

CO
2010



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



ASPECTOS GENETICOS, QUIMICOS,
DIAGNOSTICOS Y CLINICOS DE LA
HEMOGLOBINOPATIA S.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

SANCHEZ GUZMAN MARIO

SANTIAGO MEJIA ROSA MA.

ASESORA: Q. F. B. IDALIA AVILA MIYAZAWA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
SECRETARIA ACADÉMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN
Reglamento de
Exámenes Profesionales

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

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
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:
Aspectos Genéticos, Químicos, Diagnósticos y Clínicos de la
Heroglobinopatía S.

que presenta el pasante: Rosa María Santiago Leif,
con número de cuenta: P509779-1 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
Kario Sánchez Guzmán

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 23 de Agosto de 1964

PRESIDENTE	<u>C. F. B. Ramón Cendejas Ramírez</u>
VOCAL	<u>C. F. B. Idalia Avila Miyazawa</u>
SECRETARIO	<u>M. en C. Victor Cendejas Buitrón</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>C. F. B. René Damián Santos</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>C. F. B. Patricia Camacho León</u>



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez 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:
Aspectos Genéticos, Químicos, Diagnósticos y Clínicos de la
Hemoglobinopatía S.

que presenta el pasante: María Sánchez Guzmán
con número de cuenta: PR57422-4 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo ; en colaboración con :
Rosa María Santiago Mejía

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 23 de Ago de 1994

PRESIDENTE	<u>D. F. B. Ramón Cendejas Ramirez</u>	
VOCAL	<u>D. F. B. Idalia Avila Miyazawa</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Victor Zendejas Buitrán</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>D. F. B. Rene Damian Santos</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>D. F. B. Patricia Cannon León</u>	

DEDICATORIAS.

GRACIAS INFINITAS A DIOS
NUESTRO SEÑOR POR HACER
POSIBLES TODOS NUESTROS
SUEÑOS.

GRACIAS A NUESTROS PADRES:
ROSALBA Y MARIO, SARA Y ROSALIO
POR DARNOS EL MEJOR DE LOS
EJEMPLOS, POR SU APOYO Y CON-
FIANZA PARA LOGRAR LO QUE
HASTA AHORA SOMOS.

A NUESTROS HERMANOS: ROCIO, ALEJANDRA, DANIEL, FRANCISCO, BENITO,
SOFIA, ANTONIO Y DANIELA.
ADRIANA, LETICIA, CANDIDO, LUZ Y CARLOS, GRACIAS POR LA ESPECIAL
AYUDA QUE NOS BRINDARON.

A NUESTROS AMIGOS:

LUIS A. (ZACAS)
ANDRES (OJITOS)
JOSE (BUBU)
ANTONIO (ZIMO)
AGUSTIN (CHACA)
RAUL (MANITAS)
MARIO (GUERRERO)
ALFREDO (MOSCO)
ALEJANDRO (GORDO)
MIGUEL V. (MIKE)
MAURICIO (MORRIQUIS)

JESUS (GÜILO)
ARTURO (CHAPURTURO)
ANTONIO R. (TOÑO)
RAFAEL (FAFITAS)
ROGER
IGNACIO (NACHO)
ROBERTO (LAMDA)
JUAN
NOE (PICHONCITO)
JOSE (TROGLO)
RAUL G.
CATALINA (CATA)

AZUCENA (MAZU)
DIANA (FUCHIS)
ROSARIO (CHAYO)
ROCIO (CHIO)
ALMA (GRANDE)
LAURA S. (GUERA)
GRISELDA (GRIS)
LETICIA (LETY)
MARGARITA (MAGOS)
GUADALUPE
RAQUEL
LUCIA (NACHA)

PORQUE CON ELLOS PASAMOS UNA DE LAS MEJORES ETAPAS DE LA VIDA,
LA JUVENTUD Y PORQUE SIN ELLOS, ESOS 5 AÑOS HUBIERAN SIDO UNA
PERDIDA DE TIEMPO.

UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL PARA CADA UNO DE
NUESTROS PROFESORES Y PARTICULARMENTE A LA PROFRA.
IDALIA ÁVILA MIYAZAWA ASESORA DE NUESTRA TESIS,
POR TODA LA AYUDA BRINDADA, DESEANDO QUE DIOS LA
COLME DE DICHA TODA LA VIDA.

ROSA Y MARIO.

INDICE GENERAL

	Hoja
INDICE DE TABLAS	5
INDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	7
GLOSARIO	10
1.0 Introducción	16
2.0 Objetivos	19
3.0 Hemoglobinas normales	20
3.1 Síntesis de hemoglobinas normales	25
3.2 Estructura química de las hemoglobinas normales (HbA, HbF y HbA ₂)	30
3.3 Características físicas y químicas de la HbA	33
4.0 Generalidades de la Anemia drepanocítica (HbS)	43
4.1 Definición e historia	47
4.2 Etiología	50
5.0 Aspectos químicos de la hemoglobina S	52
6.0 Aspectos genéticos de la Hemoglobinopatía S	64
6.1 Alteración genética de la HbS	70
6.2 Causas generadoras de la alteración y modo de herencia	76

	Hoja
6.2.1 Sustituciones en pares de bases	77
6.2.2 Formas tautoméricas de las bases	77
6.2.3 Análogos de bases	79
6.2.4 Desaminación de las bases	83
6.2.5 Mutación por corrimiento de lectura	85
6.2.6 Agentes alquilantes	85
6.2.7 Metabolización de agentes a formas reactivas	86
6.2.8 Agentes intercalantes	38
7.0 Manifestaciones clínicas	92
8.0 Complicaciones	100
9.0 Diagnóstico	103
9.1 Pruebas primarias	104
9.1.1 Frotis sanguíneo	104
9.1.2 Determinación de hematocrito (Hcto)	105
9.1.3 Conteo celular	105
9.1.4 Determinación de hemoglobina	106
9.1.5 Velocidad de sedimentación globular	107
9.1.6 Conteo de reticulocitos	107
9.2 Pruebas secundarias	108
9.2.1 Prueba de solubilidad: Ditionina	108
9.2.2 Prueba microscópica del metabisulfito	109
9.2.3 Prueba microscópica sin agente reductor	109
9.2.4 Electroforesis en agar citrato	110

Hoja

9.2.5	Detección de la HbS en líquido amniótico	113
9.2.6	Prueba de las huellas dactilares	116
10	Tratamiento	119
11	Referencias	123

INDICE DE TABLAS

	Hoja
Tabla I Hemoglobinas humanas normales.	22
Tabla II Formación de hemoglobinas normales.	29
Tabla III Hemoglobinas anormales.	49
Tabla IV Representación diagramática de una secuencia metabólica que da lugar a un producto.	63
Tabla V Representación de la alteración genética generadora de la HbS.	75
Tabla VI Análisis de la secuencia de aminoácidos.	118

INDICE DE FIGURAS

		Hoja
Figura 1	Proporción de cadenas polipeptídicas de la hemoglobina humana normal en las primeras etapas de la vida.	25
Figura 2	Estructura química de la HbA.	32
Figura 3	Grupo hemo de la hemoglobina.	35
Figura 4	Porfirinas naturales.	36
Figura 5	Curva de saturación de oxígeno de la HbA.	41
Figura 6	Esquema etiológico de la HbA.	51
Figura 7	Aspecto de eritrocitos humanos con HbS.	54
Figura 8	Cantidad de Calcio $2+$ que entra a través de la membrana de eritrocitos con HbS.	56
Figura 9	Micrografías de eritrocitos con HbS oxigenadas y desoxigenadas.	57
Figura 10	Gráfica de reorientación lipídica en eritrocitos con HbS.	59
Figura 11	Representación del puente valina-valina en la cadena β de la HbS.	61
Figura 12	Apariencia de fibras de la hemoglobina drepanocítica.	61
Figura 13	Esquema de la agregación lineal de la HbS.	62
Figura 14	Descendencia característica en parejas homocigóticas y heterocigóticas con HbS.	89
Figura 15	Electroforesis de la HbS y HbA.	112
Figura 16	Detección de la HbS en líquido amniótico.	114
Figura 17	Diagrama de huellas dactilares.	117

RESUMEN

La enfermedad por hemoglobina S, descrita a principios de éste siglo (25) es una anemia hemolítica crónica y ocurre primordialmente entre individuos de raza negra Africana. (16)

(Cabe señalar que actualmente se ha detectado el padecimiento en personas no pertenecientes a la raza negra). Los eritrocitos contienen HbS. La presencia de esta hemoglobina dentro del eritrocito, permite que la forma biconcava normal de los glóbulos rojos tome una forma de hoz o media luna. (21)

Este cambio es especialmente visible cuando la concentración de oxígeno disminuye en el torrente circulatorio a grandes altitudes o incluso a bajas altitudes en el sistema circulatorio periférico. (27) La propiedad de adoptar forma de hoz es una anomalía transmitida genéticamente, de tipo heterocigótico, en personas con el rasgo drepanocítico y homocigótico en personas con anemia drepanocítica. (53) El padecimiento cuando es heredado por ambos padres, (estado homocigótico) se forma la HbSS. Cuando sólo uno de los padres aporta al gen para la HbS (estado heterocigótico) la hemoglobina formada es la HbSA. (52)

El defecto en la anemia drepanocítica yace en el reemplazo de la HbA por HbS. La hemoglobina del drepanocito tiene una valina en lugar del ácido glutámico en el sexto residuo de aminoácido de la cadena β en la molécula de la globina. (81) Resulta pues, que de casi 300 aminoácidos que existen en cada mitad de la molécula de

hemoglobina S y la hemoglobina A difieren únicamente en uno. (61)

Este cambio produce pérdida de dos grupos carboxilo por molécula; como resultado, la carga de la molécula es más positiva y su movimiento hacia el polo positivo sobre el papel de electroforesis a pH 8.6 es más lento que el de la HbA. (43)

La HbS forma tactoides insolubles a bajas tensiones de oxígeno y disminución de pH. Murayama utilizando modelos a escala de la molécula de la hemoglobina, ha propuesto la siguiente explicación para la estructura molecular de la hemoglobina S oxigenada. (19)

La valina substitutiva forma una banda hidrofóbica con otra valina, un enlace de hidrógeno entre otros dos aminoácidos en forma concomitante, y cuando las cadenas β se desplazan aparte en la desoxigenación, el sitio anormal queda alineado con un sitio semejante en la cadena de otra molécula. (19)

Esta ciclización de los dos extremos de la cadena β en forma de llave que corresponde a un lugar complementario en las cadenas α de una molécula vecina, de manera que se produce fijación de moléculas. Cuando la HbS es oxigenada, las dos cadenas β se acercan una a otra aproximadamente 7 Åms, provocando disrupción de la disposición de llave y abriendo las medias lunas ó formaz de hoz de la HbS. (53) Murayama también ha propuesto que cuando forma medias lunas la HbS se construye microtúbulos formados por 6 monofilamentos de hemoglobina enrollados alrededor de un centro hueco. (46)

Los eritrocitos procedentes de pacientes con anemia de células

en hoz adoptan forma semilunar con concentraciones fisiológicas de oxígeno, pero se necesita una disminución más intensa de la tensión de oxígeno para producir formas en hoz en personas con el rasgo de célula falciforme. Se ha considerado que esta diferencia entre los eritrocitos que solo contienen hemoglobina en hoz y los que contienen, además de la semilunar, hemoglobina normal constituye la base de las manifestaciones clínicas de la drepanocitosis y del proceso constituido por el simple rasgo falciforme. Los individuos que tienen el rasgo falciforme son esencialmente asintomáticos y siguen así a menos que la saturación de oxígeno de la sangre disminuya hasta un grado anormal, o se produzca acidosis. (8)

Estos eritrocitos son más susceptibles a la hemólisis que los normales, pero se cree que otros factores aún no aclarados pueden contribuir a la disminución de la sobrevivencia de los eritrocitos. (15) Se ha propuesto que la destrucción excesiva de glóbulos rojos resultaría de un aumento de la fragilidad mecánica, demostrado cuando los eritrocitos adoptan la forma de media luna. (35) Las células distorsionadas son más viscosas que las normales y esto puede conducir a trombosis e infarto. La viscosidad conduce a mayor anoxia, aumento en la formación de drepanocitos y elevación de la estasis. (23)

El desarrollo de las lesiones que ocurren en diversos órganos se ilustran en el esquema 1.0

Una complicación grave de la anemia de glóbulos falciformes es

la crisis hipoplásica. Infecciones generales pueden deprimir la eritropoyesis y aunque tienen poca importancia con la vida normal de los glóbulos rojos, puede ser grave amenaza en paciente con eritrocitos de vida breve. (18). Las consecuencias en el desarrollo de la sustitución del ácido glutámico por valina en este padecimiento obviamente son muy graves para los homocigotos falciformes: se estima que esta enfermedad da lugar a la muerte de más del 10% de los negros americanos homocigóticos antes de los veinte años. (16).

Por caprichos de la naturaleza no toda consecuencia de la hemoglobina S es fatal. Se cree que el efecto de la hemoglobina falciforme en los eritrocitos implica un cambio en la viscosidad en las células eritrocíticas que probablemente ayuda a evitar la infección parasitaria de malaria falciparum. (15)

No suele haber dificultad para establecer el diagnóstico de anemia drepanocítica si se piensa en ella. La demostración de la aparición de células falciformes en un paciente anémico no establece el diagnóstico de anemia drepanocítica, porque el rasgo falciforme es común en pacientes de raza negra que pueden sufrir anemia por cualquier otra causa. (25)

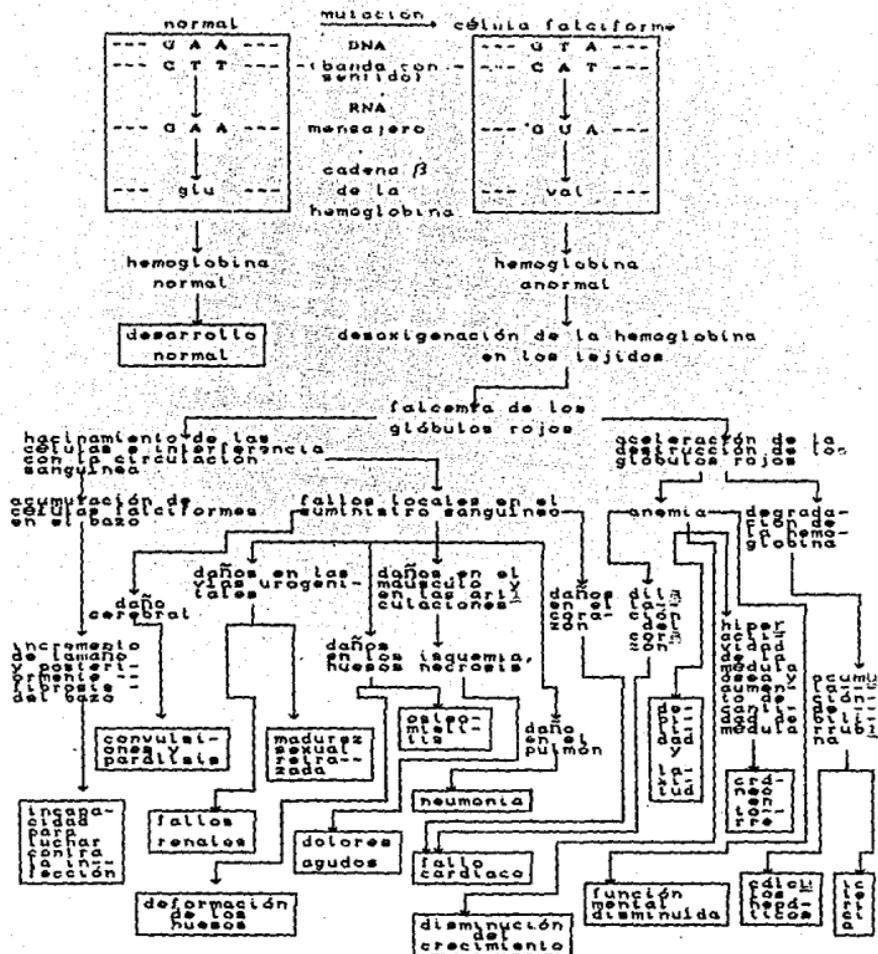


Fig.1.0 Efectos pleiotrópicos diversos de la mutación de la HbS. Comienza con la transversión que cambia una timina por una adenina en la banda con sentido del DNA del gen de la Hb β . El lugar del DNA en el que se da la transversión corresponde con el aminocido número 6 de la Hb. Tal como se indica, la banda con sentido del DNA se transcribe en un RNA mensajero, y el trinucleótido GUA se traduce en el aminocido valina en lugar del normal ácido glutámico. (48)

En el paciente corriente con anemia drepanocítica la hemoglobina y el número de eritrocitos están disminuidos hasta aproximadamente la mitad de los valores normales. (23) La anemia es normocítica y normocrómica, ha menos que haya factores de complicación. En el frotis teñido de sangre periférica suelen observarse unas pocas formas de hoz, pero lo más notable es la intensidad de anisocitosis y poiquilocitosis. También es frecuente la presencia de eritrocitos nucleados. (19)

El número de reticulocitos suele llegar hasta 20 por 100. En pacientes cuyos eritrocitos adoptan forma de hoz la velocidad de sedimentación no está tan aumentada como suele ocurrir en pacientes con una anemia similar. La estasis prolongada de la sangre venosa disminuye la velocidad de sedimentación porque se produce deformación falciforme. (29)

También es útil el método de la electroforesis (agar-citrato) de la hemoglobina para distinguir muchos pacientes con anemia drepanocítica de los que tienen rasgo falciforme combinado con alguna otra anemia independiente, y de los pacientes que son heterocigotos para dos hemoglobinas anormales. (36) La electroforesis de la hemoglobina constituye el método más útil para distinguir la anemia drepanocítica causada por HbC. (8)

Si no se piensa en el diagnóstico de anemia drepanocítica por HbS, la enfermedad puede considerarse erróneamente fiebre reumática cuando el paciente sufre anemia, molestias articulares, fiebre, agrandamiento cardíaco y soplos en el corazón. (25)

GLOSARIO

A: Adenina

anoxia: Insuficiencia de oxígeno en los tejidos y trastornos funcionales resultantes de la misma.

acebo: Forma de hoja con extremos plegados.

agregación: Unión de varias moléculas (de HbS).

aplasia: Insuficiencia de la médula ósea que se origina por lesión de la célula madre o una expresión anormal de la misma.

asténico: Alto, débil y delgado.

