

720408

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA FETAL
EN UN GRUPO DE ENFERMOS CANCEROSOS

T E S I S

Que Para Obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

MARIA ESTHER VENTURA GALICIA

1 9 7 8

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

TESIS 1978
ABE M.C. ~~437~~ 472
FECHA _____
PREC. _____

435



A MIS PADRES.

QUE ME HAN DADO LA VIDA, SU
ORIENTACION Y APOYO EN TODO
MOMENTO.

A MI ESPOSO.

CON TODO MI AMOR.

A MIS HERMANOS:

ANDRES

MARIA

ELENA

EMILIO

SOCORRO

OFELIA

CARMEN

TOMAS

INES

AGRADEZCO SINCERAMENTE:
AL DR. MARIO LIEBERMAN L.,
A LA DRA. ANGELICA SALAS VALDES Y
AL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

POR SU COLABORACION PARA LA REALIZACION
DE ESTA TESIS.

CON CARIÑO Y ADMIRACION PARA LA
PROFESORA DEA CORONADO PERDOMO,

QUIEN CON SU VALIOSA ASESORIA
FUE POSIBLE LA REALIZACION DE
ESTE TRABAJO.

A TODOS MIS MAESTROS, GUIAS
DEL CONOCIMIENTO QUE CONTRI
BUYERON A MI FORMACION INTE
LECTUAL.

I.- Introducción

I N D I C E

CAPITULO I		
	INTRODUCCION	1
CAPITULO II	GENERALIDADES DE HEMOGLOBINA FETAL.	
	EMBRIOLOGIA	4
	ESTRUCTURA	5
	AFINIDAD POR EL OXIGENO	11
	CUADRO NEOPLASICO	12
	ANATOMIA DE LAS NEOPLASIAS	15
	FISIOLOGIA	18
	BIOQUIMICA	20
	INMUNOLOGIA	23
CAPITULO III	MATERIAL Y METODOS	
	RECOLECCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	29
	DETERMINACION DE HEMOGLOBINA FETAL POR EL METODO DE DESNATURALIZACION ALCALINA	30
	ESTANDARIZACION	39
	TECNICA DE ELUCION ACIDA	44
	TECNICA DE RESISTENCIA ACIDA EN LA CAMARA DE NEUBAUER	46
CAPITULO IV	RESULTADOS	57
CAPITULO V	DISCUSION	69
CAPITULO VI	RESUMEN Y CONCLUSIONES	76
CAPITULO VII	BIBLIOGRAFIA	80

J U R A D O

PRESIDENTE	GUADALUPE VELEZ PRATT
VOCAL	DEA CORONADO PERDOMO
SECRETARIO	GUADALUPE LETICIA CARRASCO RIVERA
1er. SUPLENTE	MARIA ELENA BUSTAMANTE CALVILLO
2do. SUPLENTE	ROSA BEATRIZ MARTINEZ GOMEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:	Hospital de Oncología Centro Médico Nacional I. M. S. S.
Sustentante:	María Esther Ventura Galicia
Asesor del tema:	Q.F.B. Dea Coronado Perdomo
Supervisor Técnico:	Dr. Mario Lieberman L.

En adultos normales, la Hemoglobina fetal constituye menos del 2% del total de la masa hemoglobínica y sólo en el estado fisiológico de embarazo existe un incremento de su síntesis.

Por otra parte, las alteraciones causadas corresponden principalmente a enfermedades hematológicas ya sea, por la persistencia en su síntesis durante la vida adulta o bien, por su reaparición en ella. La persistencia se ha encontrado en ciertas hemoglobinopatías congénitas, en el caso de desórdenes hematológicos adquiridos de los cuales se incluyen leucemias crónicas y agudas, anemias aplásica, megalooblástica, mieloma y recientemente se comunicó la existencia de valores superiores al 2% de hemoglobina fetal en adultos con neoplasias malignas.^(1,2)

Las neoplasias son problema grave que abarcan el ámbito de los conocimientos científicos, biológico y médico, que solamente con la unión integrada de la tecnología, teoría y práctica actuales podrá llegarse a la meta definida, que es hacer el diagnóstico temprano de las neoplasias para lograr una sobrevivencia prolongada del ser humano.

Por medio de la "Determinación de hemoglobina fetal en un grupo de enfermos con neoplasias malignas", se pretende contribuir a la detección temprana del Cáncer, teniendo en mente que estos padecimientos puedan ser algún día dominados por la ciencia médica.

Para medir el contenido de hemoglobina fetal se tomó como referencia el método de desnaturalización alcalina (3) de Singer y col. , al cual se hicieron una serie de modificaciones con el fin de optimizarlo. También se empleó el método cualitativo de tinción diferencial para la hemoglobina fetal Kleihauer y col. (4) de elución ácida y se adaptó un nuevo método de "Resistencia ácida" con el propósito de hacerlo cuantitativo.

Las muestras de sangre para la comparación del método fueron proporcionadas por la Clínica Hospital de Gineco-obstetricia I-A del Instituto Mexicano del Seguro Social y pacientes del Hospital de Oncología, así como de personas "clínicamente sanas". Una vez establecida la metodología, se hizo una serie de determinaciones a un número limitado de pacientes con neoplasia, los cuales se procesaron descono-

ciendo la estirpe histológica para que finalmente, al término del estudio se relacionen los resultados obtenidos con el tipo de enfermedad maligna definitiva y en esta forma llegar a establecer si la determinación de la Hb fetal en ellos es de ayuda diagnóstica.

II. Generalidades

HEMOGLOBINA FETAL

Embriología:

En la especie humana se observan cambios en los tipos de hemoglobinas durante el desarrollo embriológico y fetal.

En la etapa embrionaria se sintetizan las hemoglobinas denominadas Gower I y Gower II, las cuales desaparecen después de los tres meses de vida intrauterina y son reemplazadas por hemoglobina fetal (Hb-F), y finalmente después del nacimiento por hemoglobina adulta (Hb-A₁) y hemoglobina A₂ (Hb-A₂). La fetal está constituida por dos cadenas polipeptídicas α y dos cadenas polipeptídicas γ y las adultas por dos cadenas α y dos cadenas β .

Se ha sugerido que la síntesis de un factor en etapas tempranas del embarazo induce la formación de Hb-F y que a partir del segundo trimestre se inicia su producción ⁽⁵⁾, alcanzando un máximo de 70 a 90% del total de hemoglobina al nacer, este valor disminuye gradualmente hasta menos del 2% a los 12 meses ⁽⁶⁾ siendo posible determinar en la mayoría de los sujetos de 1 a 2% a cualquier edad.

Estructura:

La hemoglobina fetal presenta una estructura tetragonal formada por dos cadenas α de 141 aminoácidos y dos cadenas β de 146 aminoácidos. A pesar de que la estructura tridimensional de la Hb-F no ha sido estudiada con detalle se ha pensado sea similar a la de Hb-A₁ observada en la figura 1, en donde cada cadena polipeptídica está unida a un heme en una cavidad de residuos de aminoácidos, dispuestos en un arreglo tetraédrico con un doble eje de simetría sin la cavidad central. El fierro del heme está en el sitio de unión coordinada para reaccionar reversiblemente con el oxígeno.

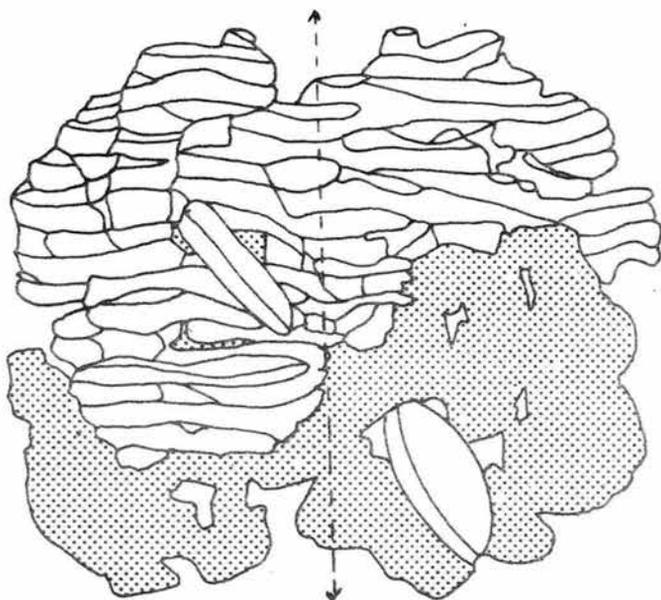


FIGURA 1

Estructura tridimensional de Hb-A₁*

- * Molécula formada de cuatro subunidades: Dos cadenas α idem (bloques claros) y dos cadenas β (bloques punteados), que se enfrentan unas a otras a través de un doble eje de simetría (línea punteada). Cada cadena engloba un grupo hemo (disco) estructura que tiene fierro y liga una molécula de oxígeno. M.P. Perutz, Scientific American (1964).

Las cadenas α son idénticas a las de Hb-A₁ y Hb-A₂ pero las cadenas γ de la Hb-F difieren de las cadenas β en 39 posiciones de aminoácidos como se indica en la Tabla I.

Se presentan nueve substituciones en los residuos internos, incluyendo el cambio de tirosina β 130 por triptofano al cual se le atribuye la aparición de una fina banda a 289.8 nm en el espectro del ultravioleta de la Hb-F⁽⁸⁾.

En la Hb-F, se observan cuatro substituciones que corresponden a la subunidad α_1 , β_1 ; esto puede ser razón para la reducida tendencia de la Hb-F a disociarse en monómeros y es probable que esta sea la causa de la resistencia a la desnaturalización en solución alcalina.^(9,10) Otras substituciones importantes y características de la Hb-F son: la substitución de histidina β 143 por serina, la presencia de cuatro residuos de isoleucina en las cadenas γ ⁽¹¹⁾, la secuencia de aminoácidos N-terminales de las cadenas γ y glicina-valina.

En la separación cromatográfica de sangre de recién nacido se han obtenido dos fracciones un 20% de F_I y 80% de F_{II} ambos componentes son resistentes a la desnaturalización alcalina y difieren solo en un residuo N-terminal acetilado.

La figura 2 muestra en forma esquemática las diferentes substituciones de las cadenas γ en las cadenas β .

TABLA I

Secuencia de aminoácidos de las cadenas β de Hb-F*
 * Residuos diferentes en las cadenas β
 NH₂-Terminal.

VAL	*GLI		TRE		*ILEU		VAL
	HIS		GLN	LEU	*LIS		LEU
LEU	*FEN	40-	ARG		HIS		ALA
	TRE		FEN		LEU	HIS	*ILEU
PRO	*GLU		FEN		ASP		HIS
	GLU	GLU	*ASP	80-ASN	*ASP		FEN
GLU	*ASP		SER		LEU	CB3	GLI
	LIS		FEN		LIS	120-	LIS
SER	*ALA		GLI		GLI		GLU
10-ALA	*TRE	ASP	*ASN		TRE		FEN
VAL	*ILEU		LEU		FEN		TRE
	TRE		SER		ALA		PRO
ALA	*SER	50-TRE	*SER	TRE	*GLN	PRO	*GLU
	LEU	PRO	*ALA		LEU		VAL
	TRP	ASP	*SER		SER		GLN
	GLI		ALA	90-	GLU		ALA
	LIS	VAL	*ILEU		LEU		SER
	VAL		MET		HIS	130-TIR	*TRP
	ASN		GLI		CIS		GLN
20-	VAL		ASN		ASP		LIS
ASP	*GLU		PRO		LIS	VAL	*MET
GLU	*ASP		LIS		LEU		VAL
VAL	*ALA	60-	VAL		HIS	ALA	*TRE
	GLI		LIS		VAL	ALA 6	GLI
	GLI		ALA		ASP		VAL
	GLU		HIS	100-	PRO		ALA
ALA	*TRE		GLI		GLU	ASN	*SER
	LEU		LIS		ASN	140-	ALA
	GLI		LIS		FEN		LEU
30-	ARG		VAL	ARG	*LIS	ALA	*SER
	LEU		LEU		LEU	HIS	*SER
	LEU	ALA	*TRE		LEU	LIS	*ARG
	VAL	70-FEN	*SER		ASN		TIR
	VAL	SER	*LEU		VAL		HIS
	TIR	ASP	*GLI	110-	LEU		
	PRO		ASP		VAL		
	TRP	GLI	*ALA	CIS	*TRE		

COOH-Terminal



FIGURA 2

Substitución de aminoácidos en las cadenas β^* .

