce de Obieta C; Palacios-Alaiz E. *Changes in erythrocyte membrane proteins in patients with cirrhosis.* Rev-Esp-Fisiol; 1991 Sep; 47(3); P 115-20.

10. Mosca A; Paleari R; Modenese A; Rossini S; Parma R; Rocco C; Russo V; Caramenti G; Paderi ML; Galanello R. *Clinical utility of fractionating erythrocytes into "Percoll" density gradients.* Adv-Exp-Med-Biol; 1991; 307; P 227-38.

11. Delamaire M; Durand F; Grosbois B; Le Dantec G; Dauriac C; Le Goff MC; Le Blay R; Genetet B. *Is there a mechanical factor of haemolysis in patients with positive IgG-type direct antiglobulin test?* Br-J-Haematol: 1992 Jan: 80(1): P 91-6.

12. Sierra RD. *Coombs-positive hemolytic anemia in Hodgkin's disease: case presentation and review of the literature.* Mil-Med: 1991 Dec: 156(12): P 691-2.

13. d'Onofrio G; Zini G; Ricerca BM; Mancini S; Mango G. *Automated measurement of red blod cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and beta-thalassemia trait.* Arch-Pathol-Lab-Med: 1992 Jan: 116(1): P 84-9.

14. Lin CK; Yang ML; Jiang ML; Chien CC; Lin HH; Peng HW. *Comparison of two screening methods, modified Hb H preparation and the osmotic fragility test, for alpha-thalassemia traits on the basis of gene mapping.* J-Clin-Lab-Anal: 1991: 5(6): P 392-5.

15. Han P; Fung KP. *Discriminant analysis of iron deficiency anaemia and heterozygous thalassemia traits: a 3-dimensional selection of red cell indices.* Clin-Lab-Haematol: 1991: 13(4): P 351-62.

16. Rund D; Filon D; Strauss N; Rachmilewitz EA; Oppenheim A. *Mean corpuscular volume of heterozygotes for beta-thalassemia correlates with the severity of mutations.* Blood: 1992 Jan 1: 79(1): P 208-43.

17. Test ST; Bittiker P; Yee MC; Huypens FA; Lubin B. *Characterization of the complement reactivity of calcium loaded human erythrocytes.* Blood: 1991 Dec 1: 78(11): P 3056-65.

18. Druml W; Grimm G; Laggner AN; Schneeweiss B; Lenz K. *Hyperlipidemia in acute hemolysis.* Klin-Wochenschr: 1991 Jul 22: 69(10): P 426-9.

19. Lawrence C; Fabry ME; Nagel RL. *The unique red cell heterogeneity of SC disease: crystal formation, dense reticulocytes, and unusual morphology.* Blood: 1991 Oct 15: 78(8): P 2104-12.

20. Telen MJ; Roberts KB; Bartlett JA. *HIV-associated autoimmune hemolytic anemia: report of a case and review of the literature.* J-Acquir-Immune-Defic-Syndr: 1990: 3(10): P 933-7.

21. Quelpo de Llano MP; Yebra M; Moreno M; Lacoma F; Gea JC; Berrocal E. *Thalassemia minor with iron overload: genetic*

and clinical study of a family. Med-Clin-(Barc): 1991 Nov 16; 97(17): P 660-2.

22. Chifu Y: Nakashima H: Hara H: Yokota E: Imamura T. *Beta-thalassemia major resulting from a compound heterozygosity for the beta-globin gene mutation: further evidence for multiple origin and migration of the thalassemia gene.* Hum-Genet: 1992 May: 89(3): P 343-6.

23. Ronao L: Cash F: Weiss I: Liebhaber S: Pirastu M: Galanello R: Loi A: Paglietti E: Ioannou P: Cao A. *Human alpha-globin gene expression is silenced by terminal truncation of chromosome 16p beginning immediately 3' of the zeta-globin gene.* Hum-Genet: 1992 May: 89(3): P 323-8.

24. Zhang YH: McCabe ER. *RNA analysis from newborn screening dried blood specimens.* Hum-Genet: 1992 May: 89(3): P 311-4.