C: Citosina.

delección: Pérdida de material cromosómico. Las delecciones contienen las aberraciones cromosómicas.

disnea: Dificultad para respirar, acortamiento de la respiración.

drepanocitosis: Estado de anemia hemolítica que se caracteriza por la forma de hoz que toman los eritrocitos, puede ser causada por la HbC y HbS.

embastesimiento: Engrosamiento.

esplenomegalia: Agrandamiento y alteración del bazo.

G: Guanina.

hereditario: Relación orgánica entre las sucesivas generaciones, constitución germinal.

heterocigoto: Cuando en un par de genes se encuentran dos alelos distintos, por ejemplo HbAS.

homocigoto: Cuando un par de genes de un organismo presentan dos alelos idénticos, por ejemplo HbSS.

hozi: Forma curva del eritrocito.

hemiplejía: Parálisis de todo un lado del cuerpo.

hemosiderosis: Depósito de hemosiderina en los eritrocitos.

hipostenuria: Estado caracterizado por la emisión de orina poco concentrada cuya densidad se aproxima a 1.010 (da noción de insuficiencia renal)

loci: Lugar ocupado por el gen.

megaloblástica: Estado de anemia hemolítica en donde se localizan eritroblastos primitivos de gran tamaño.

normocítica: Anemia megaloblástica con carencia de Vitamina B12.
No megaloblástica con enfermedad hepática y aumento de reticulocitos.

MstII: Enzima restrictiva utilizada para el diagnóstico de HbS en líquido amniótico.

poiquilocitosis: Variaciones en la forma del eritrocito, recibiendo diferentes nombres según la forma que tengan.
Ejem. ovalocitos y esferocitos.

policromatofilia: Alteraciones en el color del eritrocito; el color varía en diferentes tonos de azul, los cuales son reticulocitos que contienen restos de RNA combinados con hemoglobina.

priapismo: Erección continua y dolorosa del miembro viril. Puede ser originado por lesión del pene, alteración nerviosa o congestión prostática.

transición: Alteración de bases de la cadena de DNA, ya sea una púrica por púrica ó pirimidica por pirimidica.

transversión: Alteración de bases de la cadena de DNA pero solo púricas por pirimidicas o viceversa.

1.0 INTRODUCCION

La sangre es un fluido biológico muy importante en el ser humano, a través del tiempo su estudio nos ha llevado a conocer sus características normales, así como las funciones que desempeña en el organismo y con ello la estandarización de métodos y técnicas que nos faciliten su estudio.(53)

Para el estudiante de química clínica es el fluido que más evidencias muestra sobre el estado general de los pacientes, por lo que cualquier tipo de alteración que presente es de suma importancia.(18)

El eritrocito es la célula mas abundante de este fluido y es por ello que es objeto de nuestro estudio; específicamente su molécula constitutiva denominada hemoglobina, la cual es la encargada del transporte de oxígeno y bióxido de carbono a todo el cuerpo.(3)

Conforme la concentración de hemoglobina desciende por debajo de la norma funcional para el individuo, hay una disminución proporcional de la capacidad máxima de transporte de oxígeno, conduciendo a una determinada anemia, (HbS).(53)

En la anemia, esto puede reflejarse con un ligero aumento en la sudación, palpitación y disnea. Una disminución en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno se ve en ciertas sustituciones de aminoácidos en las cadenas de globina; siendo el caso de la anemia drepanocítica.

Esta enfermedad molecular es el resultado de la alteración de la secuencia de aminoácidos que forman a dos de las cadenas constituyentes de la proteína de la hemoglobina; esto es; en la cadena β se observa la sustitución de ácido glutámico en la posición 6 por valina siendo el resto de la molécula polipeptídica normal.(18)

Este tipo de alteración en la hemoglobina (hemoglobinopatía) concretamente de la cadena β puede presentarse genéticamente en forma homocigótica o heterocigótica.(46)

Generalmente en la hemoglobinopatía β -heterocigótica la hemoglobina anormal está presente junto con la normal (HbAS), normalmente esto es denominado, rasgo drepanocítico, la cantidad de la hemoglobina normal supera a la Hb anormal presente ya que las cadenas β anormales se producen más lentamente y por la destrucción selectiva precoz de hematies anormales;(19) en la hemoglobinopatía β -homocigótica están presentes los dos genes alelicos de las cadenas anormales de manera que no se producen cadenas β normales (HbSS); lo que origina una anemia hemolítica crónica de gravedad, la cual consiste en una drepanocitosis; en tensiones fisiológicas de oxígeno.(48)

La anemia drepanocítica acarrea consigo una serie de complicaciones en el paciente; entre ellas podemos citar las que se presentan a nivel de los huesos. Lo anterior se comprueba en un estudio con 2590 pacientes entre la edad de 5 y 6 años, dicho estudio revela que una osteonecrosis de la cabeza del hueso

femoral es común en pacientes con dicha anemia, ya que el resultado que se obtuvo fue, que de cada 100 pacientes con HbSS 98 presentaron esta complicación.(36)

No todo es complicación en la anemia en estudio, algo verdaderamente interesante, es el caso de la protección que se adquiere contra la infección de plasmodium falciparum y plasmodium malariae en niños con HbSS.(56 y 16)

Finalmente; la justificación del presente trabajo, es aportar al estudiante de química clínica una fuente de información acerca de una de tantas alteraciones que puede sufrir el eritrocito humano y en especial su molécula constitutiva hemoglobina.

Los aspectos genéticos, químicos, diagnósticos y clínicos del padecimiento originado por la hemoglobina S, ofrece al lector un buen panorama de la enfermedad que esta afectando seriamente (muerte) a individuos de raza negra de Africa y Estados Unidos; y que no por ser una alteración propia de la raza antes mencionada, deja de ser importante para la demas población en general, dado su característica de herencia que presenta.

2.0 OBJETIVOS

- Comparar las características físicas y químicas de la hemoglobina normal (HbA) con la Hemoglobina S (HbS).
- Establecer la posible relación entre la HbS y alguna alteración genética.
- Describir el tipo de herencia que rige el trastorno de la HbS.
- Conocer algunas de las manifestaciones clínicas que causa la presencia de HbS en los pacientes.
- Conocer las técnicas más usadas para el diagnóstico de la enfermedad causada por la HbS.
- Dar un panorama general acerca de la terapia más empleada para la hemoglobinopatía S.

3.0 HEMOGLOBINAS NORMALES

La sangre es un fluido de vital importancia para el organismo, esta compuesto principalmente de plasma, leucocitos, plaquetas y eritrocitos, éstas últimas células son (en su forma madura) discos biconcavos con un diámetro promedio de 8μ , un espesor de 2μ y un volumen de 90μ . Están constituidas por una estructura llamada citoesqueleto, el cual está compuesto por las proteínas espectrina y glucoforina, (25); además de éstas proteínas heterogéneas existe una capa bilaminar llamada membrana eritrocítica compuesta químicamente por carbohidratos (10%), lípidos (40%) y proteínas (50%).

Además de está membrana, el eritrocito contiene una molécula llamada hemoglobina. (18)

La hemoglobina es un compuesto de porfirina-hierro (II)-proteína y dá a la sangre su característico color rojo. (19)

Esta hemoglobina, componente principal de los glóbulos rojos (33%), es una proteína conjugada que sirve de vehículo para el transporte de oxígeno y de CO_2 . (18)

El organismo de un hombre contiene casi aproximadamente 1 Kg de está sustancia, estando virtualmente toda ella en los eritrocitos, en los que se encuentra en solución prácticamente saturada, (13) transportando alrededor de 1.34 ml de oxígeno molecular por molécula de hemoglobina. (25)

En otras palabras cada 600g. de hemoglobina, es capaz de

transportar 800 ml de oxígeno. (20)

En una u otra etapa de la vida (desde que inicia la vida embrionaria hasta la adulta) se encuentran en la sangre normal variedades de hemoglobina que contienen 5 distintos tipos de subunidades de globina. Tales variedades se designan con las letras griegas, desde la α hasta la ϵ . Todas ellas constan de 146 aminoácidos (aa) excepto la variedad α que tiene 141 aa. El componente más importante de la hemoglobina normal del adulto tiene una globina con una fórmula $\alpha_2\beta_2$. Las diferentes subunidades ocurren habitualmente en combinaciones de las que resultan 5 tipos de hemoglobinas normales, designadas Gower-1, ϵ_4 ; Gower-2 $\alpha_2\epsilon_2$; hemoglobina fetal (HbF), $\alpha_2\gamma_2$; hemoglobina A₂ (HbA₂), $\alpha_2\delta_2$; y hemoglobina A (HbA), $\alpha_2\beta_2$. (19)

La proporción de estas hemoglobinas normales en la sangre cambia rápidamente desde los primeros meses de la vida fetal hasta la edad de aproximadamente de un año, tal como se representa en la tabla 3.1

Tabla 3.1 Hemoglobinas humanas normales.

CLASE	NOMBRE	FORMULA DE LAS SUBUNIDADES	EDAD EN QUE SE ENCUENTRA PRESENTE
Hemoglobinas embrionarias	Gover 1 Gover 2	$\epsilon 4$ $\alpha 2\epsilon 2$	Predomina en los primeros dos meses; desaparece después del tercer mes de gestación.
Hemoglobinas fetales	HbF	$\alpha 2\gamma 2$	Predomina en la vida fetal; declina rápidamente después del nacimiento, menos del 2.0% durante el resto de la vida
Hemoglobinas adultas	HbA HbA2	$\alpha 2\beta 2$ $\alpha 2\delta 2$	Detectable ya al comienzo de la gestación; predomina en el postparto. Aparece al final de la vida fetal.

HEMOGLOBINA A

La hemoglobina A es la más importante de las hemoglobinas del adulto normal. Encontrándose un 10% del total entre las 20 y las 35 semanas en la vida prenatal y del 15 al 40% en el momento del parto. Las cadenas de polipéptidos de la parte globínica que forman la molécula son: dos alfa cada una con 141 aminoácidos y dos cadenas beta, también idénticas entre sí con 146 aminoácidos cada una. Cada cadena está ligada a un grupo hem.

(Cabe mencionar que la porción porfirínica de la hemoglobina es la protoporfirina IX (tipo III); la cual combinada con el Fe(II) constituye el hemo) (23)

La molécula es elipsoidal con los cuatro grupos hem en su superficie, donde funcionan combinándose reversiblemente con oxígeno o dióxido de carbono. (18)

HEMOGLOBINA F

Es la hemoglobina principal del feto y del recién nacido. La afinidad aumentada para el oxígeno de la sangre fetal con respecto a la hemoglobina A no se debe a la hemoglobina en sí, sino probablemente al medio ambiente de los hematíes. Las dos cadenas

alfa son idénticas a las de la Hb A, y las dos cadenas gamma, con 146 aminoácidos residuales, difieren de la cadena beta. Durante la vida fetal predomina la Hb F ya que la producción de la cadena alfa y de la cadena gamma es alta. La mayor producción de la cadena β empieza antes de las 20 semanas de la vida prenatal.

Después del nacimiento se producen cantidades más pequeñas de HbF. A los seis meses la HbF suele constituir 1% ó menos de la Hb total. (20) Ver Tab I.1.

HEMOGLOBINA A_2

La Hb A_2 constituye del 1.5 al 3.5 % de la Hb del adulto normal.

Sus dos cadenas alfa son iguales que en la HbA y la HbF, sus dos cadenas delta difieren de la cadena beta en solo 8 de sus 146 aminoácidos. La síntesis de cadena delta se inicia tarde en la vida fetal y se produce solo en normoblastos (no reticulocitos).

El nivel de A_2 aumenta de forma gradual durante el primer año de vida, período en que se consigue el nivel de adulto. (2)
Ver fig. 3.2

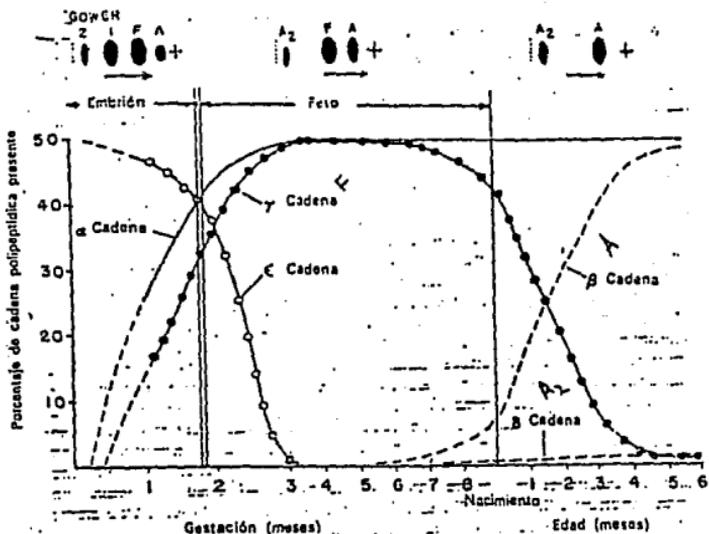


Fig. 3.2 Proporción de diversas cadenas polipeptídicas de la hemoglobina humana normal en las primeras etapas de la vida. Diagramas electroforéticos a pH 8.6, típicos de los tres periodos, en la parte superior de la figura. (53)

3.1 SÍNTESIS DE HEMOGLOBINAS NORMALES

El eritrocito es una de un número de especies celulares que provienen de células primordio (células capaces de generar una clona autosuficiente). (29)

Su presencia se demuestra por el desarrollo de clonas de tejido hematoyético parecidas a islotes en el bazo de un animal receptor transfundido con médula ósea cuya propia médula ha sido extirpada por radiación, cada clona es la progenie de una célula primordio única. (19) Habitualmente en reposo, la célula

pluripotencial constituye una reserva generadora de células que puede responder a un empobrecimiento de células primordio comprometidas.

La célula primordio unipotencial o comprometida, todavía no reconoce desde el punto de vista morfológico, normalmente es parte de una confluencia precursora autopetpetuante y específica para cada línea celular. (monocítica-granulocítica, megacariocítica y eritrocítica).

El primer antecesor reconocible de la serie eritroide es una gran célula inmadura que tiene un volumen aproximado de $800\mu\text{s}$. La secuencia del desarrollo implica varias mitosis, terminando en un eritrocito sin núcleo cargado de hemoglobina, y de aproximadamente $90\mu\text{s}$. (18)

Presumiblemente, una elevación logarítmica en el número de células ocurre en cada etapa de desarrollo hasta que el normoblasto termina, sin embargo no se puede relacionar cada nivel de mitosis con una etapa morfológica específica de desarrollo debido a la continuidad de la maduración citoplásmica y a las diferencias en el aspecto nuclear impuesto por la fase del ciclo mitótico. (20)

Para caracterizar las etapas de desarrollo del eritrocito y proporcionar una base para la localización de anomalías es conveniente dividir los eritrocitos nucleados en : A) forma temprana, B) formas intermedias y C) formas tardías. Las formas tempranas, (pronormoblastos y normoblastos basófilos) en frotis sanguíneo con tinción de Wright tienen aspecto de células grandes

con citoplasma pálido azul oscuro. La cromatina nuclear está ligeramente aglutinada y es más densa que en las series de leucocitos en etapas correspondientes de maduración; los nucleólos están parcialmente ocultos por la cromatina densa.(25)

La etapa intermedia de desarrollo se caracteriza por un núcleo compacto y la presencia de hemoglobina en el citoplasma. EL color del citoplasma fluctúa de azul a gris (normoblasto policromático) según la cantidad de hemoglobina presente.

En la etapa tardía de maduración, el núcleo se vuelve progresivamente más pequeño y, poco antes de su expulsión es una masa picnótica sin estructura. La proporción numérica de los normoblastos temprano, intermedio y tardío, es aproximadamente de 1:4:4. El citoplasma de la célula no nucleada que entonces queda (reticulocito medular) muestra una red teñida de azul (el RNA precipitado retículo) después del tratamiento con un colorante supravital como el nuevo azul de metileno. Esta célula sigue sintetizando hemoglobina pero en una proporción menor, ya que pierde RNA y mitocondrias y disminuye progresivamente su tamaño.

Cuando finalmente entra en circulación, al penetrar la pared sinusoidal, el reticulocito normal es indistinguible del eritrocito adulto en tamaño y color, pero todavía es demostrable una pequeña cantidad de RNA residual por tinción supravital.(20)

La hemoglobina es sintetizada a través de gran parte del proceso de maduración del eritrocito, produciéndose aproximadamente 65% antes que el núcleo sea expulsado y 35% en la etapa de reticulocito.

La producción de hemoglobina normal depende de un aporte adecuado de hierro, así como de la síntesis de protoporfirina y globinas. El hierro es liberado por la proteína de transporte específico, transferrina, en la membrana de la célula inmadura donde el hierro es fijado y la transferrina regresa al plasma. La mayor parte del hierro que entra a la célula está destinado a la síntesis de hemoglobina y llega a la mitocondria donde es introducido en el anillo de protoporfirina para formar el hemo. Cierta exceso de hierro se acumula conforme la ferritina se agrega al citoplasma del eritrocito inmaduro, donde puede demostrarse en forma de uno o más puntos azules por tinción de azul de prusia. La cantidad de depósito de hierro no incluido en el hemo depende de la proporción entre el valor de hierro plasmático y el hierro requerido por la célula para la síntesis de hemoglobina. (53)

La síntesis de porfirina comienza en la mitocondria con la formación de ácido deltaaminolevulinico (AAL) y continúa en el citoplasma con la combinación de dos moléculas de AAL para formar porfobilinógeno (PBG). Cuatro moléculas de PBG son convertidas en uroporfirinógeno y coproporfirinógeno. Los pasos finales, llevados a cabo en la mitocondria, incluyen la formación de protoporfirinas y la incorporación de hierro para formar hemo. El paso limitativo más importante en esta vía es la conversión de succinato y glicina a ácido deltaaminolevulinico, una reacción catalizada por la sintetasa del AAL. la actividad de esta enzima es influida por la eritropoyetina y por la presencia del cofactor fosfato de piridoxal. (22)

Las cadenas polipeptídicas de la globina son producidas en los ribosomas citoplasmáticos específicos de la célula. La cadena α se une con una de las otras tres cadenas para formar un dímero y finalmente un tetrámero. La síntesis normal de cadenas polipeptídicas y sus tetrámeros respectivos se representan en la Tabla 3.3 Mientras que la cadena γ polipeptídica es de importancia funcional durante el desarrollo fetal, su persistencia en la etapa postnatal implica un trastorno genético en la producción de la hemoglobina A.