* Los puntos negros de las cadenas β indican los cambios que ocurren en las cadenas γ :

Sitios de residuos internos:	Posición 11, 27, 54, 74, 75, 130, 133
Sitios de contacto Heme:	Posición 70, 71.
Sitios de contacto:	Posición 51, 112, 116, 125.
Sitios de unión-DPG:	Posición 1, 143.
Sitios de isoleucina:	Posición 11, 55, 75, 116.

Debido a la estructura de la Hb-F se le han atribuído una serie de propiedades diferentes a las de Hb-A. Ambas pueden desnaturalizarse a compuestos de hematina por la reacción de álcalis o ácidos, pero la hemoglobina A se degrada más rápidamente que la fetal, el alto contenido de triptofano en la Hb-F produce un espectro en el ultravioleta diferente al de Hb-A. La Hb-A y Hb-F pueden diferenciarse inmunológicamente⁽¹²⁾, difieren también en la forma de sus cristales y solubilidad. El pigmento fetal toma más tiempo para formar monocapas.

A nivel celular el cambio de Hb-F a Hb-A se acompaña de cambios en la actividad de algunas de las enzimas y de otros componentes. Las células neonatales tienen más potasio y agua⁽¹³⁾ así como, un alto contenido de lípidos, la proporción de los componentes lipídicos es similar al de las células adultas, solamente varían en una pequeña proporción en las fracciones fosfolipídicas y de ácidos fosfatídicos, hay bajo nivel de anhidrasa carbónica, catalasa y peroxidasa. (14, 15).

Las células de cordón umbilical tienen una isoenzima

(16)

hexocinasa diferente a las células adultas .

En la sangre humana adulta se han separado por electroforesis tres tipos de hexocinasa: I, II y III. Los eritrocitos adultos tienen tipos I y III, el II está solamente en células embrionarias; cabe mencionar que el comportamiento tiene particular importancia pues se ha encontrado en individuos con persistencia hereditaria a la hemoglobina fetal (HPFH), por lo que se piensa tiene cierta relación. En fin la hemoglobina fetal humana difiere en varios aspectos de la hemoglobina que circula en la sangre del adulto y es posible distinguirla de una mezcla al menos por alguno de los métodos siguientes: Resistencia a la desnaturalización alcalina; electroforesis; cromatografía de intercambio iónico; elución ácida; espectro de absorción a la luz ultravioleta o inmunología.

Afinidad por el oxígeno:

Los cambios físicos y químicos de la Hb-F contribuyen para que la afinidad por el oxígeno de suspensiones celulares que la contengan, sea mayor que la de Hb-A. Pero

hay evidencias de que, en soluciones purificadas de Hb-A y Hb-F, la afinidad por el oxígeno es semejante para ambas hemoglobinas. (17) La causa del diferente comportamiento se debe a la presencia de polifosfatos orgánicos en la composición intracelular. El 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) constituye más del 70% de polifosfatos orgánicos en los eritrocitos y sirve de regulador de oxígeno liberado a los tejidos, o sea, que cuando el 2,3-DPG se une a la hemoglobina, se libera oxígeno hacia los tejidos.

La Hb-F tiene poca afinidad por el 2,3-DPG y, por consiguiente, mayor afinidad por el oxígeno, mientras que en la Hb-A sucede lo contrario. Esto hace que la elevada afinidad por el oxígeno de la Hb-F facilite eficientemente la oxigenación a los tejidos fetales a través de la placenta siendo ésta una de las funciones más importantes de la sangre fetal.

Cuadro Neoplásico:

En las células aisladas se llevan a cabo numerosas funciones integradas para que estas logren sobrevivir; en térmi-

nos generales la reproducción y el metabolismo se realizan gracias a complejos mecanismos enzimáticos capaces de proporcionar la energía necesaria para sus funciones vitales. De esta forma es capaz de reproducirse y a medida que la célula se reproduce se asocia para formar grupos de mayor número capaces de realizar funciones más complejas y específicas.

La reproducción tiene sus límites y está regulada por ciertas leyes generales que la rigen, de tal forma que la capacidad de multiplicación celular se mantiene constante al balance de los organismos como un todo.

Como un intento de interpretar la naturaleza de un cuadro neoplásico desde el punto de vista biológico se define: "Cuando la capacidad de reproducción de una célula o un grupo de células viola en exceso e irreversiblemente las leyes generales de organización del individuo se produce una neoplasia".
(18)

Existen otras definiciones acerca de las neoplasias, pero se tienen ciertas dificultades para proporcionar una

definición precisa que abarque todos los tumores. Entre estas dificultades se tiene que el comportamiento de los tumores es variable, anárquico y difícil de predecir sistemáticamente, aún se ignora la naturaleza íntima de la alteración biológica que les da origen. Una definición descriptiva de las características generales de las neoplasia es la postulada por Willis: "Un tumor es una masa anormal de tejidos, cuyo crecimiento excede y no se coordina con el de los tejidos normales, y que persiste de la misma manera excesiva después de que cesa el estímulo que la ha producido" (19). Entendiéndose como tejido normal aquel que está regido por ciertas leyes para tener un crecimiento coordinado.

Las neoplasias pueden observarse desde tres puntos de vista diferentes:

a) Como un fenómeno biológico que produce un desequilibrio en la vida normal del organismo multicelular, esto ofrece un conocimiento de los mecanismos internos de reproducción celular.

b) Como un grupo de lesiones clínico-patológicas de enfermedades que ocurren en el hombre y que requieren

atención efectiva e inmediata.

c) Y en los casos malignos, como una tragedia de trascendencia, no solo para el individuo, sino para la sociedad.

En la manifestación de un tejido tumoral se observa un conjunto de características comunes que las separa e individualiza de los tejidos no tumorales, dichas propiedades imprimen un sello en la anatomía, fisiología, bioquímica e inmunología de los tejidos neoplásicos y en el caso de tumores malignos, la invasión y metástasis es también característico.

Anatomía:

La anatomía de los tumores se ha estudiado en base a las características macroscópicas y microscópicas.

La observación macroscópica la hace el médico al estudiar directamente el tumor determinará los sitios de exploración propedéuticas y/o radiológicas y si es necesaria la intervención quirúrgica. Las formas de manifestación de

los tumores que se han observado son:

a) Como una masa o "bola" que en el sentido amplio de la palabra pertenece a lo que se define como "tumor" y corresponde en general a los tumores benignos.

b) Como una úlcera o pérdida de substancia.

c) Como una masa ulcerada.

A estos dos últimos corresponden los tumores malignos.

En virtud de que las neoplasias son casi siempre lesiones localizadas es posible encontrar una serie de características tales como: El tamaño que va desde el microscópico hasta el monstruoso; la forma de la neoplasia depende del tipo de crecimiento, cuando es extrínseco hay una invasión del tejido hacia el exterior que comprime los tejidos vecinos, tiende a ser esférico o bien infiltrativo, se manifiesta como una zona endurecida de límites indiferenciados, que cuando crece rápidamente se necrosa y ulcera apareciendo como una pérdida de substancia de bordes endurecidos.

La superficie depende del tipo de crecimiento y pue-

de ser lisa, finamente granular o umbilicada.

El color es muy variable y algunas veces característico de una variedad de los tumores. Así, se ha observado color café oscuro en los melanomas, verde en carcinoma primario de hígado, amarillo en carcinoma primario de riñón. En otros casos debido a las hemorragias o a necrosis aparecen áreas limitadas de color diferente, los primeros son de color rojo al principio después con tiempo por el metabolismo de la hemoglobina toman color café amarillento o verdoso.

Dentro de las observaciones microscópicas el parénquima y el estroma son términos importantes; el primero está formado por células neoplásicas de origen histológico indiferenciado. El estroma constituye el tejido conjuntivo que proporciona apoyo y nutrición a las neoplasias. Cuando un tejido se manifiesta a distancia las células parenquimatosas proliferan, y al llegar al nuevo sitio de crecimiento utilizan el tejido conjuntivo como estroma, ya sea que se desarrolle el tumor o no.

Se ha encontrado que la estructura morfológica de

las células neoplásicas puede ser idéntica a las células normales e inclusive reproducir una imagen del tejido normal que le ha dado origen, en tal caso se conoce como tejido "bien diferenciado", mientras que cuando se aparta totalmente de la estructura del tejido de origen se conoce como "poco diferenciado" o "indiferenciado".

En general, las células neoplásicas pueden causar metaplasia, tumores mixtos o anaplasia y se han tratado de encontrar por medio del microscopio electrónico las diferencias entre células neoplásicas y normales, pero aún no se han erigido las características específicas que definan un grado de malignidad, se han encontrado abundantes mitocondrias, formas anormales y superficie irregular en las células neoplásicas, lo que no es definitivo.

Fisiología:

La mayoría de las células tumorales conservan parte de las funciones del tejido que les da origen después de la transformación maligna, y los síntomas que producen los tumores dependen principalmente de la localización en el orga-

nismo, la función endócrina y los fenómenos degenerativos que ocurren en ellos. Dichas condiciones se observan en la mayoría de los tumores benignos y explican el cuadro clínico de los enfermos. En algunos adenomas y carcinomas del tiroides hay elevada producción de hormona tiroidea, lo que produce hipertiroidismo; los adenomas del paratiroides producen cuadros clínicos de hiperparatiroidismo; en carcinoma de riñón y aún los fibroleiomiomas causan algunas veces policitemias; los carcinomas de corteza suprarrenal pueden dar lugar a síndrome de Cushing. En las funciones endócrinas es poco frecuente que se observen cuadros degenerativos.

Respecto a la localización en el organismo por ejemplo los craneofaringeomas, tumor cercano a la hipófisis causa trastornos visuales por compresión del quiasma óptico, desarrollo somático retardado, diabetes insípida y somnolencia progresiva por su efecto mecánico en el hipotálamo. En el caso de los tumores malignos se presentan las tres condiciones mencionadas acompañadas de pérdida de peso, en algunos casos fiebre, caquexia, hemorragia, ulceraciones, insomnio y ansiedad ⁽¹⁸⁾. Muchos enfermos con tumores malignos estando hospitalizados presentan anemia, aún sin rechazar su ali-

mento.

Bioquímica:

La contribución que ha tenido el trasplante de tumores producidos por la inducción de diferentes agentes carcinogénicos ha sido favorable para el estudio de la química de las neoplasias. En el análisis de fragmentos tumorales, la composición de aminoácidos, la fracción soluble de las proteínas y las potencialidades enzimáticas son muy semejantes entre sí y diferentes al tipo de tejido normal que les da origen. Aún no se ha encontrado diferencias características en los ácidos nucleicos. Pero, cabe mencionar que en experimentos realizados en Hepatoma de Novikoff, comparados con hígado normal de rata se han encontrado diferencias cualitativas y cuantitativas de ácido ribonucleico (mRNA)⁽²⁰⁾, esto podría ser un factor importante de estudio pues de esto dependería la caracterización de proteínas normales y neoplásicas.

En la regulación del ciclo celular normal se han logrado integrar diferentes fases denominadas: G_1 , S, G_2 , M y D.

La fase G_1 es un período de interfase donde hay movilización de enzimas y substratos requeridos para la síntesis de ácido desoxirribonucléico (DNA) cromosomal, denominada fase S. La fase G_2 es un período entre el final de síntesis cromosomal de DNA y el inicio de la mitosis llamada fase M, en la cual hay una distribución precisa del material genético.

En una división celular, típicamente el resultado final de la mitosis son dos células hijas representado por la fase D del ciclo celular. La siguiente división, las células hijas ingresan nuevamente a la interfase donde el ciclo celular puede detenerse hasta que un estímulo apropiado repita el ciclo.