25. Jo T: Momita S: Sadamori N: Timonaga M: Fucharoen S: Fukumaki Y: Ichimaru M. *A case of beta-thalassemia wit a C----T substitution at position 654 of the second intervening sequence of the beta-globin gene.* Intern-Med: 1992 Feb: 31(2): P 269-72.

26. Stone WL: Payne PH: Adebonojo FU. *Plasma-vitamin E and low plasma lipoprotein levels in sickle cell anemia patients.* J-Assoc-Acad-Minor-Phys: 1990: 1(2): P 12-6.

27. Efremov DG: Dimovski AJ: Efremov GD. *Detection of beta-thalassemia mutations by ASO hibridization of PVR amplified DNA with digoxigenin dUTP labeled oligonucleotides.* Hemoglobin: 1991: 15(6): P 525-33.

28. Kazazian HH Jr: Dowling YE: Hurwitz RL: Coleman M: Stopeck A: Adams JG. *Dominant thalassemia-like phenotypes associated with mutations in exon 3 of the beta-globin gene.* Blood: 1992 Jun 1: 79(11): P 3014-8.

29. Charache S: Dover GD: Moore RD: Eckert S: Ballas SK: Koshy M: Milner PF: Orringer EP: Phillips G Jr: Platt OS: et. al. *Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia.* Blood: 1992 May 15: 79(10): P 2555-65.

30. Bunyaratvej A: Butthep P: Fucharoen S: Saw D. *Erythrocyte volume and haemoglobin concentration in haemoglobin H disease: discrimination between the two genotypes.* Acta-Haematol: 1992: 87(1-2): P 1-5.

31. Toumbis CA: Stadler I: Ambrus JL. *Effect of blood red cells from patients with sickle cell disease on platelet factor 3 release.* Am-J-Hematol: 1992 Jun: 40(2): P 149-50.

32. Gottardi E; Loseekoot M; Fodde R; Saglio G; Camaschella C; Bernini LF. *Rapid identification by denaturing gradient gel electrophoresis of mutations in the gamma-globin gene promoters in non-deletion type HPFH.* Br-J-Haematol: 1992 Apr: 80(4): P 533-8.

33. Wanachiwanawin W; Pootrakul P; Pucharoen S; Piankijagum A. *High-dose intravenous immunoglobulin in the management of immune hemolysis refractoriness.* Southeast-Asian-J-Trop-Med-Public-Health: 1991 Sep: 22(3): P 397-401.

34. Hill AV. *Molecular epidemiology of the thalassaemias (including haemoglobin E).* Baillieres-Clin-Haematol: 1992 Jan: 5(1): P 209-38.

35. Beris PH; Darbellay R; Beck D; Oner R. *Concomintant inheritance of homozygous alpha-thalassemia-2 with homozygous IVS-I-5 G-C beta gene mutation does not influence the severity of the thalassemic phenotype.* Nouv-Rev-Fr-Hematol: 1991: 33(3): P 227-30.

36. Padmos MA; Roberts GT; Sackey K; Kulozik A; Bail S; Morris JS; Serjeant BE; Serjeant GR. *Two different forms of homozygous sickle cell disease occur in Saudi Arabia.* Br-J-Haematol: 1991 Sep: 79(1): P 93-8.

37. Basak AN; Ozgelik H; Uzer A; Tolun A; Akcay M; Agaoglu L; Ridolfi F; Ulukutlu L; Akar N; Gurgey A; et al. *The molecular basis of beta-thalassemia in Turkey.* Hum-Genet: 1992 May: 89(3): P 315-8.

38. Urvieto R; Leichter I; Rachmilewitz EA; Margulies JY. *Bone density, mineral content, and cortical index in patients with thalassemia major and the correlation to their bone fractures, blood transfusions, and treatment with desferrioxamine.* Calcif-Tissue-Int: 1992 May: 50(5): P 397-9.

39. Olivieri NF; Koren G; Matsui D; Liu PP; Biendis L; Cameron R; McClelland RA; Templeton DM. *Reduction of tissue iron stores and normalization of serum ferritin during treatment with the oral iron chelator L1 in thalassemia intermedia.* Blood: 1992 May 15; 79(10): P 2741-8.

40. Wang X; Chen T; Kim D; Piomelli S. *Prevention of carryover contamination in the detection of beta S and beta C genes by polimerase chain reaction.* Am-J-Hematol: 1992 Jun: 40(2): P 146-8.