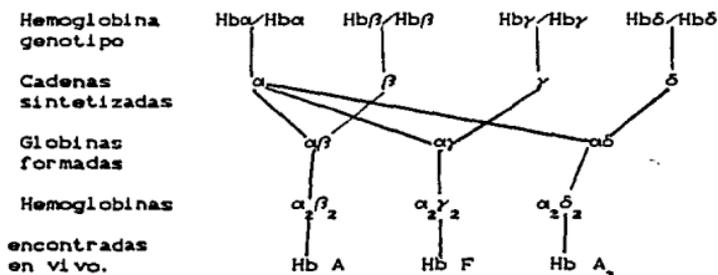


Tabla 3.3 Formación de hemoglobinas normales (20)

La síntesis de globina está en alto grado coordinada con la síntesis de porfirina. Cuando la síntesis de globina está alterada, la síntesis de protoporfirina está correspondientemente reducida. Similarmente, cuando la síntesis de porfirina está alterada, no se produce exceso de globina. Sin embargo, no hay tal

regulación de la absorción de hierro cuando hay alteración de la síntesis de protoporfirina o de globina. Cuando la producción de globina es deficiente, el hierro se acumula en el citoplasma de los eritrocitos en desarrollo, conforme se agrega ferritina. Tales células contienen de 2 a 10 partículas teñidas de hierro y se denominan sideroblastos de ferritina. Cuando la síntesis de porfirina está alterada, se incrusta hierro en las mitocondrias y aproximadamente de 10 a 20 gránulos pequeños teñidos de hierro son visibles alrededor del núcleo del eritrocito en desarrollo. Tal célula se denomina sideroblasto mitocondrial o anular.

La diferencia estructural de estos depósitos de hierro es aparente en el microscopio electrónico.(31)

3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS HEMOGLOBINAS NORMALES

(HbA, HbF Y HbA₂).

Las moléculas de la hemoglobina humana están constituidas por 4 cadenas polipeptídicas llamadas globinas. Estos polipéptidos están formados por 146 aminoácidos (cadenas β , γ , y δ) exceptuando la variedad α que tiene 141 aminoácidos.(18)

Una globina normal debe contener como base una cadena α a la cual se le pueden unir ya sea una cadena β , δ o γ ; para formar una HbA, HbA₂ o HbF respectivamente. La cadena α es única y la misma para todas las variantes de la hemoglobina a excepción de la variante Gower 1 que posee 4 cadenas α .(3)

La diferencia principal existente entre las variantes de la hemoglobina radica en la secuencia de sus aminoácidos, lo que les confiere propiedades diferentes; según el desarrollo y requerimientos del organismo.

Dado que la concentración de la hemoglobina A es mayor que las demás hemoglobinas normales, se puede afirmar que en esta radica la más importante de las funciones bioquímicas del organismo. El transporte de oxígeno .(22)

Además de que en dicha hemoglobina se concentra la mayor parte de las alteraciones importantes que pueden ocasionar una hemoglobinopatía, resultaría interesante conocer detenidamente su secuencia de aminoácidos para poder así valorar el daño que una sustitución podría ocasionar. Ver Fig. 3.4

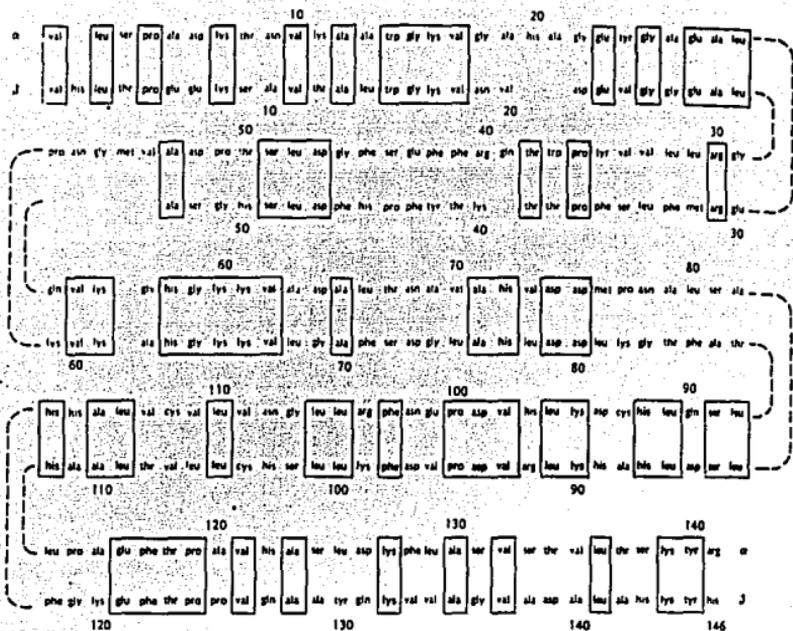


Fig. 3.4. Estructura química de la globina de la HbA. En la hemoglobina humana se enumera en forma secuencial las posiciones de los aminoácidos desde el extremo N-terminal, y aquellos aminoácidos que se encuentran subrayados ocupan la misma posición relativa en ambas cadenas. La notable homología entre estas dos cadenas (casi la mitad de cada secuencia está ocupada por los mismos aminoácidos en las mismas posiciones) indican una relación evolutiva entre ellas. Es decir, muy probablemente hubo un gen ancestral común tipo hemoglobina que sufrió duplicación, y cada uno de los genes resultantes evolucionó por mutación para formar las cadenas α y β que se observan en la actualidad. (46)

Cada polipéptido está unido a un grupo prostético hemo que contiene cada uno un átomo de hierro en su forma ferrosa. Cada grupo hemo se localiza en una determinada zona de una de las cadenas de polipéptidos; cerca de la superficie de la molécula, el hemo se combina de forma reversible con una molécula de oxígeno o bióxido de carbono. (23)

3.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA HbA

Las hemoproteínas, esto es, proteínas conjugadas que poseen grupos prostéticos de ferroporfirina, tienen una acción directa o indirecta en lo que se refiere a facilitar la reacción que es la base de prácticamente toda la bioenergética: unión de oxígeno e hidrógeno para formar agua. La importancia vital de las hemoproteínas puede ilustrarse por este hecho: la inhibición del sistema de transporte de oxígeno (hemoglobina) por el monóxido de carbono, o la inhibición del sistema de utilización de oxígeno (citocromo) por el cianuro, originan con rapidez la muerte del organismo. (5)

La hemoglobina es la primera proteína oligomérica cuyas estructuras terciarias y cuaternarias fueron conocidas gracias al análisis por rayos X. Este logro, conseguido por M.F. Perutz y sus colaboradores en Inglaterra, fue la culminación de 25 años de estudio detallado sobre esta importante proteína. (26)

Para comprender el transporte de gases, O_2 y CO_2 por parte de la hemoglobina A es indispensable conocer sus aspectos químicos y físicos. En relación con ello, puede ser útil considerar alternadamente ambos aspectos. (5)

La hemoglobina A posee un peso molecular de 68 000d, contiene 2 cadenas α (141 restos) y 2 cadenas β (146 restos). (25)

Los estudios con difracción de rayos X indican que la hemoglobina tiene forma casi esférica y dimensiones de 50h, 55w y 64l Å. Las 4 unidades peptídicas de la molécula adoptan una configuración tetraédrica, además de que pueden subdividirse ulteriormente en pares, cuyos miembros poseen composición química idéntica. (6) Cada cadena tiene una conformación irregularmente plegada, en la que ciertos tramos de regiones helicoidales α , puras se encuentran separadas por curvaturas. Las cadenas α y β poseen alrededor de un 70% de carácter helicoidal. Una por una de las cadenas de la hemoglobina A se hallan unidas a un resto hemo mediante enlace no-covalente. La molécula se estudió en su forma oxigenada, la cual posee una estructura esferoidal compacta, cuyas dimensiones son 6.4 x 5.5 x 5.0 nm.

Resulta de especial interés la localización de los 4 grupos hemo, uno en cada subunidad, que unen las 4 moléculas de oxígeno.

Estos grupos hemo son moléculas planas en las cuales los átomos de hierro forman complejos de coordinación planares cuadrados y se hallan muy separados unos de otros y situados a diferentes ángulos relativos. (7)

En el hemo, un átomo de hierro es sostenido por átomos de nitrógeno que forman parte de una estructura más grande conocida como anillo de porfirina. (20) Ver fig 3.5

Las porfirinas son compuestos cíclicos constituidos de cuatro unidades de pirrol unidas por puentes metálicos (-CH=). Las porfirinas pueden considerarse derivadas de la porfirina, tetrapirrol cíclico que no posee cadenas laterales sustituyentes.

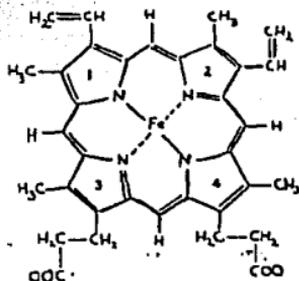


Fig 3.5 Grupo hemo de la hemoglobina contiene átomo de hierro (Fe) dentro de un anillo de porfirina. El anillo porfirínico consiste en cuatro anillos que contienen nitrógeno y aparecen numerados en el diagrama. Cada grupo hemo está unido a una larga cadena polipeptídica que lo envuelve. La molécula de oxígeno es retenida en plano contra el hemo. (5)

El precursor biológico de las porfirinas es un monopirrol con cadenas laterales de ácido acético y propiónico : el porbilitinógeno. Ver fig.3.6

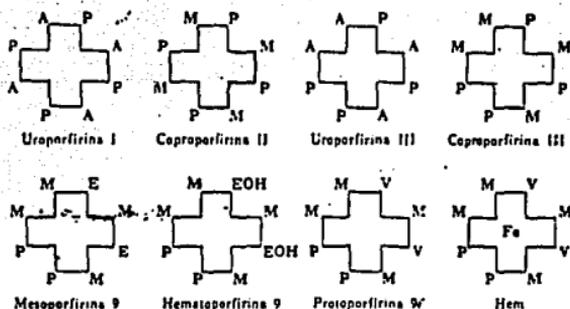


Fig. 3.6 Porphirinas naturales.

Cabe considerar que la mesoporfirina IX deriva de la coproporfirina III por dextracarboxilación de los dos grupos del ácido propiónico. En cuanto a la mesoporfirina IX, la conversión de los dos grupos etilo en hidroxietilo origina hematoporfirina IX. La deshidratación de los grupos hidroxietilo produce protoporfirina IX, la porfirina básica de las hemoproteínas. Por ejemplo: la introducción de un átomo de hierro en la protoporfirina IX origina el hem, grupo prostético de la hemoglobina y, en realidad, de casi todas las hemoproteínas. (5)

Con lo que respecta a las propiedades físicas de las porfirinas se tiene que poseen espectros de absorción característicos, la absorción de la luz en el extremo violeta del espectro es muy intensa, por lo cual los compuestos son rojos. La solución de porfirina en disolventes orgánicos o en ácidos minerales presenta fluorescencia roja con los rayos ultravioleta; esta facultad se aprovecha para la estimación cualitativa y cuantitativa de las sustancias. En general, las

porfirinas son más fácilmente solubles en algunos disolventes orgánicos que en agua. Las que poseen muchos grupos carboxilo son menos solubles en disolventes orgánicos y más solubles en agua. A causa del distinto número de grupos carboxilo de las diversas porfirinas, pueden efectuarse extracciones diferenciales a partir de los disolventes orgánicos con fases acuosas de pH apropiado. (21)

Por el lado de sus propiedades químicas, las porfirinas, por poseer grupos carboxilo forman sales con facilidad, de las cuales las amoniacáles y las sódicas son las más solubles y las menos solubles en agua respectivamente. Por los nitrógenos pirrólicos y los grupos carboxílicos, las porfirinas naturales son compuestos anfotéricos cuyo punto isoelectrónico está en el pH de 3 a 4.5; por ello, en el pH fisiológico las porfirinas transportan cargas negativas, y es lógico que se unan fácilmente a proteínas básicas (catiónicas en pH neutro) los grupos carboxilo de las porfirinas se esterifican con facilidad; casi todos los métodos de obtención de estas sustancias a partir de fuentes naturales implican la conversión previa a ésteres metílicos. Los átomos del nitrógeno del nucleopirrólico pueden formar complejos con algunos metales, los cuales ocupan posición central en el anillo porfirínico. En estado natural, se combinan con las porfirinas el cobre, cinc y posiblemente otros metales; sin embargo, los complejos férricos tienen la mayor importancia biológica. A su vez, las ferroporfirinas (hemos) se combinan con proteínas, compuestos orgánicos más sencillos y, en algunos casos, con gases. (5)

Por otra parte, con lo que respecta a las características químicas del grupo hemo se tiene que el hierro en forma férrica y ferrosa tiende a formar complejos de coordinación hexavalente. La introducción de un ion ferroso en el centro de la protoporfirina IX origina expulsión de los dos protones unidos a los átomos de nitrógeno pirrólico, y formación de un complejo de ferroporfirina que no posee carga eléctrica. (8)

Cada grupo hemo se halla parcialmente envuelto en una bolsa forrada por grupos CHs no polares. El quinto enlace coordinado del átomo de hierro se establece con un nitrógeno imidazólico de un resto de histidina en la fracción globinica; la sexta posición queda disponible para su coordinación con una molécula de oxígeno. Existe una gran cavidad central dentro de la molécula de hemoglobina, forrada con grupos R polares. (26)

PROPIEDADES ACIDOBASICAS. Al igual que ocurre con otras proteínas, los grupos ionizables activos de la hemoglobina en pH fisiológico son principalmente las cadenas laterales imidazólicas de histidina quizá suplementadas en cierto grado por algunos grupos amino terminales. El punto isoeléctrico (pI) de la hemoglobina es de 6.8 poco más o menos, pues varía algo con la concentración de sales en la solución. (8)

A causa de su riqueza en histidina (al rededor de 35 grupos por molécula) y de su alta concentración en la sangre entera, la hemoglobina es un amortiguador muy eficaz. En realidad, es muy probable que de ella dependa la mayor parte de la facultad amortiguadora de la sangre que no resulta del bicarbonato. (5)

En el siguiente apartado se explicaran aspectos especiales de las propiedades de oxigenación y desoxigenación de la hemoglobina.

La importancia fisiológica de la hemoglobina depende principalmente de su facultad de combinarse de manera reversible con el oxígeno. Este elemento es fijado fácilmente en una presión parcial alta (p.ej. en los pulmones) y se desprende con la misma facilidad cuando hay presión baja de oxígeno (p.ej. en los tejidos), lo cual brinda un sistema eficaz para el transporte de oxígeno desde la atmósfera a las células corporales.(29)

El análisis mediante rayos X de la desoxihemoglobina muestra que la estructura terciaria de las 4 cadenas de las subunidades es idéntica a la de la oxihemoglobina, pero existe una variación significativa en su estructura cuaternaria, es decir en el modo como se hallan orientadas las cadenas unas respecto a otras. Mediante desoxigenación, las cadenas α experimentan una rotación de aproximadamente 9° , y las cadenas β de cerca de 7° , pero al rededor de distintos ejes, provocando un cambio en los puntos de contacto entre las cuatro subunidades y la formación de nuevos enlaces iónicos entre ellas. Los dos hemo α se aproximan unos 0.01 nm. y los dos hemo β se separan aproximadamente 0.65 nm. Así la unión de las 4 moléculas de oxígeno, cada una de ellas con un diámetro relativamente pequeño, puede provocar un cambio profundo en la estructura cuaternaria de la hemoglobina.(26)

Si se mantienen constantes la temperatura, la concentración de sales y el pH, el grado de saturación de la hemoglobina por el

oxígeno es función de la presión parcial del gas; al hacer una gráfica con ambas variables, se advierte que tiene forma sigmoidea. Ver fig 3.7

El carácter sigmoidal de la curva de unión del oxígeno de la hemoglobina significa que esta posee una afinidad relativamente baja para captar a la primera o segunda molécula de oxígeno, pero una vez que éstas se han incorporado, la unión de las subsiguientes moléculas de oxígeno resulta muy aumentada. Inversamente, la pérdida de una molécula de oxígeno de la hemoglobina completamente oxigenada, provoca que el resto se disocie más fácilmente cuando desciende la presión de oxígeno. La porción del equilibrio hemoglobina-oxígeno se ve también afectada por el pH. Cuanto mayor es el pH de la disolución de hemoglobina a una determinada presión parcial de oxígeno, mayor es el porcentaje de su saturación con oxígeno. (26)

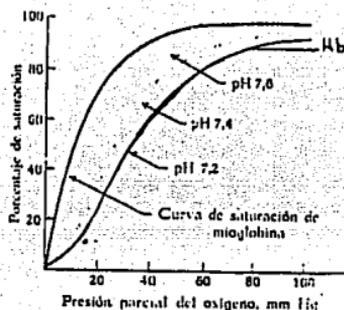


Fig 3.7 Curvas de saturación de oxígeno de la hemoglobina y de la mioglobina. La curva de saturación sigmoide de la hemoglobina y su respuesta al cambio de pH permiten a la hemoglobina saturarse casi completamente en los pulmones (presión parcial 100mm Hg y pH 7.4) y liberar casi un 30% de su oxígeno en los tejidos (presión parcial 45mm Hg y pH 7.2) La mioglobina, cuya curva de saturación de oxígeno es una hipérbola rectangular permitiría solamente la liberación del 2 al 3 % de oxígeno en la mismas condiciones. En los eritrocitos humanos el metabolito 2,3-difosfoglicerato se halla estrechamente unido a la hemoglobina pero solamente de un modo muy débil a la oxihemoglobina. Este ligando ejerce el efecto de facilitar además la liberación del oxígeno al disminuir la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El 2,3-difosfoglicerato actúa, por tanto como modulador de la actividad de la hemoglobina en el transporte de oxígeno. (28)

Este efecto reversible es debido a que cuando la hemoglobina se oxigena, queda ionizada y deja libre un protón por cada molécula de oxígeno unida de acuerdo con la ecuación siguiente:



en la que Hb es una subunidad que posee protones de una molécula de desoxihemoglobina. Puesto que esta reacción libremente reversible, el incremento de la concentración de ion-hidrógeno provocará el desplazamiento del equilibrio a la izquierda, hacia un descenso de saturación, mientras que la disminución de la concentración de hidrógeno provocará que el equilibrio se desplace a la derecha esto es, hacia un incremento de la saturación. La presión parcial de oxígeno y el pH son los dos factores más importantes que regulan la función de la hemoglobina en el transporte de oxígeno. En los pulmones donde la presión parcial de oxígeno y el pH son relativamente altos, la hemoglobina tiende a hallarse saturada al máximo con el oxígeno, alrededor del 96%.