La capacidad que tienen las células para regular la secuencia de eventos que culminan en la división de una célula en dos, es aparente. Se ha sugerido que una célula que no se divide es porque se bloquea alguna fase del ciclo. Esto implica que en cualquier división celular permanente, tales como las encontradas en los tumores, ocurren bloqueos que son trasladados y ésto hace que la célula sea capaz de divi-

dirse continuamente en otras diferentes según convenga al medio. En la fase G_1 del ciclo celular normal ocurren comúnmente dichos bloqueos o inhibiciones y todas las fases parecen depender de la ausencia de alguna sustancia esencial o bien, por la adición de alguna sustancia específica. Así, se han separado sustancias específicas de la división celular obtenidas de granulocitos, hígado, bazo y células epidermales de rata. Estas sustancias inhibidoras difieren de una a otra y se conocen con el nombre de chalonas.⁽²¹⁾

La chalona de hígado es un polipéptido de bajo peso molecular (146); mientras que la chalona epidermal es una glicoproteína de alto peso molecular (36,000). Además tiene efectos antimitóticos en tejidos específicos y son ideales para el uso en la supresión del desarrollo de estos tumores.

También se han registrado cambios en la vía metabólica de las células neoplásicas observándose una glicólisis con producción de ácido láctico⁽²¹⁾, mientras que en la respiración comparable con células normales, es de tipo convencional.

Otras diferencias se han encontrado en ciertas leucemias y linfosarcomas, células que requieren de agentes exógenos para su desarrollo como L-asparagina y se ha pensado que tal vez el proceso de transformación de célula normal a célula cancerosa sea asparagino dependiente. (21)

En estudios más recientes se han demostrado la deficiencia de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) (22) en ratones con hepatoma de Novikoff y que la actividad de dicha enzima disminuye o se nulifican al inducir transformación a ratones normales con 4-dimetilazobenceno (DAB).

Inmunología:

Una diferencia importante encontrada entre células cancerosas y normales es la presencia de un nuevo antígeno (Ag) de superficie, el cual al reaccionar frente a una célula normal, o el sistema inmune de un animal son reconocidos como respuesta a una sustancia extraña, como es el caso de algunas proteínas extrañas específicas de respuesta inmune al huésped; hay nuevas evidencias que sugieren que

esta respuesta inmune representa los mecanismos de defensa efectivos que mantienen muchos cánceres en latencia y algunos cánceres avanzados de regresión espontánea se han atribuido a ellos. La importancia de la respuesta inmune en control, del cáncer es evidente porque, los individuos con enfermedades inmunodeficientes tienen un riesgo elevado de desarrollar cáncer. Estos factores se han atribuido a las deficiencias en el mecanismo inmunológico en individuos afectados de estos desórdenes.

La función del sistema de defensa inmune se realiza por tres tipos de células sanguíneas: La célula plasmática la cual produce anticuerpos (Ac) específicos y por otra parte proteínas extrañas. Estos Ac. circulan libremente en el torrente sanguíneo u otros cuerpo fluidos. Las células mediadoras de la respuesta inmune son los linfocitos T y en menor grado los macrófagos. Los linfocitos T son capaces de dar una sensibilidad a un Ag y una vez sensibilizado son capaces de reconocer que el Ag transfiere la información a otro linfocito todavía desconocido, por éste camino es posible originar una respuesta inmune de escala prolongada cuando

se requiera. En el caso de células mediadoras de respuesta inmune el sistema de reconocimiento permanece en los linfocitos y estas células acarrearán el ataque a la célula tumoral, donde puede causar la destrucción de éstos o ser rechazados por el huésped.

Los linfocitos sensibilizados constituyen la defensa inmunológica de células cancerosas. Los macrófagos reconocen la célula cancerosa y otras sustancias extrañas esto se conoce como factor de reconocimiento y se ha visto es una alfa globulina que puede presentarse en suero. Se cree que el complejo del factor de reconocimiento con la célula tumoral es la primera etapa requerida para la destrucción de estas células por el macrófago. La falta de reconocimientos del sistema podría de otro modo, permitir a la célula cancerosa ser irreconocible por los macrófagos y así escapar a la destrucción por otras células y de esta forma las células cancerosas serían antígenos o anticuerpos extraños que no son destruidos completamente por la respuesta inmune del huésped. Así hay un número de factores que suprimen la respuesta inmune normal favoreciendo o no el desarrollo del tumor, en otros casos la toleran-

cia inmunológica tiene particular importancia en ciertos tumores humanos producidos por transmisiones directas virales. Otras consideraciones es que pueden presentarse factores bloqueadores en suero que protegen la célula cancerosa de linfocitos, son los llamados Ac. facilitadores de Hellstrom. Los linfocitos tímicos mediadores de la respuesta inmune contra el tumor pueden ser destruidos o anulados por estos factores bloqueadores. Sin embargo, otros estudios sugieren que el factor bloqueador es un Ac. específico, más recientemente se ha sugerido que este factor es un antígeno del tumor o un complejo Ag-Ac se une a la célula tumoral por el anticuerpo movilizado⁽²¹⁾ y así previene el reconocimiento de la célula tumora por el linfocito tímico.

Otro problema que incumbe a la inmunología es la inmunoselección. Como en cualquier división celular, cuando el tumor desarrolla, las células que forman este nuevo crecimiento pueden ser más antigénicas que otras. Unas con menor antigenicidad que podrían sobrevivir, y en cada proceso de selección podría explicarse la pobre antigenicidad observada por muchos cánceres avanzados. A pesar de estas dificultades la

inmunología tumoral ofrece promesas para el control del cáncer, como son:

a) Modificar la superficie de células cancerosas para así aumentar su inmunogenicidad.

b) Incrementar la respuesta inmune del huésped con el uso de inmunoadyuvantes, los más comúnmente empleados son de tipo inespecífico como bacterias o productos de bacterias por ejemplo el BCG el cual es un atenuante para el bacillus tuberculosis, usado clínicamente para varios tipos de tumor.

Además del antígeno de superficie se han encontrado en células cancerosas los llamados antígenos fetales los cuales pueden presentarse en la sangre de pacientes que presentan un particular tipo de cáncer.

El primero de estos antígenos fetales es el antígeno carcinoembrionario, encontrado frecuentemente en cáncer de colon, recto, páncreas y otros órganos. Sin embargo, este antígeno se encuentra algunas veces en ausencia de tumores particularmente en procesos inflamatorios.

Un segundo antígeno fetal es la llamada alfa feto pro-

teína observada en pacientes con hepatomas; mientras un tercer antígeno fetal es una proteína gástrica fetal encontrada en el jugo gástrico en un 96% de pacientes con carcinoma gástrico y en un 14% de pacientes con úlcera péptica. Estos tres antígenos fetales se encontraron en tejido fetal o embrionario, pero no en tejido adulto normal; esto sugiere que la información genética codificada para estos antígenos es funcional en el desarrollo embrionario, pero permanecen en latencia durante estados de tolerancia de desarrollo y son nuevamente expresados durante la carcinogénesis.

III.- Material y Métodos.

El material biológico estuvo constituido por 199 sangres heparinizadas obtenidas en estado basal o no procesadas en el transcurso de las siguientes 24 horas, éstas se clasificaron por grupos:

A.- 22 fueron de cordón umbilical obtenidas en las salas de partos en el momento del nacimiento.

B.- 22 fueron de las correspondientes sangres venosas maternas obtenidas 15 minutos después de haber expulsado la placenta.

C.- 25 constituyeron la población clínicamente sana, con los que se establecieron los valores de referencia de nuestro medio.

D.- 130 (96 mujeres y 34 varones) enfermos cancerosos.

Nota.- Las condiciones para el grupo C y D fueron las siguientes:

1.- Personas de ambos sexos, cuya edad osciló entre 25 a 60 años, sin transfusión durante los últimos 6 meses previos al estudio.

2.- Se excluyeron los que mostraron antecedentes familiares de hemoglobinopatías y mujeres embarazadas.

3.- En el grupo D se comprobó histopatológicamente la existencia de una neoplasia, se seleccionaron los pacientes sin tratamiento durante la evolución de su enfermedad. No se tomó en consideración el tiempo de evolución del padecimiento, el estadio clínico, ni la estirpe histológica.

En todos los grupos se corrieron espectros de absorción y se determinó la Hb-T y Hb-F por los métodos de:

- 1) Desnaturalización Alcalina (Singer y col.³)
- 2) Elución Ácida (Kleihauer y col.⁴)
- 3) Resistencia ácida de la Hb-F

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA FETAL POR EL METODO DE DESNATURALIZACION ALCALINA.

FUNDAMENTO:

La propiedad que tiene la Hb-F de ser más resistente

que otras hemoglobinas a la acción de agentes alcalinos en un período de tiempo exacto, se aprovecha para su determinación.

La hemoglobina fetal no se desnaturaliza por la acción de un reactivo alcalino en un tiempo exacto; así, la hemoglobina desnaturalizada se precipita simultáneamente por la adición de una solución que baja el pH y se elimina por filtración.

La hemoglobina inalterada se cuantifica espectrofotométricamente a 540 nm. expresando el porcentaje de la cantidad de hemoglobina inicial.

APARATOS:

Centrífuga Sorval

Densitómetro Gilford 240

REACTIVOS:

1.- Solución desnaturalizante

KOH N/12 ó NaOH N/12 (pH 12.7) Modif. 0.1 N
(pH 13.4)

Conservarla en refrigeración en frasco sellado con parafilm.

2.- Solución precipitante:

800 ml. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% de saturación más
2 ml. de HCl 10⁴ N.

3.- Tolueno Q.P.

4.- Solución Salina 0.85% de NaCl

5.- Agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

Parte I

- 1.- Se toma 1.0 ml. de sangre venosa, se coloca en un tubo de centrifuga y se lleva a un volumen de 10 ml. con solución salina.
- 2.- Se centrifuga a 2,000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 3.- Se descarta el sobrenadante.
- 4.- A las células lavadas se agrega 15ml. de agua destilada y 4.0 ml. de Tolueno Q.P.
- 5.- Se agitan los tubos manualmente durante 5 minutos.
- 6.- Se centrifuga la mezcla a 3,000 r.p.m. durante 20 minutos.

- 7.- Se descartan las dos capas superiores y la solución roja clara se filtra y se diluye 1:10 con agua destilada.
- 8.- Se determina la Hb-T a 540 nm. y se lee contra un blanco de reactivos en el espectrofotómetro.

Parte II

- 9.- Se colocan 0.2 ml. de NaOH 0.1 N en un tubo serológico.
- 10.- Se incuba a 20°C en baño maría durante 2 minutos.
- 11.- Se retira del baño y se agrega 0.2 ml. de Hb del paso número 7.
- 12.- Se agita manualmente cada tubo durante 10 segundos.
- 13.- Después de 1.0 minuto exacto de que se introdujo la Hb en la solución desnaturalizante se agrega 6.8 ml. de solución precipitante.
- 14.- Se invierte 6 veces cada tubo y la mezcla se filtra inmediatamente a través de una doble capa de papel filtro. Se lee a 540 nm. contra un blanco de reactivos.

Con el objeto de optimizar el método se hicieron las siguientes variantes a la Técnica original de Singer. (3)

1.- Estudio de la solución de lavado.

a) Se mezcló la sangre con la solución salina, se centrifugó a 2,000 r.p.m. por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se trabajó sobre el paquete de glóbulos rojos.

b) Se mezcló manualmente la solución salina con la sangre durante 5 minutos, no hubo separación y se trabajó con la solución rojiza.

NOTA.- Se utilizó sangre materna, leída contra cada uno de los reactivos, a 540 nm.

D. O. = Absorbancia

Hb-T	D. O. sin/solución salina	D. O. con/solución salina
Agua dest.	0.430	0.320
Tolueno	0.400	0.320
Solución salina	0.400	0.320
Tol. y sol.salina	0.400	Inestable
Tol. sol. salina y agua	0.400	0.280

2.- Estudio del tiempo de incubación con la solución desnaturalizante.

Se estudió el tiempo de incubación ya que en la Técnica original no está especificado: a los 2, 4, 6, 10, 15, 20 y 30 minutos, se decidió dejar el de 2 minutos ya que entre mayor tiempo de incubación de la solución desnaturalizante eran más despreciativas las lecturas.

NOTA: Se utilizó sangre materna y de cordón umbilical.

Hb-T	D. O.
Madre	0.810
Cordón	0.950

	Hb-F	D. O.
Tiempo/ min.	Madre	Cordón umbilical
2.0	0.039	0.130
4.0	0.058	0.110
6.0	0.043	0.100
10.0	0.040	0.090
20.0	0.041	0.100
30.0	0.040	0.070

3.- Estudio de la concentración de la solución desnaturalizante.