41. Bienvenu T; Sebillon P; Labie D; Kaplan JC; Beldjord C. *Rapid and direct detection of the most frequent Mediterranean beta-thalassemic mutations by multiplex allele-specific enzymatic amplification.* Hum-Biol: 1992 Feb: 64(1): P 107-13.

42. Giuzio E; Bria M; Bisconte MG; Caracciolo M; Qualtieri A; Misasi M Grillo G; Brancati C. *Osteoporosis in patients affected with thalassemia. Our experience.* Chir-Organi-Mov; 1991 Oct-Dec; 76(4); P 369-74.

43. Schrier SL; Mohandas N. *Globin-Chain especifity of oxidation-induced changes in red blood cell membrane properties.* Blood; 1992 Mar 15; 79(6); P 1586-92.

44. Giuzio E; Bria M; Bisconte MG; Caracciolo M; Misasi M; Nastro M; Bracanti C. *Skeletal changes in thalassemia major.* Ital-J-Orthop-Traumatol; 1991 Jun; 17(2); P 269-75.

45. Tarburton JP; Metcalf WK. *The kinetic differences betwen sodium nitrite, amyl nitrite and nitriglycerin oxidation of hemoglobin.* Histol-Histopathol; 1986 Jul; 1(3); P 213-7.

46. Kucuk O; Lis LJ; Day T; Mata R; Westerman MP; Yachnin S; Szostek R; Tracy D; Kaufman JW; Gage DA; et al. *The effects of cholesterol oxidation products in sickle and normal red blood cell membranes.* Biochim-Biophys-Acta; 1992 Jan 31; 1103(2); P 296-30.

47. Esposito NW. *Thalassemias: simple screening for hereditary anemias.* Nurse-Pract; 1992 Feb; 17(2); P 50, 53-5, 61.

48. Abbasciano V; Bonfer G; Graziano L; Mazzetta D; Vecchiatti G; Guglielmini C; Sartori S. *Serum and erythrocyte levels of magnesium in microcytosis: comparison betwen heterozygous beta-thalassemia and sideropenic anemia.* Haematologica; 1991 Jul-Aug; 76(4); P 339-41.

49. Arman MI; Butun B; Doseyen A; Bircan I; Guven A. *Frequency and features of rheumatic findings in thalassemia minor: a blind controlled study.* Br-J-Rheumatol; 1992 Mar; 31(3); P 197-9.

50. Humphries JE; Wheby MS. *Case report: sickle cell trait and recurrent deep venous thrombosis.* Am-J-Med-Sci; 1992 Feb; 303(2); P 112-4.

51. Weidner DA; Bridges EG; Cretton EM; Sommadossi JP. *Comparative effects of 3'-azido-3'-deoxythymidine and its metabolite 3'-amino--3'-deoxythymidine on hemoglobin synthesis in K-562 human leukemia cells.* Mol-Pharmacol; 1992 Feb; 41(2); P 352-8.

52. Greep N; Anderson AL; Gallagher JC. *Thalassemia minor: a risk factor for osteoporosis?* Bone-Miner; 1992 Jan; 16(1); P 63-72.

53. Chen MC; Koshy M; Kennedy J. *Pancytopenia caused by unsuspected pernicious anemia complicating sickle cell beta-thalassemia.* South-Med-J: 1992 Feb; 85(2): P 215-6.

54. Mason G; Scherrer F. *Sickle cell retinopathy.* Insight: 1991 Dec; 16(6): P 15-20.

55. Gould HJ; Crawford MR; Smith WR; Beckford N; Gibson WR; Pettit L; Bobo L. *Hearing disorders in sickle cell disease: cochlear and retrocochlear findings.* Ear-Hear: 1991 Oct; 12(5): P 352-4.

56. Gould HJ; Crawford MR; Smith WR; Beckford N; Gibson WR; Bobo L. *Prevalence of hearing loss in adults with sickle cell disease.* Ear-Hear: 1991 Oct; 12(5): P 349-51.

57. Advani R; Sorenson S; Shinar E; Lande W; Rachmilewitz E; Schrier SL. *Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human alpha- and beta-thalassemia.* Blood: 1992 Feb 15; 79(4): P 1058-63.