En cambio en el interior de los tejidos periféricos, donde la tensión de oxígeno es baja y el pH también es pequeño (debido a la elevada concentración de CO₂ formado como producto final de la respiración) la hemoglobina une al oxígeno menos fuertemente, y de este modo, descarga algo de su oxígeno que cede a la masa de células en respiración hasta una saturación por parte de la hemoglobina de un 65% aproximadamente. Así que la hemoglobina, en su función de transportadora del oxígeno, obedece a un ciclo de entre 65 y el 96 % de saturación. (23)

Finalmente, las demás hemoglobinas normales; HbF, HbA₂ y Hb_c, se saturan de oxígeno de manera semejante a la HbA, todas cumpliendo el objetivo pero variando su concentración en cada etapa de la vida del individuo.

4.0 GENERALIDADES DE ANEMIA DREPANOCITICA

En las hemoglobinopatías, la estructura de uno de los cuatro tipos de cadenas polipeptídicas formadas es anormal, lo que se debe casi siempre a la sustitución de un solo aminoácido.

Si se hiciera un cálculo para determinar la cantidad de variantes de la hemoglobina humana se llegaría a un total de 11001 variantes; esto es; dado que la cadena α con 141 aminoácidos que la forman y teniendo la posibilidad de ser sustituido cada uno de los aminoácidos 19 veces (por el grupo básico de a.a.) entonces multiplicando los 141 aminoácidos por 19 posibilidades de sustitución se tendría como resultado 2679 posibles variantes de la cadena α solamente. (46)

Ahora bien, sabiendo que la cadena β , γ , y δ están formadas por 146 aminoácidos cada una. (y realizando los mismos cálculos que en la cadena α) se tiene que multiplicando los 146 aminoácidos que forman a cada cadena por las correspondientes 19 posibilidades de sustitución, se obtiene 2774 posibles variantes de cada cadena, y si se toma en cuenta que son 3 las cadenas, se tiene que el total de variantes de las cadenas α , β , y γ serían 8322 y finalmente sumando el total de variantes de la cadena α y el resultado anterior se tendría la cantidad total probable de variantes de la hemoglobina. (Hemoglobinopatías) el cual sería 11001. (22)

Hasta la fecha(1993) se han identificado en el hombre 560 hemoglobinas anormales, de las cuales 303 son debidas por variantes en los aminoácidos de la cadena β , 172 por variantes en la cadena α , 61 por variantes en la cadena γ y 24 por la cadena δ .(22)

En la enfermedad está afectada clinicamente en forma significativa la cadena α o β . Casos de afectación de la cadena γ y δ , son inadvertidos por la pequeña cantidad de hemoglobina afectada muchas veces no se detectan y raras veces tienen importancia clinica. Dependiendo del tipo de aminoácido y del sitio que estan implicados, la función de la hemoglobina puede ser anormal y tener sus propiedades físicas y químicas alteradas. (2) Las de mayor importancia clinica son las denominadas HbS, HbC, HbD y HbE.(2) Ver Tab. 4.1

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. (27)

En otras palabras. En las hemoglobinopatías β homocigóticas, estan presentes los dos genes alélicos de la cadena β anormales de manera que no se producen ninguna cadena β normal (y, por tanto

ninguna HbA). Ejemplos de esto son la anemia drepanocítica (HbSS) y la enfermedad por hemoglobina C (HbCC). Dado que los dos genes para α , γ , y δ C y la producción de las cadena β son normales, la HbF y la HbA₂ formadas tienen una estructura normal, aunque puede haber un aumento en la cantidad. No se han descrito hemoglobinopatías α homocigóticas. (12)

En las hemoglobinopatías β heterocigóticas, la hemoglobina anormal está presente junto a la HbA; también, la HbF y la HbA₂ tienen una estructura normal ya que sólo algunas de las cadenas β son anormales. Ejemplos de esto son el rasgo drepanocítico (HbAS) y el rasgo de la hemoglobina C (HbAC). La HbA normal supera en cantidad la hemoglobina normal presente, debido a una producción más lenta de cadena β anormales que de cadena β normales, destrucción selectiva precoz de los hematíes con concentraciones más altas de hemoglobina anormal o eliminación selectiva de la hemoglobina anormal de la célula. (29)

La anemia drepanocítica, una de las enfermedades de la sangre descrita a principios de este siglo, da lugar a un gran cambio en la forma redonda normal de los glóbulos rojos a una forma de hoz. Este cambio es especialmente visible cuando la concentración de oxígeno disminuye en el torrente circulatorio a grandes altitudes o incluso a bajas altitudes en el sistema circulatorio periférico. El defecto en la anemia drepanocítica yace en el remplazo de HbA por HbS en los eritrocitos. La hemoglobina del drepanocito tiene una valina en lugar del ácido glutámico en el

sexto residuo de aminoácido de la cadena β en la molécula de la globina (40) Los individuos afectados pueden presentar diversas anomalías; muchas de las cuales dan lugar a manifestaciones clínicas graves y a la muerte.

Sin embargo no todos los individuos se ven afectados en el mismo grado, algunos solo presentan moderada falcemia (rasgo falciforme) y otros la presentan muy declarada (anemia drepanocítica). (45)

La enfermedad homocigótica (HbS) es una anemia hemolítica crónica cuya gravedad aumenta progresivamente desde la temprana infancia y que suele ser fatal antes de la edad de 30 años. Sin embargo, con los modernos cuidados médicos, muchos pacientes viven más tiempo. La hemoglobinopatía S se encuentra casi exclusivamente en la población de raza negra del continente Africano y Asiático. Por otra parte Estados Unidos presenta de 0.1% a 0.2% de individuos de raza negra portadores de HbS. (37). Estudios recientes han demostrado que este tipo de anemia se ha extendido a países como los son: Italia y Rusia. (48)

Con lo que respecta al rasgo drepanocítico (HbAS) se dice que la drepanocitemia es la hemoglobinopatía más frecuente en América.

En circunstancias normales no hay signos clínicos de enfermedad ni anomalías hematológicas. Esta enfermedad protege al individuo de los efectos letales del plasmodium falciparum, lo que puede explicar la mayor distribución de la hemoglobina S en América central.

4.1 DEFINICION E HISTORIA

La anemia drepanocítica o bien hemoglobinopatía S es una anemia hemolítica producida por la homocigosis de los genes de los hematíes falciformes. Se encuentra casi exclusivamente en individuos de raza negra y se caracteriza clínicamente por dolores en las articulaciones y úlceras en las piernas. Los eritrocitos asumen, frecuentemente, la forma de hoz. (53)

La historia de la Hemoglobinopatía S es excepcional. Se podría decir que dicha hemoglobinopatía es una de las enfermedades con una amplia gama genética clínica que se viene observando a través de la historia. (18)

En 1910, La presencia de hematíes falciformes en la sangre de negros anémicos fué señalada por primera vez por J.B. Herrick médico de Chicago.

También en este año Emmel efectuó un ensayo in vitro y demostró que se formaban células en hoz cuando la sangre encerrada herméticamente bajo vidrio, se conservaba varios días a temperatura ambiente. Hahn y Gillespre demostraron que la transformación de hematíes a forma de hoz se efectuaba cuando la tensión del oxígeno desciende por debajo de 45 mm Hg. (53)

En 1927, El fenómeno de falciformidad apareció, hereditariamente, rasgo autosómico dominante.

En 1945, William Castle mencionó al químico Linus Pauling que los eritrocitos en la sangre desoxigenada, procedente de individuos

con anemia drepanocítica, tomaban la forma de hoz y mostraban luego birrefringencia en luz polarizada. (46)

En 1949, Neel y Beut independientemente, propusieron la hipótesis de que la falcemia estaba originada por un solo gen mutante, que se encontraba en heterocigosis en los individuos con el carácter falciforme y en homocigosis en los individuos con la anemia falciforme.

Pauling, Itano, Singer y Wells observaron que las hemoglobinas de los individuos normales y con anemia falciforme diferían significativamente cuando se les situaba en una solución en un campo cargado eléctricamente. Ambos tipos de hemoglobina migraban debido a las cargas eléctricas de cada una, pero, a determinada acidez de la solución, la hemoglobina de los individuos con anemia falciforme migraba en la dirección opuesta a la de los individuos normales. (53)

En 1957, Ingram aclaró el defecto bioquímico exacto existente en la anemia por drepanocitosis, maceró hemoglobina con tripsina y separó los péptidos resultantes por electroforesis y cromatografía. Esta técnica demostró que uno de los productos de la maceración tripsínica de la hemoglobina de la drepanocitosis, migraba en forma diferente a la de la hemoglobina normal. La determinación de la secuencia de los aminoácidos de éste polipéptido indicó que la anemia de la drepanocitosis era el resultado de la sustitución del ácido glutámico, el sexto aminoácido desde la terminal N de la cadena, por valina. (51)

En 1971. Se presenta un verdadero reconocimiento de la importancia de la enfermedad en E.U. dado que personas de raza negra entre mayoría gente joven llegaban a morir por la anemia de células en hoz.

I. Homocigóticas: Polimorfismo de hemoglobina, variantes más comunes.

HbS	$\alpha_2\beta_2$ 6 Val	Anemia hemolítica grave; icteriforme
HbC	$\alpha_2\beta_2$ 6 Lys	Anemia hemolítica leve
HbD-Punjab	$\alpha_2\beta_2$ 101 Glu	Anemia ausente
HbE	$\alpha_2\beta_2$ 105 Asp	Anemia microcítica leve

II. Heterocigóticas: Variantes de hemoglobina que causan aberraciones funcionales o anemia hemolítica en el estado heterocigótico.

A. Hemoglobinas asociadas con metahemoglobinemia y cianosis.

1. HbM-Boston	α_2 19 Tyr β_2	3. HbM-Saskatoon	$\alpha_2\beta_2$ 62 Tyr
2. HbM-Iwate	α_2 17 Tyr β_2	4. HbM-Aizuwakes	$\alpha_2\beta_2$ 67 Leu
		5. HbM-Hyde Park	$\alpha_2\beta_2$ 63 Tyr

B. Hemoglobinas asociadas con alteración de la afinidad para el oxígeno.

1. Afinidad aumentada y policitrosis.

a) Hb Chesapeake	α_2 102 Glu
b) Hb J. Capetown	α_2 112 Glu β_2
c) Hb Malmo	β_2 67 Glu
d) Hb Yakima	$\alpha_2\beta_2$ 100 Phe
e) Hb Kemp	$\alpha_2\beta_2$ 100 Asp
f) Hb Ypsilanti (Ypsilanti)	$\alpha_2\beta_2$ 60 Tyr
g) Hb Hiroshima	$\alpha_2\beta_2$ 103 Asp
h) Hb Ralzier	$\alpha_2\beta_2$ 107
i) Hb Bethesda	$\alpha_2\beta_2$ 100 Phe

2. Afinidad disminuida: pueden mostrar anemia o cianosis leves.

a) Hb Kansas	α_2 102 Tyr β_2
b) Hb Titusville	α_2 10 Asp β_2
c) Hb Foxworth	$\alpha_2\beta_2$ 61 Ser, Asp
d) Hb Agersø	$\alpha_2\beta_2$ 100 Lys
e) Hb Beth Israel	$\alpha_2\beta_2$ 102 Asp
f) Hb Yoshinaka	$\alpha_2\beta_2$ 100 Asp

C. Hemoglobinas inestables.

1. Hemoglobinas que pueden precipitar en forma de corpuscúlos de Heinz después de la esplenectomía: anemia hemolítica congénita con corpuscúlos de Heinz.

a) Anormalidades de la cadena α :	b) Anormalías de la cadena β :	(delección Glu)
Hb Torino	Hb Leiden	$\alpha_2\beta_2$ 61*
Hb L-Ferrara	Hb Sugi	$\alpha_2\beta_2$ 10 Asp
Hb Hasharon	Hb Freiburg	$\alpha_2\beta_2$ 10
Hb Ann Arbor	Hb Riverdale Droux	$\alpha_2\beta_2$ 11 Leu
Hb Etobicoke	Hb Geneva	$\alpha_2\beta_2$ 11 Phe
Hb Dakar	Hb Tacoma	$\alpha_2\beta_2$ 10 Ser
Hb Bibba	Hb Plutty	$\alpha_2\beta_2$ 10 Phe
	Hb Louisville	$\alpha_2\beta_2$ 10 Leu
	Hb Hammermith	$\alpha_2\beta_2$ 10 Asp
	Hb Zurich	$\alpha_2\beta_2$ 10 Asp
	Hb Toulouse	$\alpha_2\beta_2$ 10 Glu
	Hb Bristol	$\alpha_2\beta_2$ 17 Asp
	Hb Sydney	$\alpha_2\beta_2$ 10 Asp
	Hb Shepherd's Bush	$\alpha_2\beta_2$ 10 Asp
	Hb Seattle	$\alpha_2\beta_2$ 10 Leu
	Hb Boras	$\alpha_2\beta_2$ 10 Asp
	Hb Santa Ana	$\alpha_2\beta_2$ 10 Phe
	Hb Can Hill	$\alpha_2\beta_2$ 10 Asp
	Hb Sabine	$\alpha_2\beta_2$ 11 Phe
	Hb Köln	$\alpha_2\beta_2$ 10 Ser
	Hb Kansas	$\alpha_2\beta_2$ 100 Thr
	Hb Wein	$\alpha_2\beta_2$ 100 Asp
	Hb Olmsted	$\alpha_2\beta_2$ 101 Asp
		(delección 3 aa)

Fig. 4.1 Tabla de hemoglobinas anormales. (19)

4.2 ETIOLOGIA

La anemia drepanocítica (HbS) es debida a la sustitución del ác. glutámico de la posición 6 (sexto aminoácido apartir del aminoácido terminal) por valina, de la cadena β de la hemoglobina A. (51) La anemia es, por tanto, una enfermedad de origen genético; la sustitución del aminoácido es el resultado de una mutación en la molécula del DNA (sustitución de la timina por adenina) que codifica la síntesis de la cadena β de la hemoglobina. (29) Ver figura 4.2

La hemoglobina S o falciforme recibe este nombre porque los eritrocitos que la poseen, en estado desoxigenmado, en lugar de la forma de disco se tornan falciformes, por la insolubilidad de la hemoglobina S desoxigenada, lo cual motiva la formación de tactoides y deformación de eritrocitos. (8)

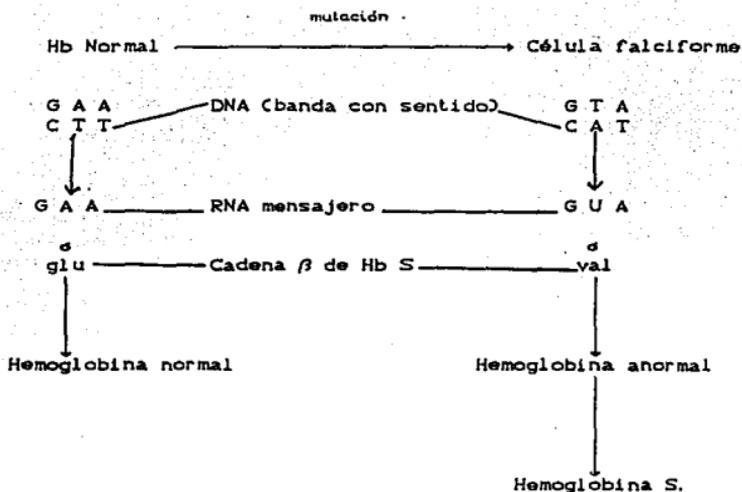


Fig. 4.2 Esquema etiológico de la hemoglobina S. La alteración que origina la hemoglobina S ocurre por una mutación puntual en la segunda base formadora del triplete del DNA siendo el cambio de CTT a CAT, lo que origina una transversión.

5.0 ASPECTOS QUIMICOS DE LA HEMOGLOBINA S

Habiendo llegado a un nivel básico, (con lo que respecta a la causa etiológica de la hemoglobinopatía S) se debe preguntar porqué ésta sustitución del aminoácido provoca la transformación de los hematíes normales en falciformes. Un hecho importante para la reconstrucción de la probable cadena de acontecimientos para la contestación es qué, cuando la cadena β mutada se incluye por la cadena β normal en la molécula $\alpha\beta$ esta toma el nombre de HbS, la cual es menos soluble que la hemoglobina A normal. cuando las tensiones de oxígeno son bajas; presumiblemente debido a que el resto neutro de la valina ha substituido al ácido glutámico cargado. A consecuencia de ello, la conformación del eritrocito cuando las tensiones de oxígeno son bajas tienen forma de hoz (es falciforme) en vez de tener la forma normal de disco, y estas células deformadas son defectuosas en cuanto al transporte de oxígeno. (17) Ver Fig 5.1 y 5.2

Es interesante tener presente (por cuestiones de comparación entre la hemoglobina normal; HbA y la hemoglobina deforme; HbS) que en la hemoglobina A (de manera normal) la unión del oxígeno a uno de los cuatro grupos hemo de la molécula de hemoglobina facilita el enlace del oxígeno a los otros tres.