Se estudió el efecto de la concentración de la solución desnaturalizante, utilizando diferentes ml. de NaOH 0.1 N y NaOH N/12. Se decidió continuar trabajando con NaOH 0.1 N porque se encontró que eran más estables las lecturas.

NOTA: Se utilizó sangre materna.

Hb-T	D.O.
Madre	0.720

ml. NaOH	Hb - F	D.O. 0.1 N
	D.O. N/12	
0.05	0.040	0.040
0.10	0.020	0.025
0.60	0.013	0.050
1.60	0.015	0.080
3.20	0.010	0.100

4.- Estudio de la estabilidad de la muestra para Hb-T
dejada por días a 4°C.

NOTA: Se utilizó sangre:

Materna

Cordón umbilical

Neoplásica

"Normal"

Hb - T

Días transcurridos:	D.O.			
	1o.	2o.	3o.	4o.
Madre	0.810	0.755	0.750	0.730
Cordón	0.950	0.928	0.920	0.920
Neoplásica	0.760	0.700	0.720	0.680
"Normal"	0.765	0.750	0.710	0.660

Hb - F

1o.

Madre	0.081
Cordón	0.131
Neoplásica	0.168
"Normal"	0.010

Curva de Calibración con Acuglobin para Hb-T.

Se utilizó un Patrón con 60.2 mg. de hemoglobina como Cianometahemoglobina por 100 ml. (0.0602 g.%).

Se determinó la D.O. del contenido de 5 ml. de Patrón sin diluir y de una solución diluída 1:1 con Diluyente Aculte a 540 nm., como se observa en la Gráfica número 1.

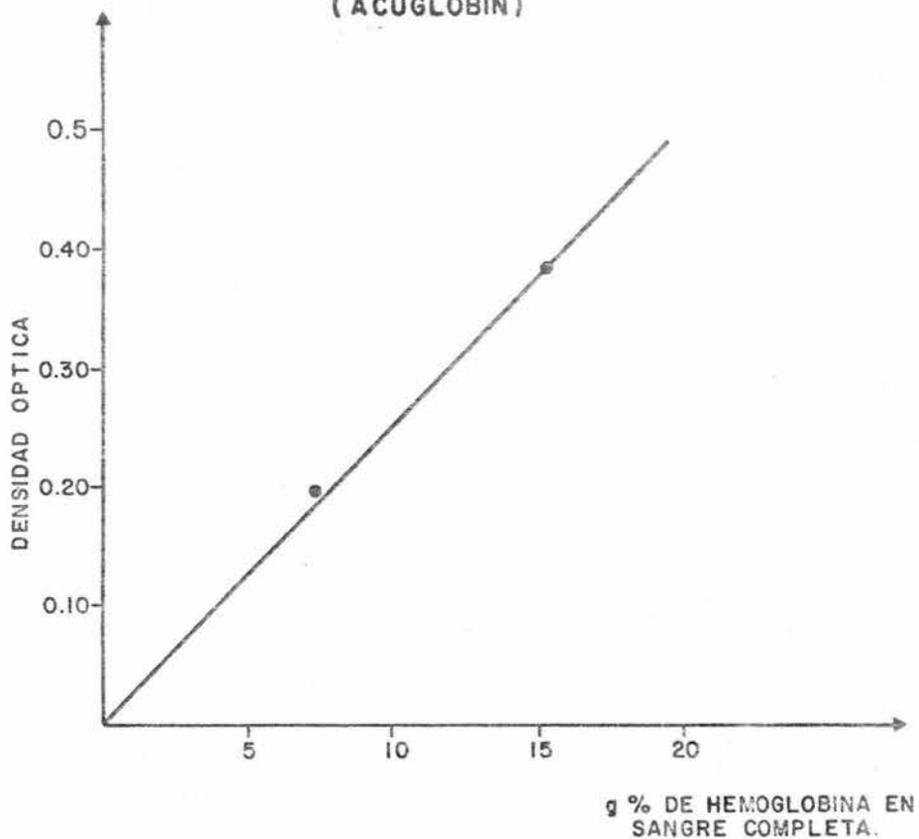
Factor de Dilución.- Se obtuvo al relacionar el valor hemoglobinico del Patrón en g% de hemoglobina en sangre completa del paciente; 0.02 ml. de sangre completa y 5 ml. de diluyente, Dilución 1:251.

Los valores de Patrón en g% sin diluir y diluído se multiplicaron por el factor de dilución.

g% del Patrón		x	Factor	
Sin diluir	0.602	x	251	= 15.11
Diluído	0.301	x	251	= 7.55

Patrón	D.O.	g% de hemoglobina
Sin diluir	0.380	15.11
Diluído	0.195	7.55

**CURVA ESTANDAR
(ACUGLOBIN)**



GRAFICA.-I

Estandarización de la Técnica de Singer.

Se consideró que en el recién nacido la Hb-F constituye del 70 al 90% del total de la masa hemoglobínica⁶ y que en la sangre materna postpartum también se eleva dicha hemoglobina. Por tal razón se tomaron como parámetros estas hemoglobinas para estandarizar la(s) técnica(s) empleada(s), así como en la sangre neoplásica y "normal".

Espectro de Absorción:

Se determinó para la Hb-T y Hb-F de cada una de las muestras antes mencionadas corridas contra un blanco de reactivos. (Figura número 3)

Precisión:

Se determinó por la reproducibilidad en 10 muestras con D.O. de Hb-T conocidas. (Tabla número 2)

Recuperación:

Se determinó la Hb-F en cada una de las muestras por separado ("normal", madre y cordón umbilical).

a) 1.0 ml. de cada muestra se mezcló con otra, y de ahí se tomó 1.0 ml., se determinó Hb-T y Hb-F.

b) De los filtrados de Hb-T ya leídos se tomó 1.0 ml. de cada uno, se mezclaron, de ahí se tomó 1.0 ml. y se determinó Hb-F. (Tabla número 3)

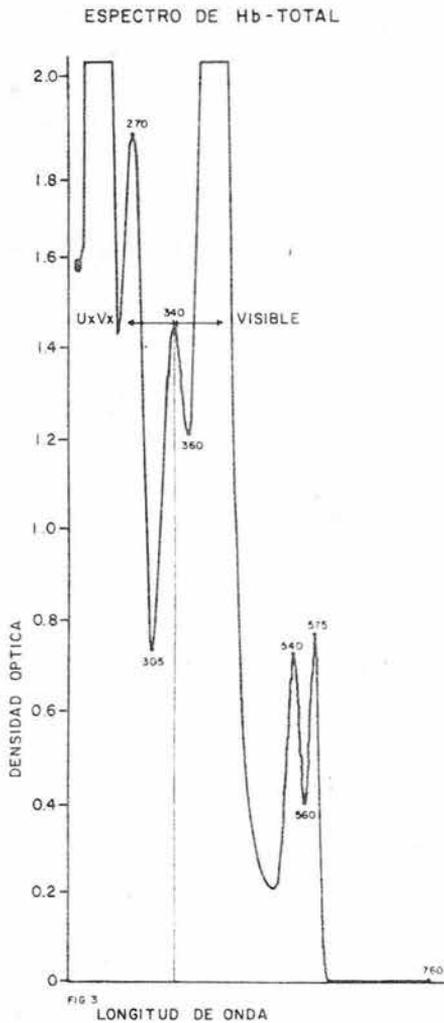


FIGURA 3.- Espectros de absorción para Hb-Fetal y Hemoglobina total de sangre de cordón umbilical.

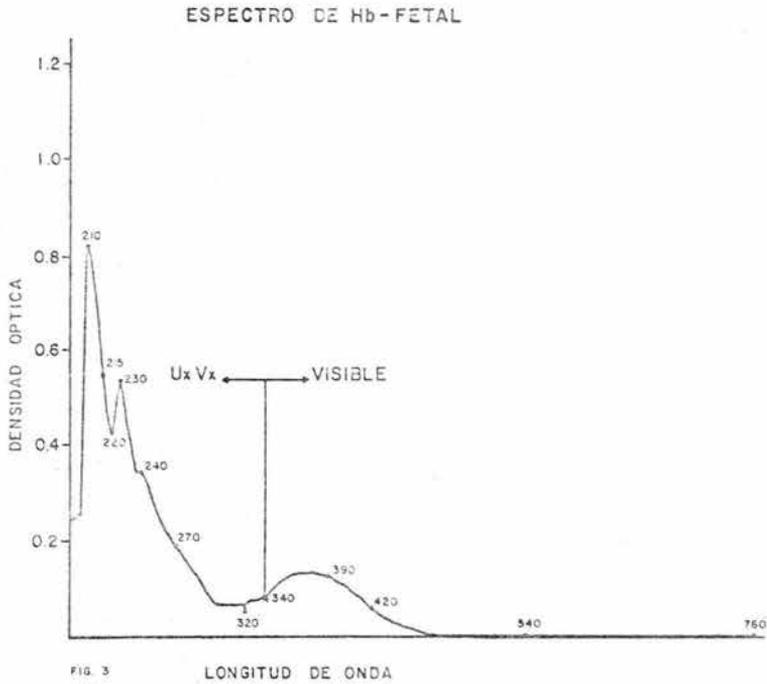


FIGURA 3.- Espectros de absorción para Hb-Fetal y Hemoglobina total de sangre de cordón umbilical.

TABLA NUMERO 2

R E P R O D U C I B I L I D A D

	Hb - T		D.O.			
Madre (M)					0.810	
Cordón umbilical (C)					0.950	
Neoplasia (N)					0.760	
	Hb - F		D.O.			
Número de Tubo	D.O. (M)	%	D.O. (C)	%	D.O. (N)	%
1.	0.090	11.11	0.135	14.21	0.108	14.21
2.	0.081	10.0	0.135	14.21	0.115	15.13
3.	0.088	10.86	0.133	14.0	0.108	14.21
4.	0.090	11.11	0.131	13.7	0.110	14.47
5.	0.086	10.61	0.133	14.0	0.110	14.47
6.	0.090	11.11	0.133	14.0	0.111	14.60
7.	0.090	11.11	0.133	14.0	0.110	14.47
8.	0.090	11.11	0.133	14.0	0.105	13.81
9.	0.088	10.86	0.131	13.70	0.115	15.13
10.	0.086	10.61	0.135	14.21	0.106	13.94
Media (X)	0.087	10.726	0.131	14.0	0.110	14.45
Desviación st. S.	0.004	0.383	0.101	0.016	0.003	0.438
Error %	5		8		3	

TABLA NUMERO 3

R E C U P E R A C I O N

Individual	Hb-T D.O. Exp.	D.O. Hb-T Teórico	% Hb-T Recuper.	Hb-F D. O.
Madre (M)	0.705	0.810	87	0.155
Cordón Umbilical (C)	0.908	0.950	95	0.171
"Normal" ("N")	0.767	0.760	100	0.172
Mezclas:				
"N" y (C)	0.907	0.838	108	0.193
"N" y (M)	0.765	0.736	103	0.162
(M) y (C)	0.800	0.821	99	0.153
"N", (M) y (C)	0.815	0.793	102	0.149
Filtrados:				
"N" y (C)	0.835	0.830	100	0.175
"N" y (M)	0.800	0.763	104	0.188
(M) y (C)	0.813	0.810	100	0.167
"N", (M) y (C)	0.800	0.793	100	0.182

$$\bar{x} = 99.81$$

TECNICA DE ELUCION ACIDAREACTIVOS

1. Metanol puro
2. Solución de ácido cítrico M/6
3. Solución de KH_2PO_4 M/6
4. Solución de Eosina 1%
5. Agua destilada
6. Amortiguador pH 3.9, mezclar:
4 partes de ácido cítrico M/6
5 partes de KH_2PO_4 M/6

PROCEDIMIENTO

Secar frotis al aire.

Fijación por 3 minutos en metanol.

Secar rápidamente con aire frío.

Sumergir en el amortiguador por 2 minutos.

Lavar con agua destilada por 5 segundos.

Sacudir el frotis.

Ponerlo en solución de eosina por 1 minuto.

Lavar con agua destilada por 5 segundos.

Secar con aire.

Observar al microscopio.