58. Andre M; Bergmann P; Forster A; Toppet M; Fondu P. *Serum immunoreactive erythropoietin level: a new parameter for monitoring transfusion management of thalassemia.* Nouv-Rev-Fr-Hematol: 1991; 33(4): P 299-302.

59. Mohammed SM; Suleiman SA; Addae SK; Annobil SH; Adzaku FK; Kadoumni OF; Richards JT. *Urinary hydroxyproline and serum alkaline phosphatase in sickle cell disease.* Clin-Chem-Acta: 1991 Dec 16; 203(2-3): P 285-94.

60. van Rhee F; Ware I; Littlewood T. *Abnormal haemoglobin electrophoresis caused by BW 120.* J-Clin-Pathol: 1992 Oct; 45(10): P 930.

61. Kalmanti M; Kalmantis T; Liacopoulou T; Tsoumakas K; Laiis V; Kattamis C. *Serum erythropoietin in regularly transfused thalassemic patients.* Haematologia-(Budap): 1991; 24(3): P 129-34.

62. Pantongrag-Brown L; Suwanwela N. *Case report: Chronic spinal cord compression from extramedullary haematopoiesis in thalassemia--MRI findings.* Clin-Radiol: 1992 Oct; 46(4): P 281-3.

63. Dong C; Chadwick RS; Schechter AN. *Influence of sickle hemoglobin polymerization and membrane properties on deformability of sickle erythrocytes in the microcirculation.* Biophys-J: 1992 Sep; 63(3): P 774-83.

64. Kaewkethong P; Bunyaratvej A; Darusrux S. *Different cell volume with high target cell population betwen liver disease and homocygous hemoglobin E.* J-Med-Assoc-Thai: 1992 Jan; 75 Suppl 1: P 228-32.

65. Ellory JC: Nash GB: Stone PC: Culliford SJ: Horwitz E: Stuart J. *Mode of action and comparative efficacy of pharmacological agents that inhibit calcium-dependent dehydration of sickle cells.* Br-J-Pharmacol: 1992 Aug: 106(4): P 972-7.

66. Vordermeier S: Singh S: Biggerstaff J: Harrison P: Grech H: Pearson TC: Dumonde DC: Brown KA. *Red blood cells from patients with sickle cell disease exhibit an increased adherence to cultured endothelium pretreated with tumour necrosis factor (INF).* Br-J-Haematol: 1992 Aug: 81(4): P 591-7.

67. Stone PC: Nash GB: Stuart J. *Substituted benzaldehydes (12C79 and 539C80) that stabilize oxyhaemoglobin also protect sickle cells against calcium-mediated dehydration.* Br-J-Haematol: 1992 Jul: 81(3): P 419-23.

68. Hatcher SL: Trang QT: Robb KM: Teplitz RL: Carlson JR. *Prenatal diagnosis by enzymatic amplification and restriction endonuclease digestion for detection of haemoglobins A, S and C. Mol-Cell-Probes:* 1992 Aug: 6(4): P 343-8.

69. van der Dijs FP: van der Berg GA: Schermer JG: Muskiet FD: Landman H: Muskiet FA. *Screening cord blood for hemoglobinopathies and thalassemia by HPLC.* Clin-Chem: 1992 Sep: 38(9): P 1864-9.

70. Phillips A Jr: Coffey B: Tran-Son-Tay R: Kinney TR: Orringer EP: Hochmuth RM. *Relationship of clinical severity to packed cell rheology in sickle cell anemia.* Blood: 1991 Nov 15: 78(10): P 2735-9.

71. Tomson CR: Edmunds ME: Chambers N: Bricknell S: Feehally J: Walls J. *Effect of recombinant human erythropoietin on erythropoiesis in homozygous sickle cell anemia and renal failure.* Nephrol-Dial-Transplant: 1992: 7(8): P 817-21.

72. Rosatelli MC: Tuveri T: Scalas MT: Leoni GB: Sardu R: Faa V: Meloni A: Pischedda MA: Demurtas M: Monni G: et al. *Molecular screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in the Italian population.* Hum-Genet: 1992 Aug: 89(6): P 585-9.

73. Crowley JP: Metzger JB: Merrill EW: Valeri CR. *Whole blood viscosity in beta thalassemia minor.* Ann-Clin-Lab-Sci: 1992 Jul-Aug: 22(4): P 229-35.