Así mismo, la presencia de iones H^+ y CO_2 en tejidos metabólicamente activos estimula la separación del oxígeno de la

hemoglobina, que se convierte entonces en "desoxigenada", mientras que la exposición al oxígeno en los capilares pulmonares facilita el desprendimiento de iones H y CO₂ de la hemoglobina que entonces se convierte en "oxigenada".

Este cambio reversible de forma oxigenada a desoxigenada viene acompañado por cambios en la forma de la molécula de la hemoglobina e indica que hay lugares de enlace distintos en los cuales puede unirse los iones de O₂, CO₂ y H (Casi como también la pequeña molécula reguladora 2,3-difosfoglicerato) que dan lugar a cambios significativos en la conformación y función moleculares. (46)

Ahora bien, (como se mencionó anteriormente) en la hemoglobina S los restos del ácido glutámico en la posición 6 de las cadenas β están sustituidos por valina, cambio que provoca que los eritrocitos de los pacientes con anemia falciforme adopten la forma de media luna o de hoz cuando la tensión de oxígeno es baja, mientras que los eritrocitos normales retienen su forma discoidal por desoxigenación.

Estos hechos indican que la conformación de la molécula de la hemoglobina S difiere de la hemoglobina A normal, de tal manera que es el empaquetamiento de las moléculas de la hemoglobina S dentro del eritrocito falciforme el que provoca su cambio de forma durante la desoxigenación (62)



Fig 5.1 Aspecto de los glóbulos rojos con HbA (a)
Aspecto de los glóbulos rojos con HbS (b) (45)



Fig 5.2 Fotomicrografías electrónicas de barrido de:
a) glóbulos rojos que contienen hemoglobina normal y
b) un eritrocito que contiene la hemoglobina anormal
asociada con la anemia drepanocítica. Cuando la con-
centración de oxígeno en la sangre es baja, las mo-
léculas anormales de hemoglobina se adhieren entre
ellas, deformando a los glóbulos rojos.
En consecuencia, éstos no pueden pasar con facilidad
por los capilares. Estos eritrocitos han sido ampli-
ficados unas 7.000 veces.(8)

Estudios realizados por M.D. Rhoda han determinado que la desoxigenación de las células en hoz con Hbs es causada por un incremento en la permeabilidad (entrada) de Ca^{2+} a través de su membrana eritrocítica. Dicho estudio se basó por medio del uso de Nifedipina (anión) el cual se usó como bloqueador del Ca^{2+} . El anión se empleó con el fin de disminuir la desoxigenación causada por el catión en los eritrocitos en hoz. Las células fueron tratadas con $CaCl_2$ con su correspondiente incubación y su adición posterior de Nifedipina. (42) Ver Fig 5.3

Cabe mencionar que se han descrito dos tipos de células en forma de hoz en la drepanocitosis, la primera es ligeramente curvada, en forma de avena, u hoja de acebo que revierte a la forma normal al ser expuesta al oxígeno. La segunda, morfológicamente filamentososa, parece ser irreversiblemente deformada, ya que no recupera la forma normal al ser expuesta al oxígeno. (39)

Lo anterior se afirma con los resultados obtenidos por H. Jones quién trabajó con un tipo de aniones bloqueadores de cationes; los disulfonatos de estilbena. Al tratar las células en hoz SS oxigenadas y desoxigenadas con el anión, ambas células no sufrieron ningún cambio en su morfología deforme. (7) Ver figura 5.4

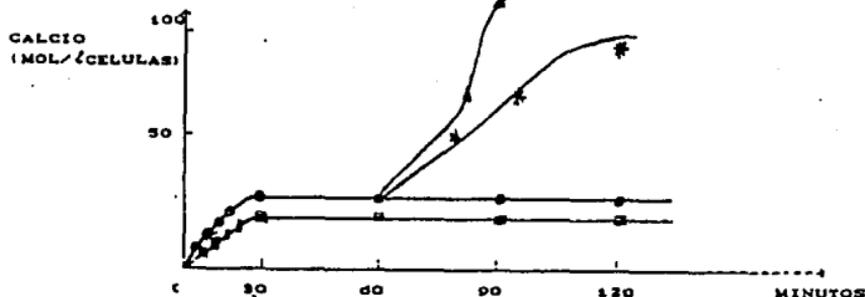


Fig 5.3 Representación gráfica de la cantidad de Ca^{2+} que entra a través de la membrana de eritrocitos en forma de hoj con hemoglobina S en un tiempo determinado. Para demostrar que el flujo inmoderado de Ca^{2+} aumenta la desoxigenación en los eritrocitos S, se utilizaron células SS tanto oxigenadas como desoxigenadas, además de que se adicionó el anión a un par de ellas para determinar la acción bloqueadora del anión y reforzar la afirmación, que a mayor cantidad de calcio mayor desoxigenación.

■ Células SS oxigenadas.

▲ Células SS desoxigenadas.

* Células SS oxigenadas mas Nifedipina.

● Células SS desoxigenadas mas Nifedipina. (42)

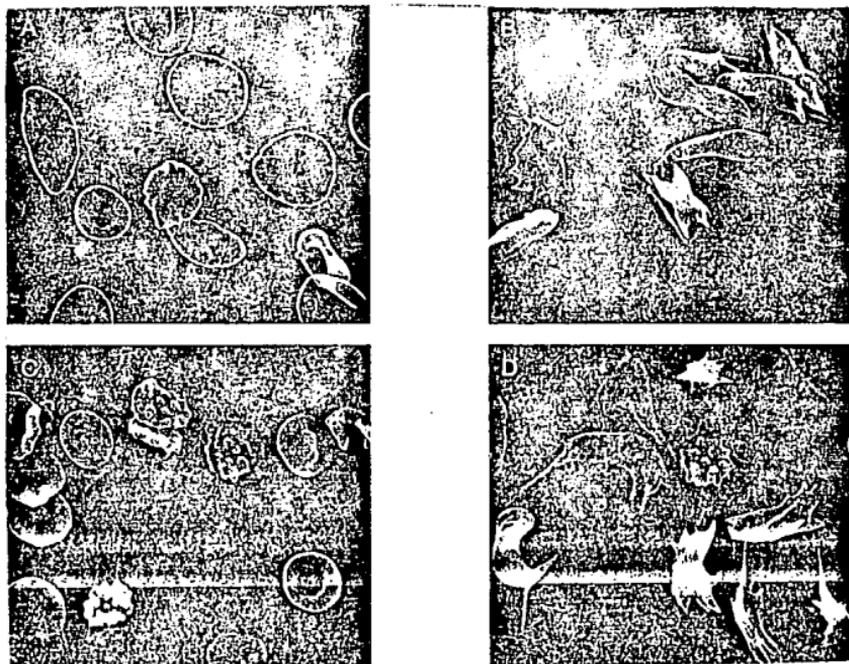


Figura 5.4 Micrografías del microscopio electrónico de células en hoz oxigenadas con y sin anión. Las células fueron desoxigenadas 20 min en ausencia y presencia del anión ($45 \mu\text{mol/L}$).

- A) Células oxigenadas control SS.
- B) Células desoxigenadas control SS.
- C) Células Oxigenadas SS más anión.
- D) Células desoxigenadas ss más anión.(7)

La desoxigenación que sufre la célula eritrocítica en forma de hoz (SS) no solamente influye en su morfología deforme que se

observa fácilmente en el microscopio óptico, si no que también en perturbaciones bioquímicas a nivel de su membrana interna, alterando la difusión y asimetría de los fosfolípidos que la forman. (58 y 65)

De manera normal los fosfolípidos están distribuidos sobre las cavidades de la membrana de eritrocitos humanos en forma asimétrica. La fosfatidilcolina (FC) y la Esfingomielina están esencialmente localizadas sobre la monocapa externa, mientras que la mayoría de la Fosfatidiletanolamida (FE) y prácticamente toda la Fosfatidilserina (FS) son localizadas sobre las cavidades del citoplasma. (63)

Estudios realizados sobre la reorientación y distribución de Fosfolípidos de la membrana de eritrocitos de pacientes homocigotos con anemia de células en hoz (SS), están basados en el seguimiento de la distribución cinética de pequeñas cantidades de hebras-marcadas de fosfolípidos análogos naturales, primero introduciéndolos en la superficie de la membrana de eritrocitos normales, posteriormente exponiéndolos en eritrocitos anormales. (58)

La cinética de reorientación de FS, FE y FC de la membrana de eritrocitos AA bajo condiciones de oxigenación y desoxigenación, no presenta diferencia significativa, entre ambos estados, además de que su velocidad de movimiento son idénticas. Figura V.5(A). Bajo condiciones de oxigenación, las células en hoz (SS) se comportan como eritrocitos normales. Figura 5.5(B).

Sin embargo, modificaciones importantes ocurren tan pronto los eritrocitos (SS) están desoxigenados. La simetría de FS está ligeramente reducida en comparación con FS. La difusión de FC es 3 veces más rápida después de la desoxigenación. (58) Ver Fig.5.5 (C).Fig.

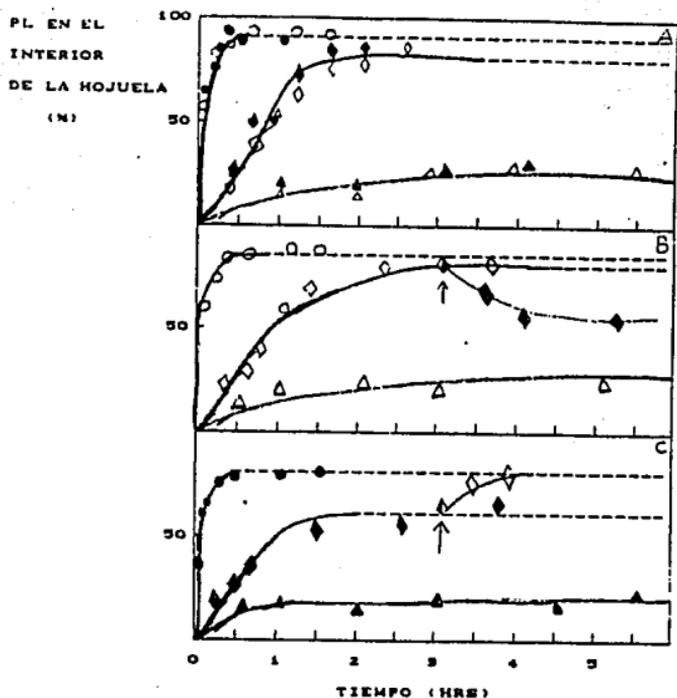


Figura 5.5 (A), (B) y(C).

(A) Cinética de la reorientación de hebras-marcadas de fosfolípidos análogos (FS círculos, FE rombos, FC triángulos) en células normales bajo condiciones de oxigenación (símbolos sin colorear) y desoxigenación (símbolos coloreados).

(B) Células en forma de hoz (SS) oxigenadas.

(C) Células en forma de hoz (SS) desoxigenadas. (SB)

Los resultados del trabajo anterior se sintetizan en las siguientes afirmaciones: La desoxigenación no tuvo efecto sobre la redistribución cinética de los lípidos de la membrana de células AA. La desoxigenación induce a una aceleración de la difusión pasiva de PC. La distribución de los aminofosfolípidos (FE y FS) entre las cavidades de la membrana de los eritrocitos SS fueron menor en asimetría. Estos cambios son reversibles en condiciones de oxigenación. Cabe señalar que la enfermedad de células en hoz (SSS) es el primer caso patológico causado por la reorientación de fosfolípidos. (58)

Tratando de dar una explicación más detallada sobre las características químicas de la hemoglobina falciforme (HbS); se tiene que: la larga cadena lateral no polar de la valina en la posición 6 de la cadena β queda expuesta en la superficie de la molécula, dando lugar a un cambio en el comportamiento de la hemoglobina desoxigenada (SSS). Es decir, la hemoglobina falciforme permanece en solución dentro del glóbulo rojo siempre y cuando la tensión del oxígeno disminuye se forman enlaces intermoleculares entre las moléculas falciformes dando lugar a que se agreguen en filamentos que quedan empaquetados en estructuras cristalinas no solubles. Estos cristales precipitan entonces distorsionando y atiesando al glóbulo rojo en su forma de hoz característica. (48)

La propuesta de Murayama (Teniendo en cuenta que los aminoácidos con carga negativa, denominados hidrofílicos, son capaces de interactuar con moléculas de agua y que además los aminoácidos con grupos metilo hidrofóbicos son mucho menos solubles en agua y por consiguiente la mayoría se unen en el interior de la proteína) es que la sustitución del aminoácido hidrófilo, ácido glutámico β 6, por el aminoácido hidrófobo, valina, permite la producción de una ciclización hidrófoba valina-valina de la terminal N de la cadena β de la hemoglobina S. (18) Ver Fig 5.6

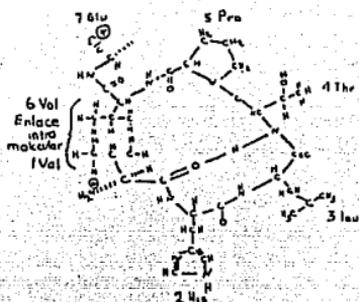


Figura 5.6 Representación esquemática de un sitio supuesto de unión, cerca del grupo amino terminal sobre la cadena β de la hemoglobina de los drepanocitos. Se representa el enlace hidrófobo entre residuos de valina de las posiciones 1 y 6, y el enlace hidrógeno del grupo carboxilo (-C=O) del primer residuo aminoácido y el grupo amino ($-\text{NH}-$) del cuarto. (53)

Esto produce una estructura en forma de llave en la superficie de la cadena β , la cual, en la hemoglobina desoxigenada, puede empalmar con una molécula de hemoglobina adyacente. De ahí es posible la formación de un monofilamento y varios monofilamentos pueden asociarse para formar un cable. (53) Ver Fig. 5.7.

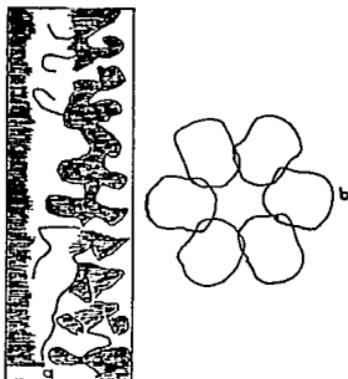


Fig. 5.7 Apariencia de fibras de hemoglobina drepanocítica.

Figura 5.7 a) Apariencia de fibras de hemoglobina drepanocítica como monofilamento torcidos para formar una estructura con apariencia de cable.
 b) Esquema de una sección transversal del cable. (53)

Micrografías electrónicas de HbS muestran la presencia de múltiples microtubitos. Estos microtubitos son fibras fijadas de hemoglobina SS, las cuales a diferentes tiempos de gelación muestran una distribución y longitud variable. La distribución no tuvo un cambio significativo y la longitud de las fibras se observaron algunas largas y otras cortas. Durante la oxigenación de la hemoglobina, este acoplamiento se pierde y cesa la formación de hoces.

Este mecanismo sugiere, también, que la razón de individuos con rasgos drepanocíticos no muestren propensión a la formación hoces es debido a que las moléculas AA de la hemoglobina normal puede interrumpir dicho encadenamiento. (31) Ver fig 5.8

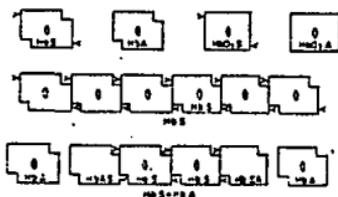


Fig 5.8 Esquema de la agregación lineal de la Hb drepanocítica. La línea superior muestra, de derecha a izquierda, desoxihemoglobina S que tiene dos valinas y dos sitios complementarios pero carece de valinas; oxihemoglobina S que tiene las valinas pero carece de los sitios complementarios, y oxihemoglobina A que carece de ambos. El signo en el centro de cada molécula marca el doble eje de la simetría. La segunda línea muestra una agregación de desoxihemoglobina S, hecha posible por dos valinas y dos sitios complementarios relacionados por un eje simétrico en cada molécula. La tercera línea muestra una mezcla equimolar de desoxihemoglobinas S y A. Las agregaciones lineales están terminadas por moléculas híbridas a las que falta el eje de simetría. La oxihemoglobina S no puede formar agregaciones porque carece de los sitios complementarios. (53)

Una afirmación en síntesis de aspectos químicos de la hemoglobinopatía S es que: En la hemoglobina falciforme, la larga cadena lateral no polar de la valina en la posición 6 de la cadena β queda expuesta en la superficie de la molécula, dando lugar a un cambio en el comportamiento de la hemoglobina desoxigenada. Es decir, la hemoglobina falciforme permanece en solución dentro del glóbulo rojo siempre y cuando la tensión de oxígeno sea alta. Cuando la tensión de oxígeno disminuye se forman enlaces intermoleculares entre las moléculas falciformes dando lugar a que se agreguen en filamentos que quedan empaquetados en estructuras cristalinas no solubles, estos cristales precipitan entonces, distorsionando y atiesando al glóbulo rojo en su forma de hoz característica. (66)

6.0 ASPECTOS GENETICOS DE LA HEMOGLOBINA S

La función de un gen dentro de un individuo es, en su sentido más profundo, controlar e inducir el fenotipo. Sin embargo entre el gen y el fenotipo final hay muchos acontecimientos complejos que hacen difícil determinar como se ejerce éste control. Por consiguiente el avance en éste tema fué lento hasta 1941 cuando Beadle y Tatum anunciaron un concepto importante llamado hipótesis un gen una enzima. (28)

- 1) Todos los procesos bioquímicos de todos los organismos están bajo control genético.
- 2) Estos procesos bioquímicos en conjunto pueden dividirse en una serie de reacciones individuales paso a paso.
- 3) Cada reacción está controlada de forma primaria por un solo gene, o en otros términos, la correspondencia que existe entre el gene y la reacción bioquímica es en cada caso 1:1 de tal manera que
- 4) La mutación de un solo gene da lugar únicamente a la alteración de la capacidad de la célula para llevar a cabo una sola reacción química primaria. = La hipótesis subyacente... es que cada gene controla la producción, función y especificidad de una enzima concreta =. (46)

En su forma más sencilla esto significa que el producto último de un proceso metabólico había sido afectado por una sucesión escalonada de enzimas, producidas cada una de ellas por

un gene concreto como se ilustra esquemáticamente en la Tabla 6.1

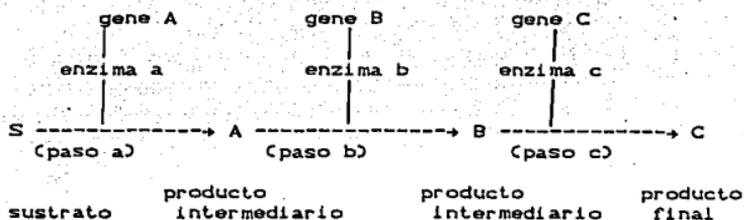


Figura 6.1 Representación diagramática de una secuencia metabólica que da lugar a un producto C a partir de un sustrato particular (S) en la que son necesarias 3 enzimas para controlar 3 pasos. Cada enzima a su vez, esta controlada por un gene. (46)

Sabiendo ahora lo importante que puede ser un gen en la construcción de un fenotipo, entonces se apreciará la magnitud que una mutación en cualquiera de ellos podría lograr.