Para las lecturas se observó todo el frotis con el objetivo de 10X y en el campo donde hay espacio entre los eritrocitos fantasmas y los que tienen una mayor coloración, se hizo la cuenta, o sea, los primeros eritrocitos son de Hb-T y los segundos de Hb-F que resistieron al medio ácido. Para contarlos se hizo por cuadrantes siguiendo siempre el mismo orden y la dirección de las manecillas del reloj. Expresado el porciento referido a un total inicial de 1000. (Figura número 4)

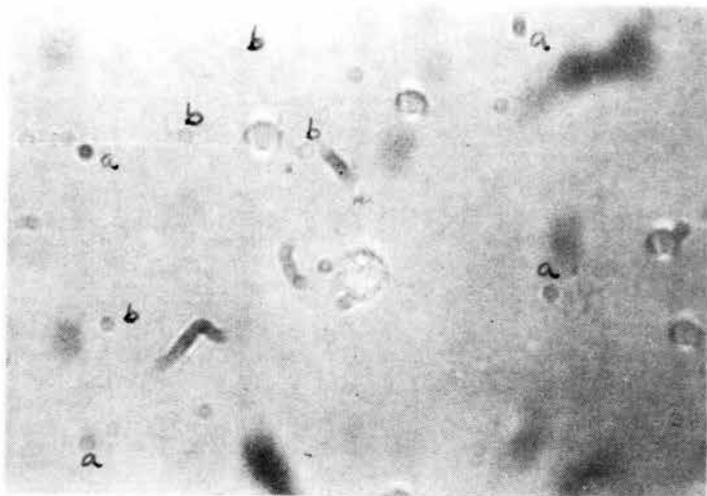


FIGURA 4.- Preparación con la técnica de elución ácida, se observan dos tipos de eritrocitos: a) con elevadas cantidades de Hb-F, b) con bajas cantidades.

CAMARA DE NEUBAUER

Se utilizó la Cámara de Neubauer para la cuenta de glóbulos rojos (GR) con el objeto de correlacionar las lecturas obtenidas en ésta, y la Técnica de Elución Ácida; para ésto se emplearon los mismos reactivos que en la elución ácida y se estudió:

1.- El pH óptimo de los eritrocitos hasta el cual permanecieron estables a la destrucción.

2.- La cantidad de gotas de eosina para colorear los eritrocitos.

3.- El tiempo a partir del cual ya no hubo destrucción de eritrocitos.

1.- Para el estudio del pH óptimo de los eritrocitos en el cual hubo resistencia al medio ácido, se emplearon tres soluciones de NaOH de diferente pH:

	pH	Solución
NaOH	13.2	(a)
NaOH	12.5	(b)
NaOH	11.3	(c)

ml. de Agua destilada	NaOH, gotas	Eosina gotas (gt)	pH	Observaciones
10	2 (a)	2	13.2	Desaparecen
10	2 (b)	2	12.5	Desaparecen
10	2 (c)	2	11.3	Desaparecen

A la solución se le fue agregando:

5		2	10.1	Desaparecen
8		2	9.4	Desaparecen
10		2	8.5	2 fantasmas y pigmentos
10		2	7.3	Pigmentos
20		2	6.5	Eritrocitos deformes
10	2 (a)	2	5.5	Más coloreados

Se agregó 0.5 ml. de amortiguador pH 3.9 - 5.0	4	Eritrocitos completos
4.5 ml.	2	35 Eritrocitos bien coloreados

<u>Se agregó 5.0 ml.</u>	<u>6</u>	<u>4.0</u>	<u>Eritrocitos</u> <u>regulares total 68</u>
--------------------------	----------	------------	---

ml. de Agua destilada	NaOH gotas	Eosina gotas (gt)	pH	Observaciones
Se baja el pH con ácido acético, 0.5 ml.				
10 ml. agua, tiguador	5 ml. amor	6	3.5	Precipita el colorante y desaparecen los eritrocitos.

A pH 2.5 y 2.0 desaparecen los eritrocitos y poco a poco precipita el colorante. Por lo que hasta aquí el pH adecuado fue de 4.0.

2.- Se buscó la cantidad en ml. de amortiguador y gotas de colorante en que no había formación de precipitado.

Se colocaron 2.0 ml. de solución amortiguadora pH 3.9 en 10 vasos de precipitado y se adicionaron de 1 a 10 gotas en cada uno, colorante de Eosina al 1%. Se hizo lo mismo en otros 10 vasos de precipitado con 2.0 ml. de solución salina.

En todos los casos se tomó sangre con la Pipeta Clay-Adams hasta la marca de 0.5 y se aforó con cada una de las soluciones anteriores.

Eosina Gotas	Amorti guador	Formación de precipitado en vaso	Eritrocitos en la cámara
1	2	poco (+)	mal coloridos (-)
2	2	+	-
3	2	++	-
4	2	++	-
5	2	+++	+
6	2	++++	+++
7	2	++++	++++
8	2	++++	++++
9	2	++++	++++
<u>10</u>	<u>2</u>	<u>++++</u>	<u>++++ (*)</u>

(*) Tinción adecuada.

En el vaso hubo más formación de precipitado al ir aumentando la cantidad de gotas, desde 4 gotas hubo pérdida de eritrocitos permanecieron en el fondo fantasmas. A partir de 8 gotas no hubo eritrocitos, casi todos se destruyeron, permanecieron solamente fantasmas.

Eosina gotas	Solución Salina ml.	Formación de precipitado en vaso	Eritrocitos en la cámara
1	2	+	-
2	2	+	-
3	2	++	-
4	2	++	-
5	2	+++	++
6	2	+++	+++
7	2	+++	++++
8	2	+++	+++++
9	2	+++	++++
<u>10</u>	<u>2</u>	<u>+++</u>	<u>++++</u>

++++ Tinción adecuada

Al ir agregando las gotas de eosina fue incrementándose la formación de precipitado, en la cámara con 6 gotas se colorearon los eritrocitos, con formas regulares y bien definidas. A partir de 8 gotas había coloración pero tienden a agruparse los eritrocitos.

3.- Estudio del tiempo a partir del cual ya no hubo destrucción de eritrocitos. Se empleó la cantidad constante de solución amortiguadora de 10 ml. con varias gotas de eosina.

Eosina gotas	pH	T I E M P O
4	3.9	1 minuto Eritrocitos nítidos, coloreados, otros alargados. No hay fantasmas.
		10 minutos Eritrocitos irregulares pero nítidos, unos coloreados empiezan a verse fantasmas.
		20 Minutos Numerosos fantasmas.
		30 minutos Numerosos fantasmas.
5	3.9	1 minuto Eritrocitos irregulares poco nítidos.
		10 minutos Aparecen fantasmas.
		20 minutos Hay más fantasmas.
		30 Minutos Abundantes fantasmas.
<u>6</u>	<u>3.9</u>	1 minuto Eritrocitos coloreados, regulares, nítidos y coloridos.
		10 minutos Eritrocitos irregulares, empiezan a aparecer fantasmas.

Eosina gotas	pH	T I E M P O
		20 minutos Eritrocitos nítidos, coloreados, hay fantasmas.
		<u>30 minutos</u> <u>Abundantes fantasmas.</u>
		42 minutos Eritrocitos irregulares, abundantes fantasmas.
		60 minutos Irregulares y abundantes fantasmas.
7	3.9	Sucede lo mismo que con 6 gotas de eosina.
8	3.9	1 minuto Eritrocitos bien coloreados.
		20 minutos Numerosos fantasmas.
10	3.9	1 minuto Hay precipitado, tendencia de los eritrocitos a agruparse.
		30 y 50 minutos Abundantes fantasmas.

Se decidió hacer las lecturas hasta los 30 minutos y emplear 6 gotas de eosina, porque después de ese tiempo no hay estabilidad en las lecturas.

Para reportar el porcentaje de Hb-F en la Técnica introducida por nosotros, utilizando la Cámara de Neubauer y de acuerdo a los experimentos llevados a cabo, dicha técnica quedó establecida como sigue:

REACTIVOS:

- 1.- Solución de Eosina 1%.
- 2.- Amortiguador pH 3.9 mezclar:
4 partes de ácido cítrico M/6
5 partes de KH_2PO_4 M/6
- 3.- Solución salina 0.089% de NaCl
- 4.- Solución "A": 10 ml. de amortiguador pH 3.9
más 6 gotas de eosina 1%.

MATERIAL:

Pipeta Clay-Adams para glóbulos rojos.
Cámara de Neubauer.

PROCEDIMIENTO:

1. Se toma por duplicado, sangre heparinizada con la pipeta para glóbulos rojos hasta la marca 0.5 partes (hasta 101)
2. Se afora una de las pipetas con Solución "A." y la otra con solución salina.
3. Se agita 12 veces manualmente y se desechan las primeras gotas.
4. Se coloca una gota en la Cámara de Neubauer, se observa al microscopio y se cuentan los glóbulos rojos al minuto de haber preparado la pipeta.
5. La segunda lectura se hace a los 30 minutos de haber preparado la Cámara, se observa que han desaparecido un gran número de eritrocitos permaneciendo únicamente aquellos que son resistentes o sea, los que contienen Hb-F. (Figura número 5).

CALCULOS:

Lectura:

$$\frac{30 \text{ minutos Solución "A"}}{30 \text{ minutos Solución salina}} \times 100 = \% \text{ Eritrocitos de Hb-F resistentes.}$$

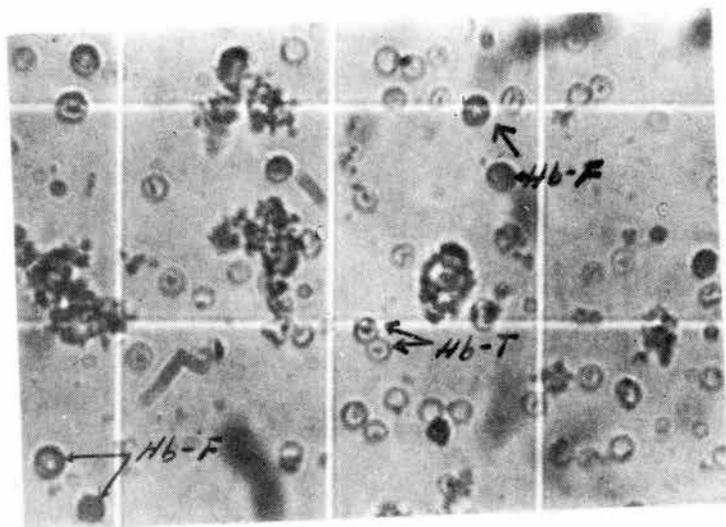


FIGURA 5.- Eritrocitos en la Cámara de Neubauer.

IV.- Resultados.