74. Berney SI: Ridler CD: Stephens AD: Thomas AE: Kovacs IB. *Enhanced platelet reactivity and hypercoagulability in the steady state of sickle cell anaemia.* Am-J-Haematol: 1992 Aug: 40(4): P 290-4.

75. Sowemimo-Coker SD; Haywood LJ; Meiselman HJ; Francis RB Jr. *Effects of normal and sickle erythrocytes on prostacyclin release by perfused human umbilical cord veins.* Am-J-Hematol; 1992 Aug; 40(4); P 276-82.

76. Cianciulli P; Sorrentino F; Forte L; Palombi M; Papa G; Meloni C; Taccone Gallucci M; Casciani CU. *Acute renal failure occurring during intravenous desferrioxamine therapy: recovery after haemodialysis.* Hematologica; 1992 Nov-Dec; 77(6); P 514-5.

77. Di Marco V; Lo Iacono U. Capra M; Grutta S; Ciaccio C; Gerardi C; Maggio A; Renda D; Almasio P; Pisa R; et al. *Alpha-interferon treatment of chronic hepatitis C in young patients with homozygous beta-thalassemia.* Hematologica; 1992 Nov-Dec; 77(6); P 502-6.

78. Fox PD; Higgs DR; Serjeant GR. *Influence of alpha-talassemia on the retinopathy of homozygous sickle cell disease.* Br-J-Ophthalmol; 1993 Feb; 77(2); P 89-90.

79. Bhattacharyya N; Wayne AS; Kevy SV; Chamberger RC. *Perioperative management for cholecystectomy in sickle cell disease.* J-Pediatr-Surg; 1993 Jan; 28(1); P 72-5.

80. Sheehan AG; Machida H; Buttner JD. *Acute pancreatitis in a child with sickle cell anemia.* J-Natl-Med-Assoc; 1993 Jan; 85(1); P 70-2.

81. Brown RT; Armstrong PD; Eckman JR. *Neurocognitive aspects of pediatric sickle cell disease.* J-Learn-Disabil; 1993 Jan; 26(1); P 33-45.

82. Al-Salem AH; Ahmed HA; Waisaruddin S; al-Jam'a A; Elbashier AM; al-Dabbous T. *Osteomyelitis and septic arthritis in sickle cell disease in the eastern province of Saudi Arabia.* Int-Orthop; 1992; 16(4); P 398-402.

83. De Sanctis V; Vullo C; Bagni B; Chiccoli L. *Hypo-parathyroidism in beta-thalassemia major.* Clinical and Laboratory observations in 24 patients. Acta-Haematol; 1992; 88(2-3); P 105-8.

84. Nigro G; Taliani G; Bartmann U; Vitolo R; Perrone T; Mattia S; Pisano P; Petruccelli A; Malozzi S; Midulla M. *Hepatitis in children with thalassemia major.* Arch-Virol-Suppl; 1992; 4; P 265-7.

85. Saltzman JR; Johnston DE. *Sickle cell crisis and cocaine hepatotoxicity.* Am-J-Gastroenterol; 1992 Nov; 87(11); P 1561-4.

86. Duncan ND: De Paz H: Serjeant GR. *Biliary surgery in patients with sickle-cell anaemia.* West-Indian-Med-J: 1992 Sep: 41(3): P 96-8.

87. Sadat-Ali M: Geeranavar SS: As-Suhaimi S. *Orthopaedic complications in sickle cell disease. A Comparative study from two regions in Saudi Arabia.* Int-Orthop: 1992: 16(3): P 307-10.

88. Dentico P: Buongiorno R: Volpe A: Zavoianni A: De Mattia D: Sabato V. *Long-term persistence of anti-HBs after hepatitis B inmunization in thalassaemic patients.* Infection: 1992 Sep-Oct: 20(5): P 276-8.

89. Konstantopoulos K: Vagiopoulos G: Kantouni R: Lymperi S: Patriarcheas G: Georgakopoulos D: Fessas P. *A case of spinal cord compression by extramedullary haemopoiesis in a thalassemic patient: a putative role for hydroxyurea?* Haematologica: 1992 Jul-Aug: 77(4): P 352-4.