Todos los organismos sufren un cierto número de mutaciones, como resultado de las operaciones normales celulares o de interacciones al azar con el ambiente. Tales mutaciones se denominan espontáneas; la tasa con que éstas ocurren es característica para cada organismo y esta característica algunas veces se denomina nivel de fondo. (46)

La frecuencia de mutaciones puede aumentar por tratamientos con ciertos compuestos. A estos compuestos se les denomina mutágenos y los cambios que inducen se denominan mutaciones

inducidas. La mayoría de los mutágenos actúan directamente, debido a su capacidad para actuar sobre una base determinada del DNA, o ser incorporados en el ácido nucleico. La efectividad de un mutágeno se valora por el grado en que se aumenta la tasa de mutación sobre el nivel de fondo. (46)

Cualquier par de bases del DNA puede ser mutado; la mayoría de las mutaciones caen en diferentes sitios y la probabilidad estadística de que ocurra más de una mutación en un sitio determinado viene dada por la cinética de impactos al azar (como se ve en la distribución de Poisson). (45)

Una alteración que cambie solamente un solo par de bases se denomina una mutación puntual. (3)

Las mutaciones puntuales tienen dos tipos generales de origen: pueden ocurrir como resultado de una disfunción del sistema celular que replica, o del que repara al DNA, debido a que la base errónea se inserte en la cadena de polinucleótidos, conforme ésta se sintetiza. O puede resultar directamente de una interferencia química con una de las bases del DNA. (48)

La clase más común de mutación puntual es la transición, que consiste en la sustitución de una pirimidina por otra o de una purina por otra; así, un par G-C puede ser cambiado por un par A-T, o viceversa. La clase menos común es la transversión en la cual una purina es reemplazada por una pirimidina, o viceversa, así que un par A-T se convierte en un par T-A, o C-G. (30)

Una causa de transiciones es la conversión química directa de

una base en otra. El ácido nitroso realiza una desaminación oxidativa que convierte a la citosina en uracilo. En el ciclo siguiente de replicación el U empareja con una A, en lugar de hacerlo con una G, con la que hubiera emparejado la C original. De esta manera, el par C-G es reemplazado por un par T-A, cuando la A empareja con la T en el ciclo de replicación inmediato. El ácido nitroso también desamina a la adenina, causando la transición inversa de A-T a G-C. (46) Ver figura 8.2



Figura 8.2 Las mutaciones pueden inducirse por modificación química de una base. El ácido nitroso desamina oxidativamente la citosina a uracilo. La replicación genera un dúplex hijo con el par de tipo silvestre C-G, pero el otro tiene un par U-A, el cual se replica para dar lugar a pares T-A en subsiguientes generaciones. (3)

Otra causa de transiciones es el apareamiento erróneo cuando una base anormalmente se aparea, pese a las restricciones de apareamiento de Watson y Crick, con una base que no le corresponde. El apareamiento erróneo de bases, generalmente, ocurre como una aberración que resulta de la introducción de una

base anormal. (17)

Algunos mutágenos son análogos de las bases usuales, los cuales tienen propiedades de apareamiento ambiguas; sus acciones mutagénicas resultan de su incorporación al DNA en lugar de una de las bases regulares. La figura 6.3 muestra el ejemplo del bromouracilo (BrdU) el cual es incorporado en el DNA, por error, en lugar de la timina, pero debido a que el BrdU también puede aparearse, erróneamente, relativamente bien con la guanina (en lugar de hacerlo con la adenina), la presencia del bromo da lugar a la sustitución del par original A-T por un par G-C. (14)

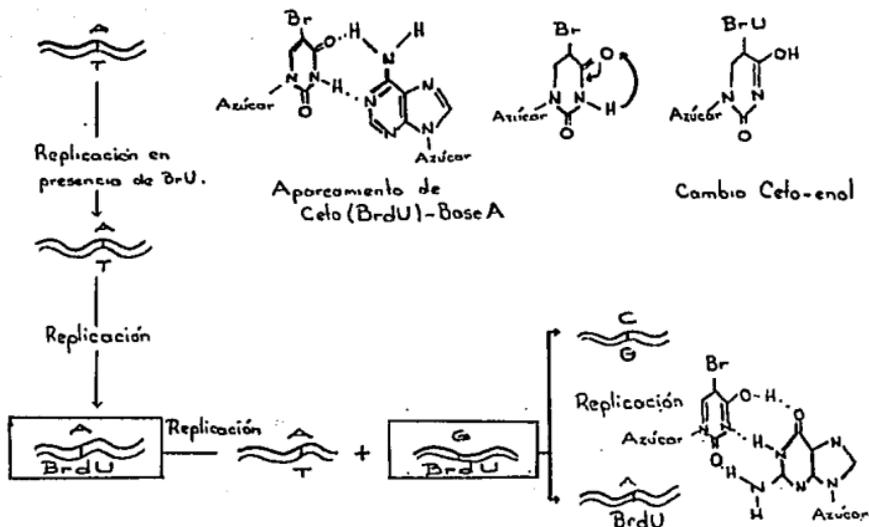


Figura 6.3 Mutaciones por la incorporación de análogos de bases en el DNA. El bromouracilo contiene un átomo de bromo en lugar del metilo de la timina. (30)

Los apareamientos erróneos pueden ocurrir tanto durante la incorporación original de la base como en un subsiguiente ciclo de replicación, de modo que la incorporación de BrdU tiene efectos continuados sobre el DNA.(28)

Durante mucho tiempo se pensó que las mutaciones puntuales eran el medio principal del cambio de los genes individuales. Sin embargo, ahora sabemos que las inserciones de segmentos de material adicional pueden ser frecuentes. La fuente del material insertado son los elementos transponibles, secuencias del DNA que tienen la capacidad de moverse de un sitio a otro.(30)

Una inserción anula actividad de un gen. Cuando han ocurrido tales inserciones pueden ocurrir subsiguientemente deleciones de parte o de todo el material insertado y, algunas veces, de regiones adyacentes.(27)

Una diferencia significativa entre la mutación puntual y las inserciones/deleciones es que la frecuencia de la mutación puntual puede ser incrementada por los mutágenos, mientras que la ocurrencia de cambios causados por los elementos transponibles es indiferente a tales reactivos. Sin embargo, las inserciones y las deleciones pueden también ocurrir por otros mecanismo por ejemplo, en relación con errores producidos durante la replicación o la recombinación; aún cuando, probablemente, éstos sean menos comunes. Los cambios inducidos por las acridinas también constituyen inserciones y deleciones.(24)

6.1 ALTERACIÓN GENÉTICA EN LA HEMOGLOBINA S

Un conjunto de genes derivados, por duplicación y variación, de un gen ancestral se denomina una familia génica. Sus miembros pueden estar agrupados o, contrariamente, dispersos sobre cromosomas diferentes (o una combinación de ambas situaciones). (44)

En algunos casos, los miembros de una familia génica han permanecido todos idénticos. El agrupamiento es un prerequisite para mantener la identidad entre genes. Las agrupaciones genéticas (cluster) varían, desde el caso en que una duplicación ha generado dos genes relacionados adyacentes, a los casos en los que cientos de genes idénticos se mantienen en una disposición en tándem.

Los miembros de una familia génica estructural tienen funciones idénticas o relacionadas, aún cuando puedan ser expresados en momentos diferentes o en tipos de células diferentes. (57)

La extensa repetición en tándem de un gen puede ocurrir cuando el producto es necesario en cantidades inusualmente grandes. Ejemplo de esto son los genes para el RNAr o para las histonas.

En un menor grado de repetición puede utilizarse para proporcionar proteínas ligeramente diferentes para circunstancias particulares. Por ejemplo, globinas diferentes son sintetizadas para el uso en los glóbulos rojos embrionarios y en los de los adultos. (44)

El constituyente mayor de los glóbulos rojos de la sangre es el tetramero de globina, asociado con su grupo hemo (que se une al hierro) en forma de hemoglobina. Los genes funcionales de las globinas en todas las especies tienen la misma estructura general, dividida en tres exones como se observa en la figura 6.4.

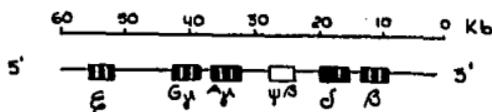


Figura 6.4 Genes funcionales de las globinas. (30)

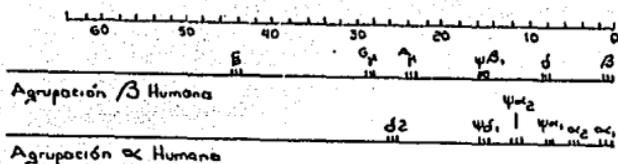
Cuando una proteína tiene más de una cadena, cada una de ellas es construida por separado y se juntan al final de la síntesis para formar la proteína terminada. (38)

En el caso de las cadenas α y β de la globina éstas son codificadas por loci genéticos independientes cuya expresión puede ser coordinada para asegurar una producción equivalente de ambos polipéptidos. Este sistema, por tanto, proporciona el ejemplo de la necesidad de control simultáneo de genes dispersos para generar un fenotipo celular particular. (38)

Las dos o más cadenas polipeptídicas necesarias para generar una proteína funcional, son controladas generalmente por dos genes adyacentes aunque no siempre es éste el caso. = Las cadenas α y β de la hemoglobina no tienen control de genes ligados =. Las cadenas α y β son controladas por dos genes distintos, en cromosomas diferentes; de tal suerte que una mutación única afectará una de las dos cadenas pero no ambas. (14)

La división de las cadenas de las globinas en tipo α y tipo β refleja la organización de los genes. Cada tipo de globina está codificada por genes organizados en una sola agrupación (cluster)

En el hombre, la agrupación α está en el cromosoma 16, y el agrupamiento β en el cromosoma 11. Las estructuras de las dos agrupaciones en el genoma humano se ilustra en la figura 6.5



Gen Discontinuo. Gen de estructura
Desconocida.

Figura 6.5 Genes funcionales y pseudogenes de la agrupación α y β de la hemoglobina. (34)

Extendiéndose sobre 50 kb, la agrupación β contiene 5 genes funcionales (ϵ , dos γ , δ y β) y un pseudogen. Los dos genes γ difieren de su secuencia codificadora solamente en un aminoácido la variante G tiene glicina en la posición 136 mientras que la variante A tiene alanina. (17)

La agrupación α , más compacta, se extiende sobre 28 kb e incluye un gen activo, un pseudogen, dos genes α , dos pseudogenes α . Los dos genes α codifican la misma proteína. Dos (o más) genes idénticos presentes sobre el mismo cromosoma se describen como copias no alélicas. En cada genoma, todos los genes de la globina activos están dentro de la agrupación α o de la agrupación β , algunas veces juntos con pseudogenes. (34)

No parece probable que otras proteínas sean codificadas dentro de la región de la agrupación β pero todavía no sabemos cuánto del DNA no codificador (tanto de los flancos como de los intrones) sirve a funciones necesarias para la expresión génica de la β globina. (57)

En la Hemoglobina S no se afecta la familia de genes para la síntesis de la cadena β , ésta consiste en una mutación puntual dentro de un gen específico aún no determinado. (64)

En 1949 Neel y Beet, propusieron que la falcemia estaba organizada por un solo gen mutante que se encontraba en heterocigosis en los individuos con caracter falciforme y en homocigosis en los individuos con anemia falciforme. (53)

La forma falciforme descubierta por Neel y Beet fue analizada, encontrándose posteriormente la alteración que la origina.

El fragmento de DNA ocupado por el cromosoma 11 es responsable de contener a la familia génica que se ocupa de la síntesis de la cadena β formadora de la Hemoglobina normal. (52)

En el DNA se encuentra el codón CTT o bien CTC los cuales son copiados en el RNAm, GAA o GAG según sea el caso es el mensaje captado, en el RNAr y RNAt ocurre la captación del aminoácido Ac. glutámico en un caso normal de síntesis. (17)

La alteración que origina la hemoglobina S ocurre por una mutación puntual en la segunda base formadora del triplete del DNA siendo el cambio de CTT o CTC a CAT o CAC respectivamente, lo que origina una transversión (Sustitución de una base pirimidica T por una purica A) el mensaje copiado del RNAm será GUA o GUG según sea el caso y el aminoácido resultante de la síntesis será valina.

Tabla 6.6.

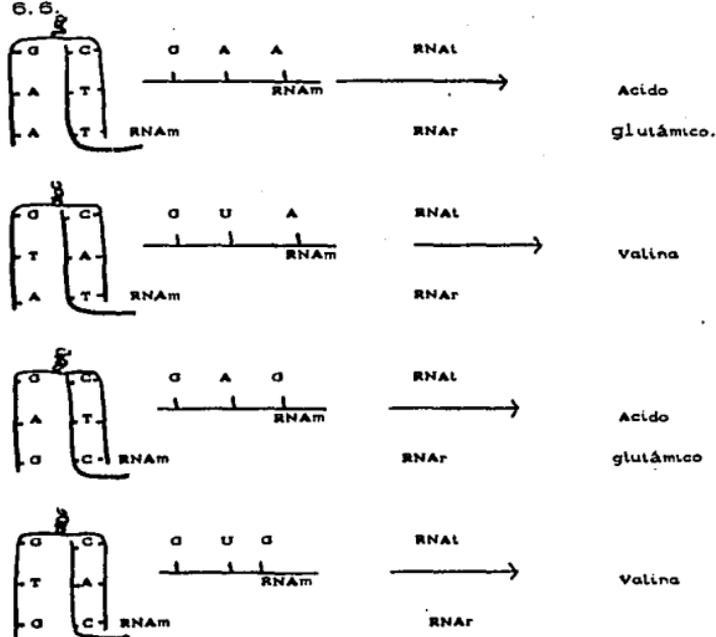


Tabla 6.6 Representación de la alteración genética generadora de la hemoglobina S (45 y 46)

6.2 CAUSAS GENERADORAS DE LA ALTERACION Y MODO DE HERENCIA.

Los cambios morfológicos y funcionales tienen como base los cambios genéticos. La evolución biológica tiene lugar debido a que el material hereditario, el DNA puede cambiar de generación en generación. La herencia es un proceso conservador, pero no completamente; ocasionalmente ocurren errores, de tal manera que las células hijas difieren de las progenitoras en la secuencia del DNA o en la cantidad de DNA. Aquí trataremos las mutaciones de los genes, que afectan a uno de los nucleótidos de un gen. La mutación puede deberse a anomalías en el proceso de replicación o en el de reparación impidiendo el funcionamiento correcto del DNA ó interfiriendo con enzimas que están involucradas directa ó indirectamente en su metabolismo. (3)

La correlación de los cambios en la estructura del DNA de genes mutantes conocidos con la acción de agentes mutágenos particulares o con condiciones ambientales asociadas con las mutaciones espontáneas requiere un conocimiento de la secuencia de nucleótidos tanto del DNA de tipo salvaje como del mutante, para deducir los mecanismos reales de la mutación. (52) Los nuevos métodos de secuenciación del DNA aplicados a los genes clonados actualmente hacen esto posible. (38)

En el caso de la anemia falciforme la sustitución del ácido glutámico por valina en la posición 6 es debida a la mutación en el DNA en donde una de las bases T es sustituida por A en el codón codificante. (12)

Las mutaciones en general pueden dividirse en 2 clases: 1) Sustituciones de pares de bases y 2) mutaciones por corrimiento del sistema de lectura (o por alteración o desplazamiento de la pauta de lectura). Al menos el 20 % de las mutaciones espontáneas se cree que se deben a sustituciones de pares de bases. (27)

6.2.1 SUSTITUCIONES EN PARES DE BASES

Existen dos tipos de sustituciones de pares de base: transiciones y transversiones.