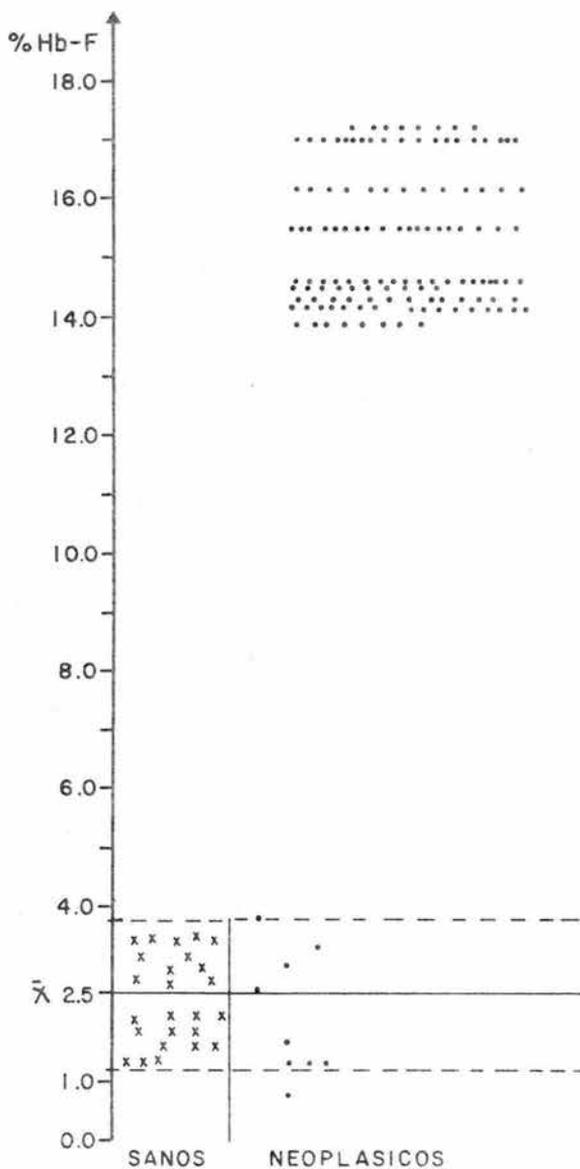
TABLA NUMERO 4

VALORES DE HB-F DE PERSONAS "CLINICAMENTE SANAS"

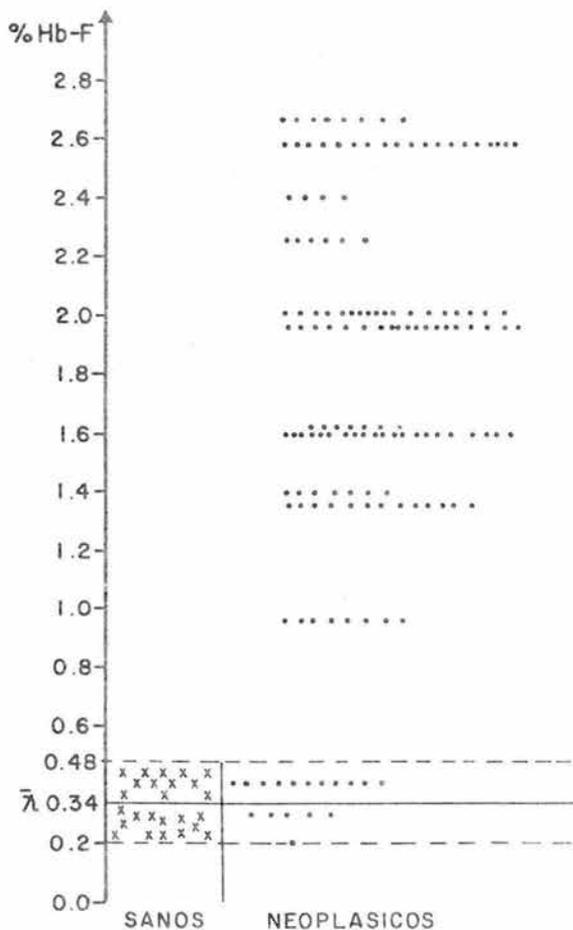
Muestra Número	Hb-T 540 nm.	Hb-F 540 nm.	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.820	0.000	0.00	0.3	32.17
2	0.601	0.000	0.00	0.7	43.24
3	0.730	0.000	0.00	0.2	77.53
4	0.710	0.010	1.40	0.1	49.15
5	0.730	0.010	1.37	0.3	4.91
6	0.700	0.000	0.00	0.4	7.00
7	0.844	0.086	0.19	0.5	18.18
8	0.797	0.053	6.65	0.5	53.15
9	0.691	0.036	5.21	1.0	28.66
10	0.660	0.051	7.73	0.7	6.94
11	0.810	0.010	1.23	0.2	3.49
12	0.855	0.010	1.16	0.5	00.0
13	0.845	0.010	1.18	0.5	0.00
14	0.790	0.010	1.26	0.5	0.00
15	0.786	0.012	1.53	0.0	5.95
16	0.778	0.017	2.26	0.0	15.95
17	0.838	0.012	1.53	0.2	22.17
18	0.778	0.022	2.85	0.2	27.03
19	0.762	0.012	1.64	0.0	30.55
20	0.800	0.020	2.59	0.3	31.45
21	0.752	0.019	2.58	0.5	70.57
22	0.815	0.033	4.14	0.2	30.81
23	0.787	0.023	2.94	0.6	32.16
24	0.718	0.041	5.71	0.0	6.5
25	0.693	0.053	7.65	0.2	4.2

T-25

-				
x		2.5	0.34	24.07
σ		2.36	0.255	21.80
Límites de confiabilidad	1.2 - 3.8	0.2-	0.48	0 - 36.5%



GRAFICA.-2
 DISPERSION DE VALORES OBTENIDOS CON RESPECTO A
 LA MEDIDA DE Hb-F ;TECNICA DE SINGER.



GRAFICA.-3
 DISPERSION DE VALORES OBTENIDOS CON RESPECTO A
 LA MEDIDA DE Hb-F; TECNICA DE ELUCION ACIDA

TABLA NUMERO 5

VALORES DE HB-F EN CARCINOMA CERVICO UTERINO

Muestra Número	Hb-T 540 nm.	Hb-F 540 nm	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1					
2	0.665	0.100	15.03	0.5	5.2
3					
4	0.705	0.150	21.70	0.4	56.39
5	0.750	0.100	13.33	1.0	34.18
6	0.460	0.100	21.74	0.8	4.02
7	0.300	0.100	33.33	0.6	16.02
8	0.676	0.052	7.69	3.8	53.63
9	0.538	0.047	8.73	2.3	55.73
10	0.676	0.151	23.33	1.3	23.66
11	0.691	0.084	12.15	0.9	23.85
12	0.592	0.103	17.39	1.7	37.96
13	0.687	0.100	14.55	0.8	25.41
14	0.465	0.044	9.46	4.3	38.79
15	0.728	0.189	25.96	9.6	49.89
16	0.563	0.140	24.77	0.4	87.5
17	0.468	0.103	22.00	1.1	81.12
18	0.552	0.168	30.43	0.7	32.79
19	0.617	0.184	29.82	1.1	63.05
20	0.671	0.081	12.07	0.6	12.72
21	0.587	0.103	17.54	1.4	53.87
T-21					
\bar{x}			17.19	1.64	41.34
σ			9.28	2.1	22.45

TABLA NUMERO 6

VALORES DE HB-F EN DISPLASIA DE CUELLO UTERINO

Muestra Número	Hb-T 540 nm	Hb-F 540 nm	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.655	0.100	15.26	0.6	46.70
2	0.700	0.150	21.42	1.2	53.94
3	0.600	0.150	25.00	1.0	36.36
4	0.550	0.100	18.18	0.9	3.31
5	0.715	0.100	13.98	0.4	50.00
6	0.550	0.100	18.18	0.5	77.78
7	0.690	0.064	9.27	1.7	40.43
8	0.702	0.141	19.52	1.4	13.40
T = 8					
\bar{x}			17.30	0.96	40.06
σ			8.20	0.46	22.45

TABLA NUMERO 7

VALORES DE HB-F EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO Y OVARIO

Muestra Número	Hb-T 540 nm	Hb-F 540 nm	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.759	0.042	5.60	2.5	44.80
2	0.568	0.061	10.73	1.0	77.03
3	0.567	0.173	30.50	1.0	81.77
4	0.652	0.082	13.57	0.8	32.44
5	0.737	0.115	15.60	1.1	13.86
6	0.680	0.048	7.05	1.5	40.26
7	0.487	0.038	7.55	0.9	18.00
8	0.766	0.040	5.22	4.8	49.11
9	0.554	0.027	4.87	2.0	31.08
10	0.347	0.047	13.54	0.6	55.37
11	0.697	0.167	23.95	0.9	42.11
12	0.591	0.155	26.22	0.3	29.85
13	0.675	0.105	15.55	0.4	41.33

T = 13

\bar{x}		16.28	1.37	42.84
σ		8.35	1.2	19.92

TABLA NUMERO 8

VALORES DE HB-F EN MASTOPATIA FIBROQUISTICA Y
FIBROADENOMA MAMARIO.

Muestra Número	Hb-T 540 nm.	Hb-F 540 nm.	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.681	0.005	0.73	2.6	60.61
2	0.646	0.150	23.21	7.6	55.18
3	0.632	0.073	11.55	2.2	21.49
4	0.734	0.055	7.49	1.7	23.37
5	0.678	0.063	9.29	0.4	38.82
6	0.680	0.137	20.14	2.0	58.80
7	0.728	0.074	10.16	2.9	55.76
8	0.712	0.121	16.99	4.8	22.87
9	0.652	0.053	8.06	0.8	31.64
10	0.659	0.048	7.28	0.5	27.36
11	0.692	0.051	7.36	0.4	28.89
12	0.581	0.037	6.36	3.5	14.05
13	0.651	0.135	20.73	2.8	52.92
14	0.647	0.118	18.23	10.2	61.33
15	0.611	0.100	16.36	0.3	52.29
16	0.633	0.109	17.21	0.6	42.23
17	0.886	0.203	22.91	4.9	15.13
18	0.684	0.112	16.37	0.9	21.14
19	0.744	0.217	29.16	1.8	28.68
T = 19					
\bar{x}			15.58	2.31	37.50
s			8.04	2.4	16.59

TABLA NUMERO 9

VALORES DE HB-F EN CARCINOMA MAMARIO

Muestra Número	Hb-T 540 nm	Hb-F 540 nm	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.615	0.035	5.69	1.5	40.26
2	0.593	0.084	14.16	3.8	15.11
3	0.669	0.028	4.18	2.8	98.57
4	0.698	0.018	3.27	2.8	27.02
5	0.755	0.024	3.17	1.5	53.99
6	0.613	0.029	4.73	2.0	36.15
7	0.760	0.046	6.00	1.0	24.19
8	0.702	0.073	10.39	3.2	50.68
9	0.705	0.042	5.95	5.2	54.00
10	0.648	0.088	13.58	2.2	57.97
11	0.708	0.084	11.86	1.3	12.66
12	0.565	0.023	4.07	3.2	15.42
13	0.539	0.103	19.10	1.2	24.86
14	0.526	0.052	9.88	0.4	56.06
15	0.735	0.051	6.93	1.0	38.08
16	0.645	0.095	14.72	1.5	75.46
17	0.723	0.147	20.60	1.9	26.58
18	0.606	0.058	9.57	0.8	16.52
T = 18					
\bar{x}			14.15	1.73	41.59
σ			7.738	1.16	23.11

TABLA NUMERO 10

VALORES DE HB-F EN CARCINOMA DE PROSTATA
Y TESTICULO

Muestra Número	Hb-T 540 nm	Hb-F 540 nm	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.710	0.050	7.04	0.3	14.23
2	0.643	0.107	16.64	1.2	20.97
3	0.743	0.176	23.68	0.4	20.98
4	0.777	0.072	9.26	2.6	49.81
5	0.671	0.047	7.00	2.9	39.63
6	0.572	0.085	14.86	7.1	35.66
7	0.719	0.119	16.55	1.3	4.00
8	0.656	0.010	1.52	5.3	69.19
T = 8					
\bar{x}			13.96	1.94	26.46
σ			7.85	1.56	15.90

TABLA NUMERO 11

VALORES DE HB-F EN CARCINOMA EPIDERMOIDE

Muestra Número	Hb-T 540 nm	Hb-F 540 nm	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.712	0.066	9.26	1.9	40.43
2	0.500	0.019	3.8	0.5	47.65
3	0.842	0.123	14.60	1.2	39.30
4	0.762	0.043	6.16	3.0	13.11
5	0.626	0.309	49.36	2.0	79.34
6	0.740	0.314	42.43	0.6	39.96
7	0.621	0.047	7.56	0.7	28.92
T = 7					
\bar{x}			14.34	1.85	43.30
σ			9.02	1.47	21.29

TABLA NUMERO 12

VALORES DE HB-F EN CARCINOMA DE TIROIDES

Muestra Número	Hb-T 540 nm	Hb-F 540 nm	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.698	0.101	14.46	4.5	31.72
2	0.594	0.067	11.29	2.9	17.99
3	0.548	0.069	12.59	1.9	50.68
4	0.013	0.334	33.00	0.3	16.74
T =	4				
\bar{x}			14.54	1.61	33.46
σ			9.01	1.37	16.41

TABLA NUMERO 13

VALORES DE HB-F EN SARCOMAS

Muestra Número	Hb-T 540 nm	Hb-F 540 nm	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.787	0.015	1.90	2.2	34.48
2	0.659	0.057	8.64	5.1	45.75
3	0.581	0.073	12.56	0.5	46.74
4	0.509	0.078	15.32	1.9	68.84
5	0.733	0.158	21.55	1.0	23.12
6	0.785	0.125	15.92	0.5	16.72
7	0.609	0.092	13.46	0.3	22.54