90. Siamopoulou-Mavridou A: Mavridis A: Galanakis E: Vasakos S: Fatourou H: Lapatsanis P. *Flow rate and chemistry of parotoid saliva related to dental caries and gingivitis in patients with thalassemia major.* Int-J-Paediatr-Dent: 1992 Aug: 2(2): P 93-7.

91. Aessopos A: Savvides P: Stamatelos G: Rombos I: Tassiopoulos T: Karagiorga M: Makilamanis P: Fessas P. *Pseudoxanthoma elasticum-like skin lesions and angioid streaks in beta-thalassemia.* Am-J-Hematol: 1992 Nov: 41(3): P 159-64.

92. Rao SP: Miller ST: Cohen BJ. *Transient aplastic crisis in patients with sickle cell disease. Big parvovirus studies during a 7-year period.* Am-J-Dis-Child: 1992 Nov: 146(11): P 1326-30.

93. Derchi G: Bellone P: Forni GL: Lupi G: Jappelli S: Randazzo M: Zino V: Vecchio C. *Cardiac involvement in thalassemia major: altered atrial natriuretic peptide levels in asymptomatic patients.* Eur-Heart-J: 1992 Oct: 13(10): P 1368-72.

94. Hsieh FJ: Ko TM: Chen HY. *Hydrops fetalis caused by severe alpha-thalassemia.* Early-Hum-Dev: 1992 Jun-Jul: 29(1-3): P 233-6.

95. Mozzi F: Rebulla P: Lillo F: Varnier OE: Biadati C: Calcagno L: Melotti S: Sirchia G. *HIV and HILV infections in 1305 transfusions-dependent thalassemics in Italy.* AIDS: 1992 May: 6(5): P 505-8.

96. Ajulo SO. *'Priapism' of the turbinates: a cause of nasal obstruction in sickle cell anaemia.* J-Laryngol-Otol; 1991 Oct; 105(10); P 851-2.

97. van Rhee F; Blasitis M; Franch EA. *Fatal splenic sequestration crisis in adult sickle cell-beta thalassaemia.* Postgrad-Med-J; 1991 Oct; 67(792); P 907-8.

98. van Meurs JC. *Relationship between peripheral vascular closure and proliferative retinopathy in sickle cell disease.* Graefes-Arch-Clin-Exp-Ophthalmol; 1991; 229(6); P 543-8.

99. Orringer EP; Powler VG Jr; Owens CM; Johnson AE; Mauro MA; Dalldorf FG; Croom RD. *Case report: splenic infarction and acute splenic sequestration in adults with hemoglobin SC disease.* Am-J-Med-Sci; 1991 Dec; 302(6); P 374-9.

100. Adams R; Mckie V; Nichols F; Carl E; Zhang DL; Mckie K; Figueroa A; Litaker M; Thompson W; Hess D. *The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease.* N-Engl-J-Med; 1992 Feb 27; 326(9); P 605-10.

101. Verani RR; Conley SB. *Sickle cell glomerulopathy with focal segmental glomerulosclerosis.* Child-Nephrol-Urol; 1991; 11(4); P 206-8.

102. Lynch M J; Raphael S S; Mellor L D; Spare P D; Inwood M J H. *Métodos de Laboratorio.* 2a. edición. 1991; Nueva Editorial Interamericana. México. P 743-82.

103. Leavell SS; Thorup OA. *Hematología Clínica.* 4a. edición. 1990; Nueva Editorial Interamericana. Mexico. P 24-36. 180. 196-217.

104. March Delpech; *Un nuevo instrumento para el diagnóstico medico.* Mundo Cientifico; 132(13); P 174-180.

105. Beuzard Y; Garel M-C; Saadane N; Rouyer-Fessard P. *Un modelo transgenico para la drepanocitosis.* Mundo Cientifico; 122(12); P 266-267.

106. Ganong William F; *Fisiología Médica.* 9a edición. 1984; Editorial El Manual Moderno. Mexico. P 435-440. 550.

107. Shen TJ; Ho NT; Simplaceanu V; Zou M; Green BN; Tam MF; Ho C. *Production of unmodified human adult hemoglobin in Escherichia coli.* Proct-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1993 Sep 1; 90(17); P 8108-12.