6.2.2 FORMAS TAUTOMERICAS DE LAS BASES:

Durante la replicación del DNA pueden ocurrir transiciones espontáneas debido a la tautomería: desplazamiento en la posición de un protón que cambia las propiedades químicas de una molécula, (3) a una forma estructural que provoca alteraciones en el apareamiento de una base. (34)

Éstos desplazamientos tautoméricos alteran las propiedades de los puentes de hidrógeno de tal manera que la adenina asume la de guanina, y la guanina las de adenina, la citosina las de timina, y la timina las de citosina. (17) Ver fig. 6.1

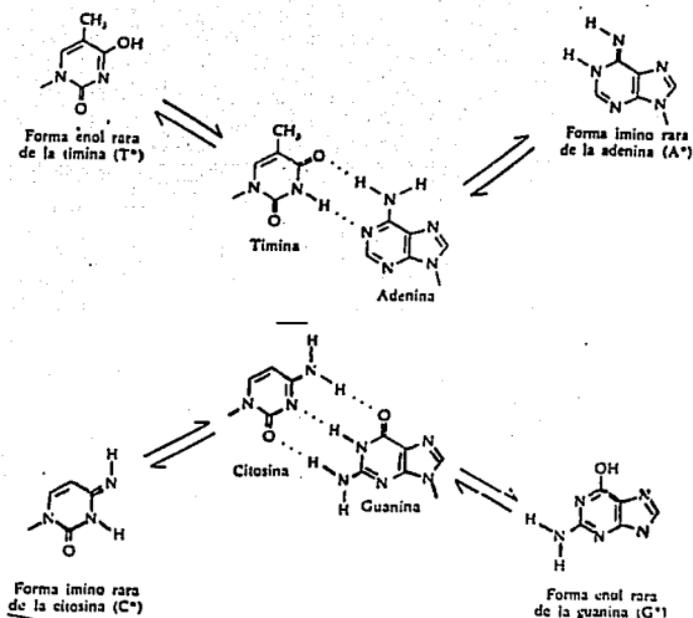


Fig. 6.1 Formas tautoméricas de las bases de DNA. Las formas más comunes, en las que el hidrógeno de la adenina se enlaza con la timina y el hidrógeno de la guanina se enlaza con la citosina, se muestran en el centro. los tautómeros relativamente raros, con diferentes propiedades de formación de puentes de hidrógeno se muestran con flechas C puede formar puentes de hidrógeno con A, G con T, T con G y A con C. (30)

6.2.3 ANALOGOS DE BASES:

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los análogos de bases son bases púricas ó pirimidicas que difieren ligeramente de las estructuras que por lo común se observan en el DNA y el RNA. Se pueden incorporar en el DNA ó RNA en vez de las bases normales, causando así mutaciones.(3)

El mutágeno análogo de base 5-bromouracilo (SBU), un análogo de timina en el que el grupo metilo es reemplazado por un átomo de bromo; ejerce su actividad mutagénica mediante la tautomeria que aumenta por el gran poder de movilización de electrones del bromo comparado con el del grupo metilo (26) Ver fig 6.2

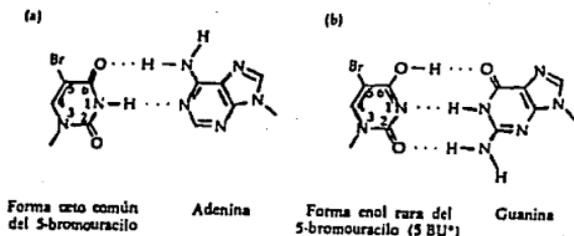


Fig. 6.2 Formas tautoméricas del 5-bromouracilo, un análogo de la timina. a) El tautómero más común que forma puentes de hidrógeno con la adenina. b) El tautómero menos común, pero importante, que forma puentes de hidrógeno con la guanina.(26)

Las mutaciones causadas por el SBrU puede causar errores de incorporación o en el molde dando como resultado las transiciones GC--- AT ó AT---GC. (3) Ver fig 6.3

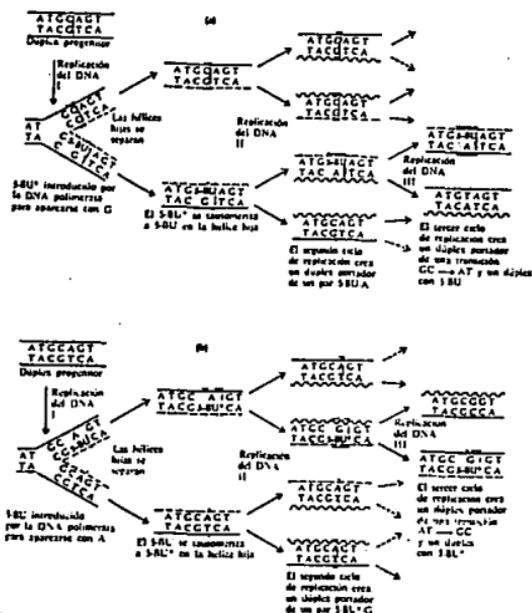


Fig. 6.3 Inducción de transiciones por el 5-bromouracilo.
 a) Un error de incorporación produce una transición GC → AT. b) Un error de molde produce una transición AT → GC. (30)

Otro mutágeno análogo de base es la 2-aminopurina (2-AP), que puede aparearse con la timina o con la citosina. (28) Ver fig 6.4

De la misma forma que el 5-BrU, la 2-AP induce mutaciones de transición que pueden ser el resultado de errores de

incorporación o errores de molde. Las mutaciones que son inducidas por análogos de bases también son inducidas a revertir al tipo salvaje por análogos de bases. La reversión inducida por análogos de bases es un medio útil o para identificar las mutaciones de transición. (28)

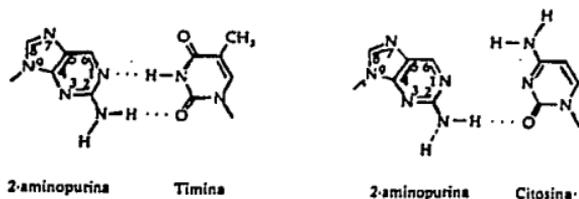


Fig. 6.4 La 2-aminopurina (2-AP), un análogo de la adenina forma enlaces de hidrógeno con la timina y la citosina. (3)

El mutágeno ácido nitroso también causa la transición GC \rightarrow AT y AT \rightarrow GC, por la desaminación de la citosina a uracilo y de la adenina a hipoxantina (que tiene las mismas propiedades de apareamiento que la guanina). La reversión inducida por el ácido nitroso es también un medio útil para identificar las mutaciones de transición. (26) Ver fig 6.5

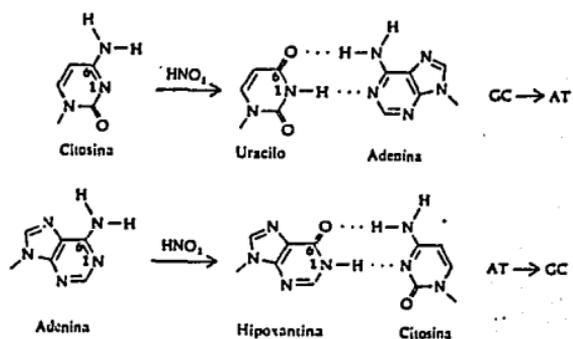


Fig. 6.5 El ácido nitroso induce la transición GC--AT por desaminación de la citosina a uracilo, y la transición AT→GC por desaminación de la adenina o hipoxantina. (28)

Debido a que la 2-AP, el 5-BrU y el ácido nitroso son bidireccionales en su acción, no pueden suministrar pruebas sobre si una mutación de transición es GC--AT o AT--GC. El mutágeno hidroxilamina, sin embargo reacciona específicamente con la citosina para convertirla en una forma que se complementa con la adenina Ver Fig. 6.6 y esta acción es unidireccional: GC--AT.

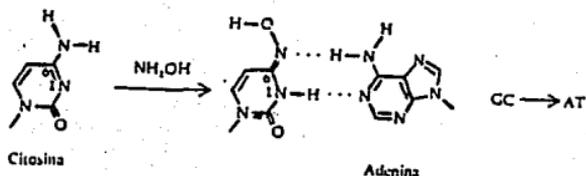


Fig. 6.6 La hidroxilamina reacciona específicamente con la citosina, convirtiéndola en una forma que establece puentes de hidrógeno con la adenina. La hidroxilamina causa la transición unidireccional GC → AT. (27)

Las mutaciones inducidas por la hidroxilamina no son reversibles por la hidroxilamina, pero pueden ser revertidas por agentes bidireccionales. (27)

6.2.4 DESAMINACION DE LAS BASES

Tres de las 4 bases normales presentes en el DNA (Adenina, guanina y citosina), contienen grupos amino afuera de su ciclo, y la pérdida de ellos ocurre espontáneamente debido a reacciones dependientes de pH y temperatura. (26)

La citosina se desamina espontáneamente a una tasa significativa produciendo uracilo Ver fig 6.7. Todas las células

poseen una vía de reparación para detectar los apareamientos erróneos dG/dU y corregirlos hidrolizando el enlace glicosídico dejando uracilo libre. La desaminación espontánea de la 5-metilcitosina, sin embargo, forma timina Ver fig 6.7, un constituyente normal del DNA, que escapa a la detección por está vía de reparación. Los apareamientos erróneos dG/dT originados de esta forma se reparan con menos eficiencia, esto da lugar a una frecuencia elevada de la mutación dG/dC-- dA/dT, formando un punto caliente.(52)

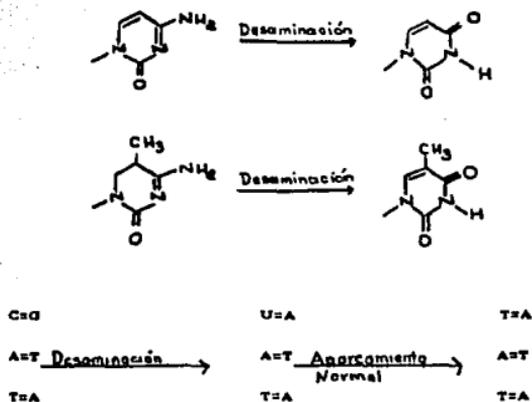


Fig. 6.7 La desaminación espontánea de la citosina produce uracilo; la correspondiente a la 5-metilcitosina produce timina. Por medio de la desaminación espontánea la citosina es convertida a uracilo, que tiene propiedades de apareamiento con adenina; el resultado final es la sustitución de un par T=A por el original C=G.(28)

6.2.5 MUTACION POR CORRIMIENTO DE LECTURA

Las mutaciones por corrimiento de la pauta de lectura constituyen una gran fracción de todas las mutaciones espontáneas.

6.2.6 AGENTES ALQUILANTES

Los efectos mutagénicos de los agentes alquilantes radican esencialmente en su gran reactividad con las bases nucleicas y añadiendo grupos alquilo a sus anillos para así formar aductos en el DNA, esto hace muy lábil sus enlaces N-Glicosilo, por lo cual puede ocurrir su eliminación por N-Glicosilasas con la creación de sitios de apareamiento, originándose mutaciones por la inserción de nucleótidos al azar por parte del ADN polimerasa.

Su gran reactividad se debe a su carácter electrófilo con gran afinidad por sus centros nucleofílicos de las bases nucleicas debido a ello estos agentes pueden reaccionar con 2 diferentes sitios nucleofílicos en el DNA, dando lugar a la formación de enlaces entre nucleótidos de una misma cadena, si estos centros nucleofílicos estas situados sobre la misma cadena de DNA dúplex pueden ser formaciones de enlaces intercadenas si los 2 centros estan sobre cadenas opuestas ésto es de graves consecuencias ya que bloquea el avance de la replicación y causan muerte celular. (30). Ver fig 6.8

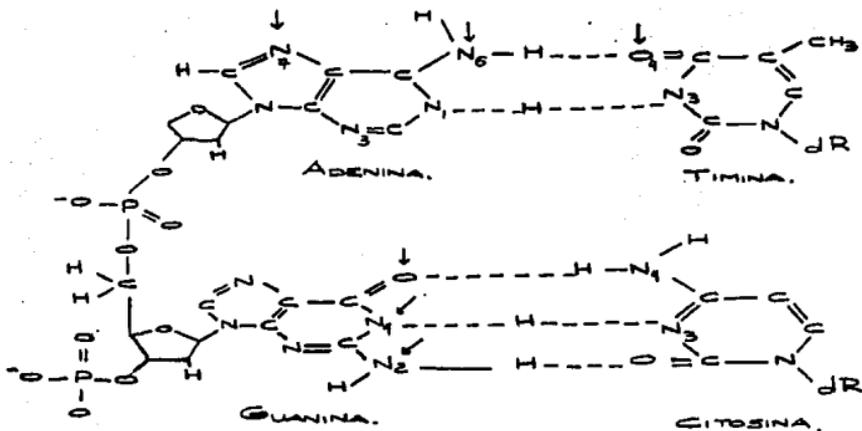


Figura 6.8 Las flechas indican los centros nucleofílicos en el DNA que son más reactivos a agentes alquilantes.

6.2.7 METABOLIZACIÓN DE AGENTES QUÍMICOS A FORMAS REACTIVAS

Algunos agentes químicos pueden sufrir activación metabólica a formas reactivas, las cuales, como los agentes alquilantes interaccionan con centros nucleofílicos en el DNA. Se sabe que la activación es realizada por sistemas enzimáticos en las células afectadas, estos sistemas en condiciones normales protegen a la célula contra efectos citotóxicos por conversión de estos agentes a formas inócuas excretables. (17)

George Streisinger ha propuesto un modelo para explicar el origen de las mutaciones por corrimiento de la pauta de lectura

durante la síntesis del DNA que supone disociaciones locales y mal anillado de pares en estas series Ver fig 6.9 De acuerdo con este modelo, el efecto de los mutágenos que provocan el corrimiento de la pauta de la lectura es el de facilitar o estabilizar la formación de tales secuencias mal anilladas.(33)

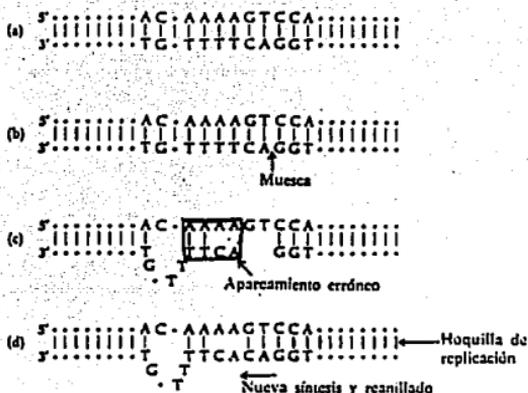


Fig. 6.9 El modelo Streisinger para las mutaciones por corrimiento de la pauta de lectura, un poco modificado. a) Molécula original de DNA. b) Se introduce una muesca o rotura. c) La proteína desenrolladora del DNA induce una disociación local y un anillado incorrecto en la parte C justo antes de la llegada de una horquilla de replicación antes de que sea detectada el asa del filamento por otras enzimas de reparación y corregida.(45)

6.2.8 AGENTES INTERCALANTES

En este tipo de mutágenos se encuentra el naranja de acridina, proflavina y acriflavina, su efecto mediante un proceso de intercalación entre las bases del DNA forma un enlace químico con una base de un filamento y otro enlace con la base de otro filamento esto causa el alargamiento de la doble hélice y al momento de la replicación puede suceder la adición o eliminación de nucleótidos en estos lugares lo cual puede desfasar la lectura del RNAm en la traducción a proteína. Figura 6.10



Figura 6.10 El naranja de acridina se intercala entre las bases y establece enlaces covalentes. Con la intercalación se produce el alargamiento, de la doble hélice y se puede insertar un nucleótido en la cadena en desarrollo. (14)

Por el momento no existe explicación satisfactoria para la ocurrencia de las mutaciones espontáneas, pero no es descabellada la hipótesis; de que, factores ambientales sean los que causen la

mayoría si no es que la totalidad de este tipo de mutaciones. (43)

Cuando una mutación ocurre como en el caso de la anemia falciforme se pueden distinguir 2 casos muy particulares de la alteración, la presencia de la HbSS (carácter homocigótico) ó bien HbAS (carácter heterocigótico).

El modo de herencia sugerido para la anemia de células en hoz, es el incompletamente dominante autosómico y regido por la herencia mendeliana de un solo gen. (44)

En el caso del heterocigótico HbAS, existe hemoglobina normal y hemoglobina anormal (HbS) en partes proporcionales, es decir al 50%. Un individuo portador del rasgo drepanocítico presentará básicamente solo en apariencia la enfermedad y tiene una probabilidad de vida mayor que el individuo homocigoto.

Un individuo que posee carácter heterocigoto tiene la probabilidad de engendrar descendientes normales y otros con el rasgo drepanocítico, como se esquematiza en la Fig 6.11



Fig. 6.11 Descendencia en el caso del carácter heterocigoto de la anemia drepanocítica. (52)

En el caso del individuo homocigoto, éste presentará la enfermedad y su probabilidad de vida es poca; en caso en que presentara descendencia, ésta seguiría en comportamiento de la Fig 6.12.

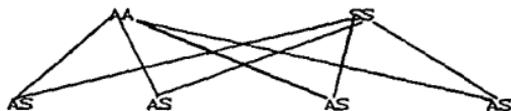


Fig. 6.12 Descendencia en el caso del carácter homocigoto. Como se observa el riesgo del paciente homocigótico de procrear individuos afectados es de 100% para rasgo drepanocítico. (52)

Para el caso en que dos individuos homocigotos crearan descendencia se obtendría según la Fig 6.13



Fig 6.13 Descendencia en el caso de 2 progenitores homocigóticos. El resultado obtenido es el 100% para la enfermedad falciforme. (52)

En el último de los casos en el que dos heterocigóticos procreen descendencia se observaría el diagrama de la Fig 6.14 (8)

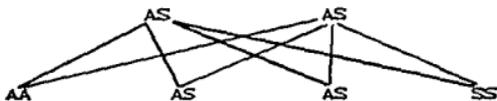


Fig. 6.14 Descendencia en el caso de 2 progenitores heterocigóticos. (45 y 52)

Desde luego, algunos apareamientos son más fértiles y otros menos, por lo que el número de descendientes es variable.(45)

Las frecuencias de los distintos tamaños familiares pueden describirse estadísticamente mediante una distribución de Poisson que tenga una media igual a 2. Sin embargo, adviértase que no todas las familias tienen la misma probabilidad de conservar el gen mutante.(3)

7.0. MANIFESTACIONES CLINICAS

RASGO DREPANOCITICO (HbAS)

Los individuos con rasgo drepanocítico son normalmente asintomáticos. Pueden, sin embargo, mostrar hipostenuria benigna, y en raras ocasiones desarrollar hematuria. Estos dos caracteres se relacionan únicamente al medio ambiente de las papilas de la médula renal. El mecanismo de concentración renal a contra corriente produce una alta osmolaridad en la médula renal, y esto puede originar formación de hoces con resultante de infartos papilares y hematuria. (16)

ANEMIA DREPANOCITICA (Hb SS)

El primer caso de anemia de células falciformes fue descrito por Herrick en 1910. El paciente, un hombre de 20 años, de raza negra, procedente de las Antillas, presentaba la mayor parte de los caracteres clásicos, clínicos y hematológicos de la enfermedad. Además de las células rojas en forma de hoz, sufría agrandamiento cardíaco, ictericia, anemia, normoblastos en sangre periférica y leucocitosis. (23)

Este tipo de anemia se caracteriza por la aparición de síntomas en prácticamente todas partes del cuerpo. A veces son raros, y varían grandemente de un enfermo a otro; y según los momentos en un mismo paciente. (29)

El padecimiento puede resultar letal in utero o en la vida

temprana; y la expectativa de vida para el adulto está muy reducida. El embarazo provoca un grave riesgo materno y debe evitarse. Por lo general, el paciente es de pequeña estatura y tiene manos y pies largos y estrechos.(54)

Los drepanocíticos suministran un testimonio elocuente al hecho de que el cuerpo puede adaptarse a la anemia grave crónica. El diagnóstico debería considerarse en jóvenes pacientes negros que poseen mucosas pálidas y una ligera ictericia de conjuntivas.