T = 7

 \bar{x}

14.23 1.62 39.27

 σ

8.84 1.49 18.78

TABLA NUMERO 14

VALORES DE HB-F EN CARCINOMAS HEMATOLÓGICOS

Muestra Número	Hb-T 540 nm	Hb-F 540 nm	T. Singer %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.486	0.030	6.17	4.1	68.36
2	0.689	0.092	13.35	3.9	64.96
3	0.731	0.126	17.23	3.9	30.00
4	0.741	0.098	13.22	1.0	17.57
5	0.672	0.225	33.48	0.5	23.15
6	0.602	0.041	6.81	0.2	28.57
T = 6					
\bar{x}			14.57	2.22	38.76
σ			9.01	2.27	22.07

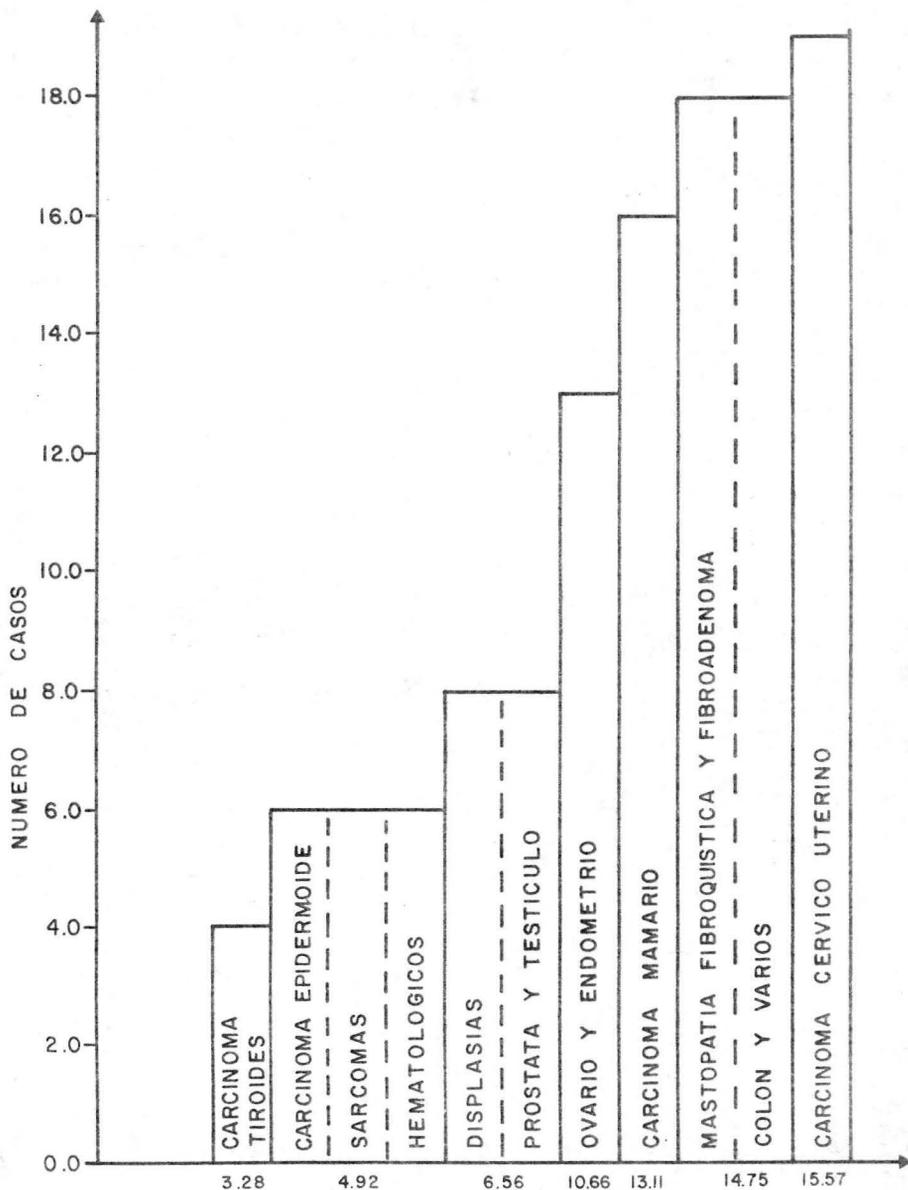
TABLA NUMERO 15

VALORES DE HB-F EN CARCINOMA DE COLON Y VARIOS

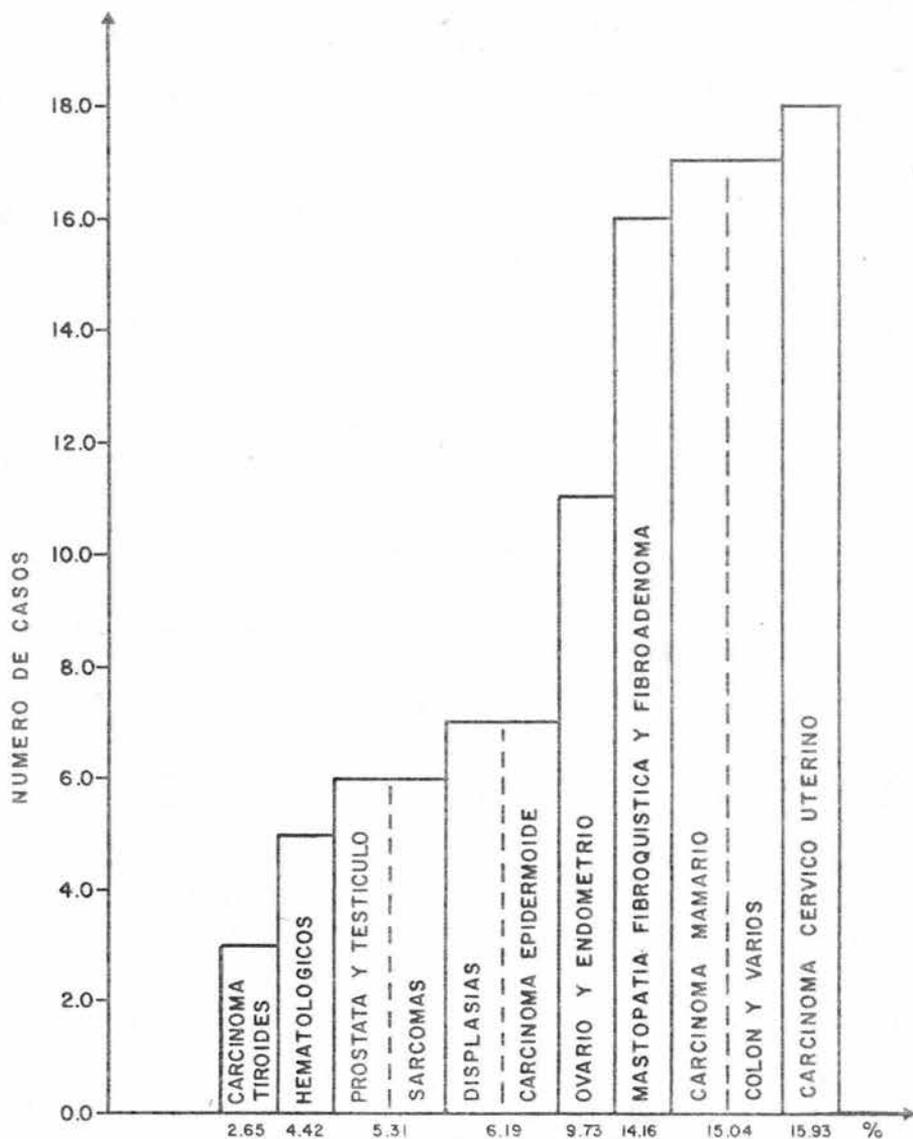
Muestra Número	Hb-T 540 nm	Hb-F 540 nm	Singer T. %	E. Ac. %	Cámara de Neubauer %
1	0.496	0.041	8.26	3.5	25.87
2	0.258	0.019	6.97	2.4	33.23
3	0.764	0.021	2.74	2.0	56.04
4	0.638	0.037	5.79	0.4	32.79
5	0.538	0.115	21.37	3.3	21.31
6	0.705	0.080	11.34	0.6	14.75
7	0.593	0.053	8.93	1.3	58.92
8	0.759	0.061	8.03	4.3	17.31
9	0.664	0.207	31.17	0.6	32.25
10	0.631	0.090	14.26	4.6	47.20
11	0.598	0.126	21.07	1.2	30.07
12	0.711	0.135	18.98	1.9	36.88
13	0.707	0.192	25.74	2.2	17.94
14	0.417	0.040	9.83	1.0	21.73
15	0.684	0.162	23.68	2.7	43.19
16	0.533	0.125	23.45	3.2	57.38
17	0.659	0.213	32.32	0.4	31.05
18	0.728	0.099	13.59	1.3	24.05
19	0.591	0.033	5.58	0.5	37.06

T = 19

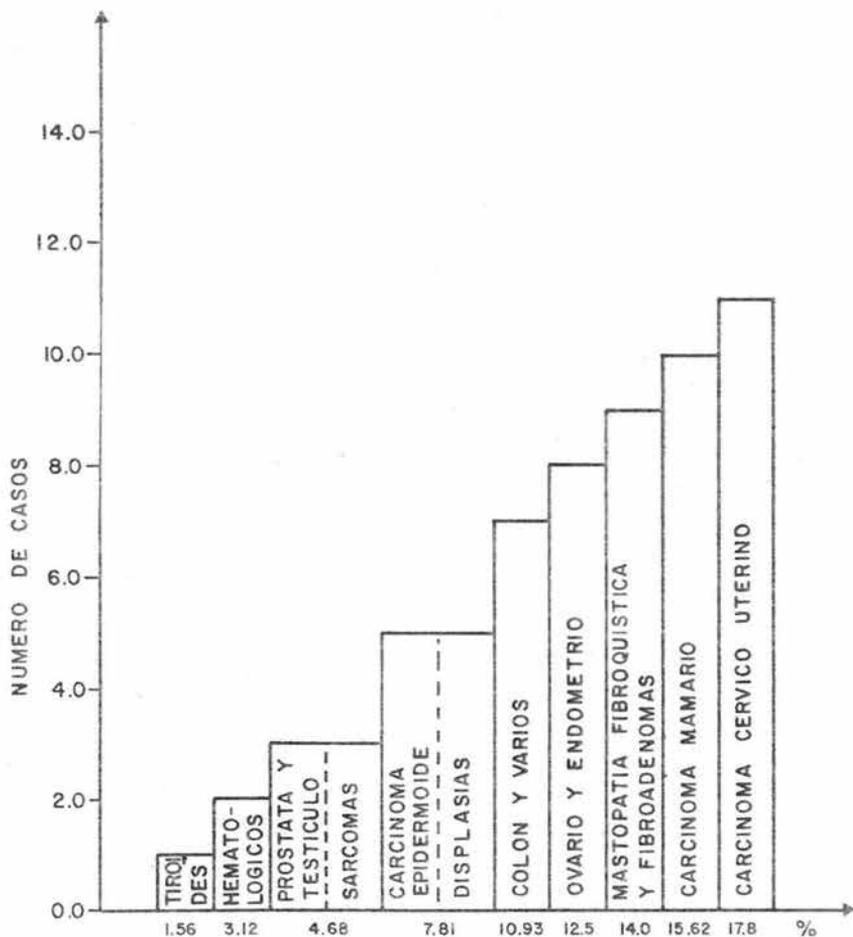
\bar{x}			14.69	2.23	33.63
σ			8.99	2.24	13.62



GRAFICA - 5
 INCIDENCIA DE Hb-F POR EL METODO DE SINGER EN
 DISTINTOS PADECIMIENTOS NEOPLASICOS.



GRAFICA.-6
 INCIDENCIA DE Hb-F POR EL METODO DE ELUCION ACIDA
 EN DISTINTOS PADECIMIENTOS NEOPLASICOS.



GRAFICA.- 7

INCIDENCIA DE Hb-F POR EL METODO DE RESISTENCIA ACIDA EN DISTINTOS PADECIMIENTOS NEOPLASICOS.