108. Weycamp CK; Fenders TJ; Muskiet FA; van-der-Slik W. *Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102*

laboratories using 16 methods. Clin-Chem: 1993 Aug: 39(8): P 1717-23.

109. Wajcman H: Kister J: M'Rad A: Prome D: Milpied N: Rapp MJ: Rarousseau JL: Riou J: Bardakdjian J: Galacteros F: *Hb Saint Nazaire (beta 103[G5]Phe----Ile): a new example of polycythemia due to a hemoglobin variant with increased oxygen affinity.* Am-J-Hematol: 1993 Sep: 44(1): P 16-21.

110. Gabriel B: Josephs R. *On the stability of sickle hemoglobin macrofibers: isolated layers of antiparallel double strands.* J-Struct-Biol: 1993 Mar-Apr: 110(2): P 122-6.

111. Witkowska HE: Bitsch F: Shacleton CH. *Expediting rare variant hemoglobin characterization by combined HPLC/electrospray mass spectrometry.* Hemoglobin: 1993 Jun: 17(3): P 227-42.

112. Rivetti C: Mozzarelli A: Rossi GL: Kwiatkowski LD: Wierzba AM: Noble RW. *Effect to chloride on oxygen binding to crystals of hemoglobin Rothschild (beta 37 Trp----Arg) in the T quaternary structure.* Biochemistry: 1993 Jun 29: 32(25): P 6411-8.

113. Winichagoon P: Thonglairoam V: Fucharoen S: Wilairat P: Fukumaki Y: Wasi P. *Severity differences in beta-thalassemia/haemoglobin E syndromes: implication of genetic factors.* Br-J-Haematol: 1993 Apr: 83(4): P 633-9.

114. Wajcman H: Vasseur C: Blouquit Y: Rosa J: Labie D: Najman A: Reman O: Leporrier M: Galacteros F. *Unstable alfa-chain hemoglobin variant with factitious beta-thalassemia biosynthetic ratio: Hb Questembert (alpha 131[H14]Ser----Pro) and Hb Caen (alpha 132[H15]Val----Gly).* Am-J-Hematol: 1993 Apr: 42(4): P 357-74.

115. Ross GA: Lorkin P: Perrett D. *Separation and tryptic digest mapping of normal and variant haemoglobins by capillary electrophoresis.* J-Chromatogr: 1993 Apr 23: 636(1): P 69-79.

116. Bunyaratvej A: Fucharoen S: Tatsumi N. *Biophysical changes of red cells with thalassemia-like abnormal hemoglobin.* Southeast-Asian-J-Trop-Med-Public-Health: 1992: 23 Suppl 2: P 86-90.

117. Sinha P: Galacteros F: Righetti PG: Kohlmeier M: Kottgen E. *Analysis of haemoglobin variants using immovilized pH gradients.* Eur-J-Clin-Chem-Clin-Biochem: 1993 Feb: 31(2): P 91-6.

118. Lin TM; Eng HL; Kuo PL; Wu HL. *Neonatal screening for alpha-thalassemia in southern Taiwan.* J-Formos-Med-Assoc; 1992 Dec; 91(12); P 1213-5.

119. Landin B; Astrom M. *Unstable haemoglobin causing haemolytic anaemia: de novo mutation in Sweden identified by PCR.* J-Intern-Med; 1993 Mar; 233(3); P 299-302.

120. Lorey FW; Cunningham GC; Vichinsky E; Lubin B; Shafer F; Eastman J. *Detection of Hb E/beta-thalassemia versus homozygous EE using high-performance liquid chromatography results from newborns.* Biochem-Med-Metab-Biol; 1993 Feb; 49(1); P 67-73.

121. Fei YJ; Oner R; Bozkurt G; Gu LH; Altay C; Gurgey A; Fatoum S; Baysal E; Huisman TH. *HbH disease caused by a homozygosity EE for the AATAAA----AATAAG mutation in the polyadenylation site of the alpha 2 globin gene: hematological observations.* Acta-Haematol; 1992; 88(2-3); P 82-5.

122. Bick; Bennett; Brynes; Cline; Kass; Murano; Shohet; Ward. *Hematology: clinical and laboratory practice.* Vol. 1. Editorial Mosby; U.S.A.; 1993; P 307-389.