El estudio realizado de la Determinación de Hemoglobina Fetal en un grupo de enfermos cancerosos fue con el objeto de una ayuda diagnóstica más, en este tipo de padecimientos cuya frecuencia ha aumentado en la actualidad y tener así mismo una valoración temprana que pueda servir más al clínico que los asiste.

Primero.- Se valoraron las técnicas para la cuantificación de Hb-F comparada con:

- a) La de Elución Ácida y
- b) La que utiliza la Cámara de Neubauer.

Las técnicas empleadas de Singer y de Elución Ácida ya conocidas y la de Neubauer puesta en experimentación por nosotros. Para tomar como referencia la Técnica de Singer la cual, en algunos pasos fue modificada en: Efecto del lavado, tiempo de incubación y concentración de la solución desnaturalizante con el objeto de optimizar el método. Una vez establecidos los puntos anteriores se estudió su reproducibilidad como se muestra en la Tabla número 2 que fue de 0.016 y el porcentaje de recuperación que fue de 99.81% como se muestra en la Tabla número 3.

La Técnica de Kleihauer de Elución Ácida también estudiada y se decidió trabajarla en la forma original, ya que experimentalmente se obtuvo buena reproducibilidad. Para la tercera Técnica de Resistencia Ácida en Cámara de Neubauer basada como las anteriores en la resistencia que presentan los eritrocitos con Hb-F adaptada por nosotros como una nueva técnica con el fin de hacerla cuantitativa, ya que la de Elución ácida (frotis) se considera o la consideramos cualitativa exclusivamente por lo cual se utilizaron los mismos reactivos y encontramos el pH óptimo de los eritrocitos hasta el cual permanecieron estables, que fue de 4. La cantidad de gotas de eosina al 1% en solución amortiguadora pH 3.9 y solución salina en que no hubo formación de precipitado que fue de 10 gotas de eosina y 2ml. de amortiguador. Sin embargo cuando se estudió el tiempo a partir del cual ya no hubo destrucción de eritrocitos se usó solución amortiguadora 10 ml. y también se variaron las gotas de eosina por agregar en el que en este caso encontramos que la cantidad en gotas de eosina fueron 6 y el tiempo adecuado de 30 minutos, ya que observamos que con 10 gotas de la solución de eosina presentó un precipitado y una tendencia de los eritrocitos a agruparse.

Una vez establecida la metodología a emplear se procedió al estudio de establecer los valores de referencia en un grupo control por cada una de las tres técnicas empleadas, que se presentan en la Tabla número 4 y donde se encontraron:

Técnica:	Singer %	Elución Acida %	C. Neubauer %
\bar{x}	2.5	0.34	24
Límites de Confiabilidad 99%	1.2 a 3.8	0.20 a 0.48	0.0 a 36.5
Prueba de "t"	-	4.619	5.445
		$P << 0.001$	

y cuya dispersión de valores se presentan en las gráficas números 2, 3 y 4.

Al estudio de la "t" de Student para la comparación de ellos se encontraron con diferencias significativas por lo que pensamos que se realicen las muestras por los tres métodos para tener mayor seguridad del resultado que se reporte.

Lo anterior se hizo para tener los valores de referencia y poder comparar los resultados de los enfermos estudiados.

Al estudio de los 130 enfermos cancerosos sin separación de estirpe histológica, después de obtenidos los resultados se separaron por grupos de acuerdo al o los órganos afectados, por lo cual presentamos los resultados de ellos en las Tablas número 5 a la número 15, y cuyos valores medios de cada grupo fueron:

Diagnóstico com- -probado histo- -patológicamente	Número de -Pacien- tes	Técnica Singer %	E. Ac. %	Cámara Neubauer %
Carcinoma Cérvico- couterino	21	17.19	1.62	41.34
Displasia de cue- llo uterino	8	17.30	0.96	40.06
Carcinoma de endo- metrio y ovario	13	16.28	1.37	42.84
Mastopatía fibro- quística y Fibroa- denoma mamario	19	15.58	2.31	37.50
Carcinoma mamario	18	14.15	1.73	41.59
Carcinoma de Prósta- ta y Testículo	8	13.96	1.94	26.46
Carcinoma epidermoide	7	14.34	1.85	43.40
Carcinoma de tiroides	4	14.54	1.61	33.46
Sarcomas	7	14.23	1.82	39.27
Carcinomas hematoló- gicos	6	14.57	2.22	38.76
Carcinoma de colon y varios	19	14.69	2.23	33.63

Al hacer la comparación de los valores entre el grupo de enfermos cancerosos y las diferentes técnicas tenemos que: Por la Técnica de Singer el 93.12% (121) caen fuera

del intervalo "normal"; el 3.8% (4) variaron de 2.5 a 3.8 y solo el 3.07% (5) tuvieron cifras inferiores al 2%.

Por la de Elución Ácida el 86.92% (113) caen fuera del intervalo "normal"; el 8.46% (11) estuvieron en el intervalo "normal" y el 4.66% (6) tuvieron valores inferiores al 0.34%.

Con respecto a la Resistencia Ácida en la Cámara de Neubauer se encontró que el 49.23% (64) caen fuera del intervalo "normal", el 21.53% (28) variaron entre 24.0 - 36,5%, y el 29.23% (38) tuvieron valores inferiores al 24.0%.

Por último en las gráficas números 5, 6 y 7 presentamos la incidencia de Hb-F encontrada por los tres distintos métodos usados por esta investigación.

Aún cuando no se ha estudiado el porqué de la síntesis de la Hemoglobina fetal en personas adultas en estado de enfermedad como las que hemos estudiado, vemos claramente una elevación de sus valores con respecto a la población control, y en el caso particular tratado, como son enfermos cancerosos la síntesis proteica es alterada por diferentes condiciones y

que se sintetizan sustancias que modifican la velocidad de expresión del sistema genético operacional, los cuales serían responsables de los distintos tipos de cadenas hemoglobínicas, lo cual se manifestaría por aumento en la síntesis de Hb-F.

VI. Resumen y Conclusiones.

En el estudio realizado de la Determinación de Hb-F en un grupo de enfermos cancerosos se trataron:

- 1) Generalidades sobre la Hemoglobina Fetal
Embriología
Fisiología y su
Afinidad por el oxígeno.

Neoplasias:

Anatomía
Fisiología
Bioquímica, e
Inmunología.

- 2) Material y Métodos

En que se describen con detalle las tres técnicas empleadas Desnaturalización alcalina, Elución ácida y Resistencia ácida a la hemoglobina fetal, así como las modificaciones realizadas.

Se evaluaron 25 personas clínicamente sanas que constituyeron el grupo control, con las que se establecieron los valores de referencia de nuestro medio, que fueron:

Técnica	Por ciento
Singer	2.5
Elución ácida	0.34
Resistencia ácida	24.00

Y 130 enfermos cancerosos que se estudiaron con el fin de ver si existían alteraciones de la hemoglobina fetal en ellos.

3) Así mismo se reportan los resultados obtenidos de ellos, los cuales se presentan en las Tablas número 5 a la 15, y los cálculos estadísticos que se emplearon.

4) Se presenta una breve discusión sobre los resultados obtenidos en el cual existe involucrando las tres metodologías empleadas un promedio de 76.42% anormalidad en los 130 pacientes estudiados. Al mismo tiempo se reportan la comparación estadística de los tres métodos en donde observamos que si existen diferencias significativas en ellos.

CONCLUSIONES

Por lo presentado anteriormente y, a la revisión de los datos obtenidos pensamos que:

a) De la metodología empleada y de acuerdo a la comparación estadística hecha por la prueba de "t" los métodos difieren estadísticamente y que nos recomendamos a usar el Método de Singer que es espectrofotométrico y con menos condiciones de variación, ya que el de la Elución ácida lo consideramos cualitativo por condiciones de apreciación personal y a su vez el de Resistencia ácida en la Cámara de Neubauer encontramos que los valores de confiabilidad son muy amplios y la mayoría de los resultados caerían dentro del intervalo "normal".

b) En cuanto a la evaluación de la hemoglobina fetal en los enfermos cancerosos obtuvimos alteraciones marcadas en ellos como fueron:

Por ciento de Alteración	Métodos
93	Singer
87	-Elución Ácida
49	C. Neubauer

Por lo que consideramos que por mínima que sea la alteración de la hemoglobina fetal pudiera ser considerada como manifestación paraneoplásica no específica.



BIBLIOGRAFIA

1. Newman, R.D.; Pierre, R.V. y Leinman, S.W.
Studies on the diagnostic significance of hemoglobin F levels.
Mayo Clini. Proc. 48:199 (1973)
2. Olivares-Esquer, J.; Ortíz-Lazcano, S.; y González-Llaven, J.
Elevación de hemoglobina fetal en padecimientos neoplásicos.
Archivos de Investigación Médica 6: 413-418 (1975)
3. Singer, K.; Chernoff, A.I. y Singer, L.
Studies on abnormal hemoglobins I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation.
Blood 6: 413, (1951)
4. Betke, K.; Keihauer, E.
Fetalerand bleiben der blutfarbstoff in eritrozyten und erythroblasten von menschlichen feten and neugeborner.
Blut 4: 241-249 (1958)
5. Pembrey, M.E. and Weatherhall, D.J.
Maternal synthesis of haemoglobin F in pregnancy.
Brit. J. of Haematology 21, 355, p. (1971)
6. Huehas, E.R. and Beaven, G.H.
The biochemistry of development clinics in developmental medicine. In Spastics International Medical publications, ed. by P. Benson, Vol. 37, ch. 8 (1971) Heinemann Medical Books, London
7. Schroeder, W.A.; Shelton, S.R.; Shelton, S.B.; Cormick J. and Jones, R.T.
The aminoacid sequence of the α chain of human fetal hemoglobin.
Biochemistry 2: 992-1008 (1963)

8. Larkin, P.A.
Fetal and embryonic haemoglobins. Review article.
Journal of Medical Genetics 10: 50, (1973)
9. Beglioni, C.
Correlations between genetics and chemistry of human hemoglobins in Molecular Genetics - ed. by J.M. Taylor. Part I, pp 405-475, (1963).
Academic Press New York.
10. Huehns, E.R., Beaven, G.H. and Stevens, B.L.
Recombination studies on haemoglobins at neutral pH
Biochemical Journal 92: 440-448, (1964)
11. Schroeder, W.A. and Huisman, T.H.J.
Non allelic structural genes and hemoglobin synthesis.
Plenary Sessions of the 13th. International Congress of Hematology. Munich, pp 26-33, (1970)
12. Darrow, R.R.; Nowatovsky, S. and Austin, M.H.
Specificity of fetal and adult hemoglobins precipitins.
Archives of Pathology 30: 873-880, (1940)
13. Zipursky, A.; Larve, T. and Israels, L.G.
The in vitro metabolism of erythrocytes from newborn infants.
Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 38: 727-738, (1960)
14. Jones, P.E. and McCance, R.S.
Enzyme activities in the blood of infants and adults.
Biochemical Journal 45: 464-467, (1949)
15. Gordon, M., Nitowsky, H.M. and Cornblath, M.
Studies of tocopherol differences in infants and children.
American Journal of Disease of Children 90: 669-681, (1955)

16. Holmes, E.W.; Malone, J.I.; Winegrad, A.I. and Oski, F.A.
Hexokinase isoenzymes in human erythrocytes.
Association of type II with fetal hemoglobin.
Science 156: 646-648, (1967)
17. Allen, D.W.; Syman, J. and Smith C.A.
The oxygen equilibrium of fetal and adult hemoglobin.
Journal of Biological Chemistry 203: 81-87, (1953)
18. Pérez-Tamayo, Ruy
Principios de Patología. 2a. Ed. Prensa Médica Mexicana, 1965
19. Willis, R.A.
Pathology of tumors.
2nd. Ed. Butterworth. Londres, 1953
20. Tae Suk Ro-Choi; Choi, C. Young; Savage, E.H. and Busch H.
Method Cancer. Res. 9:71, (1975)
21. Braun, C.A.
The biology of cancer.
Addison-Wesley Publishing Company.
1st. Ed. p. 129-143, (1974)
22. Rosado, G.A. y Reyes, F.A.
Inducción de algunas actividades enzimáticas en el tumor de Lettre-Ehrlich por el tratamiento con DNA y RNA normales.
Revista Médica del J.M.S.S. 39, (1967)