Estos pacientes son usualmente asténicos y tienen las piernas desproporcionadamente largas. En algunos, puede retrasarse el desarrollo físico, o tener una apariencia delgada y desnutrida.(1)

Un énfasis especial para el diagnóstico clínico (típico) de esta anemia es que, casi todos los pacientes, en uno u otro momento de su evolución sufren molestias gastrointestinales, anorexia, náuseas, vómitos e ictericia; (59) además de que presenta un incremento de tamaño de hígado, bazo; un desorden en el sistema óseo y cardíaco; acompañado de una crisis dolorosa.(19)

ULCERAS DE LAS PIERNAS

Son frecuentes las úlceras crónicas en las piernas, o cicatrices de úlceras, generalmente en el área que circunda el tobillo.(3) éstas afecciones se han observado en un 75%, aproximadamente de los adolescentes o adultos que sufren la enfermedad. Las úlceras son raras en niños muy jóvenes. Estas

lesiones, de bordes netamente definidos, suelen ser únicas, pero en ocasiones son múltiples y bilaterales. (46)

Esta complicación puede presentar uno de los aspectos más exasperantes de la enfermedad. Es poco probable que las úlceras sean debidas enteramente a la presencia de la HbS, ya que individuos con talasemia pueden tenerlas también.

El factor determinante será la hipoxia crónica de esta área, combinada con la baja temperatura. En la drepanocitosis puede presentarse también la hinchazón de las manos (dactilitis por drepanocitosis) o de los pies. (40)

BAZO E HIGADO

En la anemia drepanocítica puede haber dolor intenso en cualquier parte del abdomen. Tales dolores pueden depender de infarto del bazo u otro órgano. Algunos pacientes presentan dolor en el cuadrante superior derecho, hipersensibilidad, aumento rápido e intenso del volumen del hígado. (47)

La esplenomegalia es frecuente en la primera infancia, pero es rara en los adultos debido a la fibrósis esplénica consecuente de las trombosis repetidas. Estas trombosis pueden producir calcificaciones esplénicas visibles por rayos X. La ictericia y la hepatomegalia son hallazgos frecuentes en los pacientes de drepanocitosis. El hígado puede llegar a ser muy grande, extendiéndose hasta la cresta iliaca. Esto resulta más evidente

entre los treinta y cuarenta años en cuyo periodo hay evidencia de disfunción hepática. El hígado puede crecer en tamaño transitoriamente durante la crisis. Usualmente existe una excreción incrementada de urobilinógeno, indicando que la ictericia no ha sido causada por una vulgar obstrucción canalicular. De hecho, la obstrucción canalicular como consecuencia de calcuosis pigmentaria, parece ser muy rara. (19)

ANOMALIAS OSEAS

La anemia de células falciformes suele acompañarse de síntomas o signos atribuibles a esqueleto y articulaciones. El dolor en las articulaciones es frecuente, pero el edema de las mismas es raro.

Las anomalías esqueléticas suelen demostrarse solo 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 éstos u otros huesos. A veces se observa el aspecto de pelo cortado del cráneo pero no es frecuente. (18)

La osteomielitis es un primer signo propio de la enfermedad. (38) se localiza en las zonas avasculares, del hueso infartado, esto se debe típicamente a salmonellas. (18)

La anemia hemolítica crónica, con hiperplasia eritroblástica puede dar como resultado el ensanchamiento de los espacios medulares, adelgazamiento de los corticales y embastesimiento de las trabéculas. Puede producirse desmineralización de los cuerpos

vertebrales que se volverán bicóncavos debido a la presión del núcleo pulposo sobre la debilitada estructura ósea.(36)

Hacia el final de la infancia puede acontecer un depósito característico de nuevo tejido óseo, en el interior de las corticales de los huesos largos, lo que da como resultado el estrechamiento de los espacios medulares.

Las crisis con dolores en los huesos pueden ser seguidas o por la aparición de reacción perióstica y pueden verse áreas irregulares de osteosclerosis que representan áreas de infarto óseo.(36)

SISTEMA GENITOURINARIO

Tal como se mencionó, en el rasgo drepanocítico, la médula renal es un área particularmente susceptible de dañarse en la drepanocitosis. La hiperosmolaridad, la anoxia, y los intercambios de pH, únicos de esta área, predisponen a la formación de hoces. Pueden presentarse infartos con necrosis de pupilas renales. Se encuentran frecuentemente hematuria y defectos crónicos en la concentración renal. Pueden también presentarse priapismo, genitales subdesarrollados y, ocasionalmente hipogonadismo.(39)

En pacientes de mayor edad puede observarse insuficiencia renal crónica. (39)

El embarazo en las mujeres drepanocíticas es acompañado por una incidencia creciente de pielonefritis, infartos pulmonares y neumonías, hemorragias precedentes al parto, prematuridad y muerte

fetal. También se presenta frecuentemente la anemia megaloblástica por déficit de ácido fólico. (19)

CARDIOPULMONARES.

Se han señalado varios tipos de anomalías cardíacas en una proporción de pacientes que varía del 50 al 91%. (20)

El corazón es el sitio donde más frecuentemente se efectúan hallazgos físicos en la drepanocitosis. Y esto es especialmente cierto durante las crisis debidas a las células en forma de hoz; (8) 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. (19)

A causa de combinación de fiebre y anemia hay una gran taquicardia y un choque de punta evidentísimo como se ve a menudo en el hipertiroidismo acentuado. (17)

El corazón se ensancha a menudo por la derecha e izquierda. (18) Este ensanchamiento se llega a observar en un 50% de 32 pacientes Sicilianos en un estudio específico. (47) En algunos pacientes se desarrolla corazón pulmonar probablemente en consecuencia de infarto de los pulmones e hipertensión de la pequeña circulación. (10)

La combinación del incremento de velocidad en la circulación y las oclusiones vasculares pulmonares conducen a un aumento de la presión pulmonar.

El electrocardiograma muestra comunmente arritmia .

Los infartos pulmonares son probablemente comunes en las drepanocitosis y pueden provocar episodios repetidos de dolor torácico, disnea inexplicable y neumonia.(18)

LA VISTA.

El exámen del fondo del ojo en pacientes con anemia de hematies falciformes o con carácter drepanocítico puede demostrar tortuosidad intensa y dilatación de los vasos retinianos.(1)

El exámen de las conjuntivas con una lámpara de hendidura o un oftalmoscópio puede revelar muchos segmentos capilares, en forma de coma o de sacacorchos, que al parecer, están aislados de la red vascular porque sus arterias aferentes y eferentes se han vaciado de sangre.

Estos sitios transitorios de amontonamiento intravasvular de eritrocitos se encuentran sobre la conjuntiva bulbar en las zonas cubiertas por los párpados. Este aspecto difiere del flujo capilar en forma de rosario consecuente a un grado benigno de lentitud circulatoria, que puede ser observado en otras condiciones tales como en la diabetes mellitus.(19)

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En pacientes de todas las edades se han señalado una amplia variedad de manifestaciones del Sistema Nervioso Central, incluyendo hemiplejía, disfagia, somnolencia, coma, cefalea, convulsiones y rigidez de la nuca. En niños son frecuentes las anomalías electroencefalográficas. Los signos de participación neurológica pueden ceder completamente, pero algunos enfermos mueren durante éstos episodios, y otros presentan parálisis que persiste, se cree que las lesiones de Sistema Nervioso Central resultan de accidentes vasculares o trastornos circulatorios pasajeros. (19)

8.0 COMPLICACIONES

La expresión "crisis drepanocíticas" se refiere a todo nuevo síndrome que se desarrolla rápidamente en los pacientes por drepanocitosis y es debido a la anormalidad básica genética y no explicable por cualquier otra base. (18) La frecuencia de estos ataques varía mucho; a veces son 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 inicio del ataque. Algunas crisis van precedidas de infecciones respiratorias, picaduras de insectos, fiebre, sensación de nerviosismo y otras indicaciones diversas, pero a veces el paciente se siente perfectamente bien y está con una actividad que no es más cansada que el hablar con miembros de su familia cuando empieza bruscamente la crisis. (10)

Sólo hay, en general, dos clases de crisis, la dolorosa y la aplásica. Un tercer tipo, hiperhemolítico, puede presentarse en los niños mientras el bazo es aún grande, pero probablemente, o no existe en los adultos o es consecuencia de otras complicaciones.

Por ejemplo, Diggs ha observado 747 crisis en 186 pacientes y no ha encontrado ninguna alteración significativa en el recuento de reticulocitos, en la bilirrubina, o en la excreción de urobilógeno durante o después de dichas crisis. Esto coincide con la experiencia de otros autores. (19)

CRISIS DE DOLOR: Pueden acontecer espontáneamente o ser

precipitadas por un estrés de cualquier tipo, incluyendo infección o exposición al frío.(8) 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 dolor intenso en una o ambas rodillas y piernas. Aumenta constantemente de gravedad y extensión, y muchas veces progresa hacia espalda, abdomen, ambos brazos, cuello y cabeza. El dolor puede afectar casi todo el cuerpo en plazo de unos minutos o después de varias horas; en ocasiones no progresa más allá de una o varias extremidades a un lado del cuerpo. (10) Existe habitualmente una elevación asociada de la temperatura de 38 a 40 C y leucocitosis a pesar que el dolor puede persistir durante varias semanas. los ataques duran, en general, de 4 a 6 días con espontánea y gradual desaparición del mismo.(39) En ocasiones las crisis son ligeras y solo duran uno o dos días; más frecuentemente el dolor es intenso y quizá no se alivie completamente con aspirina o narcóticos.(9)

CRISIS APLASICA: Se observa cuando una infección u otra causa de estrés precipitan una disminución notable en la velocidad de la eritropoyesis. Esto, en combinación con la hemólisis, ocasiona una dramática exacerbación de la anemia.(19)

El tipo arregenerativo de crisis hipoplásica que se manifiesta por hipoplasia o aplasia de los 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. Los factores que implican la insuficiencia de la médula ósea, muchas veces acompañada de una brusca disminución de la concentración de hemoglobina, no son bien conocidos. Los autores han observado el mismo paciente con anemia de hematíes en hoz durante diversas crisis de neumonía neumocócica; en ocasiones se ha desarrollado una crisis hipoplásica, otras veces una neumonía neumocócica no se acompaña de cambios importantes en los valores de sangre circulante. (10)

En las crisis aplásicas de los drepanocíticos esta indicada la transfusión como terapéutica primordial. (8)

9.0 DIAGNOSTICO

Tal como se ha mencionado en características clinicas los individuos con anemia drepanocitica pueden presentar una amplia variedad de síntomas; fiebre, dolores abdominales y en las articulaciones, soplos cardiacos, etc. Lo que puede simular una fiebre reumatica aguda. (19)

Es por ello que el diagnóstico que el laboratorio realiza es de gran importancia ya que con el se descarta o se confirma la presencia de la anemia hemolitica producida por drepanocitosis.

El análisis puede dividirse en dos partes, cada una con sus pruebas correspondientes:

La primera nos proporciona la evidencia de la presencia de la anemia, el grado que ha alcanzado y la sospecha de la drepanocitosis.

- a) Frotis sanguineo.
- b) Determinación de hematocrito (Hcto)
- c) Conteo celular.
- d) Determinación de hemoglobina.
- c) Velocidad de sedimentación globular (VSG).
- e) Conteo de reticulocitos.

La segunda nos confirma la presencia de una hemoglobina anormal causante de la anemia.

- a) Prueba de solubilidad con ditionina.

- b) Prueba microscópica sin agente reductor.
- c) Prueba microscópica del metabisulfito.
- d) Electroforesis en agar-citrato.
- e) Detección de la HbS en líquido amniótico.
- f) Prueba de las huellas dactilares.

Por otra parte por tratarse de un defecto de tipo genético se debe estudiar a los padres, hermanos y descendientes, del paciente. (18)

9.1 PRUEBAS PRIMARIAS

9.1.1 FROTIS SANGUINEO

FUNDAMENTO: Prueba diagnóstica que nos sirve para efectuar el conteo diferencial de los leucocitos (principalmete) , eritrocitos y para el diagnóstico de parásitos sanguíneos; esta se hace por medio de una extensión de sangre lo suficientemente delgada para poder apreciar y analizar al microscopio. Incluye diferentes tinsiones según el objeto de la prueba. (19)

INTERPRETACIÓN: Se podría decir que prácticamente en la extensión de sangre de los pacientes con rasgo de células falciformes (HbAS) a excepción de ocasionales células en hoz la morfología celular es normal. (18) En el caso de pacientes con HbSS como tal; en el frotis sanguíneo se llega a observar los signos usuales de eritropoyesis eficaz, tales como policromatofilia, en donde se ven glóbulos rojos en diferentes tonos de azul, los cuales son

reticulocitos que contienen restos de RNA combinados con la hemoglobina; indicando ésto, una hemólisis excesiva.(8) Además de la policromatofilia se observa un punteado basófilo, anisocitosis, poiquilocitosis, cuerpos de Howell-Jolly, eritrocitos conteniendo gránulos de hemociderina, eritrocitos nucleados y células blanco.(19)

9.1.2 DETERMINACION DE HEMATOCRITO (Hcto)

FUNDAMENTO: El hematocrito es la prueba diagnóstica que mide el volumen que ocupan los hematies, cuando un volumen conocido de sangre compleja se somete a centrifugación, a una velocidad constante y durante un período de tiempo constante. El resultado obtenido se expresa como el porcentaje (%) de los globulos rojos.(53)

INTERPRETACION: El porcentaje disminuido de hematocrito, es indicativo de un estado de anemia; en los pacientes con HbS el Hcto se encuentra por debajo del nivel normal.(19)

9.1.3 CONTEO CELULAR

FUNDAMENTO: Es un examen fundamental que se practica de una manera sistemática, que estriba en el recuento de eritrocitos y leucocitos. A pesar de métodos automáticos especializados, actualmente se siguen usando la técnica de hemocitómetro.(18)

INTERPRETACION: Una disminución en el número de eritrocitos indica una posible anemia.(8) En la anemia por drepanocitosis el número

de eritrocitos generalmente se encuentran por debajo del valor normal(20) los resultados que se obtienen del conteo eritrocítico en pacientes adultos con HbS se encuentra en tre 2 y 3.5 millones/mm³.(8) La baja de globulos rojos que se registra en estos pacientes es debida a la excesiva destrucción que sufren las células en éste padecimiento.(18) En el caso de la cuenta de los leucocitos del paciente portador de HbS se tiene que es común encontrar una leucocitosis (hasta 30 000) y puede estar asociada con monocitosis (5 a 25%).(25)

9.1.4 DETERMINACION DE HEMOGLOBINA

FUNDAMENTO: Los derivados de la hemoglobina contenidos en la sangre (excepto la verdoglobina) por medio de una solución reactiva se transforma cuantitativamente en cianuro de hemoglobina (denominación anterior : cianometahemoglobina) utilizando el reactivo de Drabkin, la transformación concluye a los 3 min.(18)

INTERPRETACION: El resultado de una concentración baja de hemoglobina generalmente es indicativa de la presencia de algún tipo de anemia, (comunente de tipo hipocrómico ó normocrómico) independientemente de la que se este tratando de diagnosticar. (8) En el caso particular de la anemia drepanocítica, causada por la HbS, la concentración de hemoglobina es disminuida; dicha disminución sirve de apoyo para afirmar que el tipo de anemia causada por la HbS es normocromica y normocítica.(53)

9.1.5 VELOCIDAD DE SEDIMENTACION GLOBULAR (VSG)

FUNDAMENTO: El fundamento básico de esta prueba es que, la sangre es una suspensión de elementos, estructuras o sistemas individuales cada uno cumpliendo sus funciones en el plasma por lo tanto la sedimentación de los eritrocitos es un fenómeno que se observa siempre en una muestra de sangre que se ha hecho incoagulable y en posición vertical, puesto que por gravedad son más pesadas en el plasma; pero la rapidez de esta sedimentación puede ser variable por el cambio de las propiedades fisicoquímicas del plasma, por lo que su determinación nos es útil para el diagnóstico de procesos infecciosos u orgánicos así como para seguir su evolución, en donde estas propiedades se ven alternas. (23)

INTERPRETACION: Esta prueba en particular se presenta un tanto acelerada (pero no tanto en comparación con otro tipo de anemia) en pacientes con HbS, muy probablemente por el ordenamiento de eritrocitos en una especie de apilación debiéndose esto a la transformación del eritrocito en forma falciforme. (19)

9.1.6 CONTEO DE RETICULOCITOS

FUNDAMENTO: Los reticulocitos son células precursoras de los eritrocitos maduros, poseen un retículo que se tiñe con el colorante, azul de crescil brillante o el nuevo azul de metileno, este retículo disminuye a medida que la célula madre; en ésta no se encuentra. (53)

INTERPRETACION: Las personas afectadas por la HbS presentan una reticulocitosis. Indicada por un IR=7.2 en mujeres menores de 12 años, un IR=4.9 en mujeres mayores de 12 años, un IR=5.7 en hombres menores de 12 años y un IR=4.7 en hombres mayores de 12 años. Recordando que un IR > 3 es indicativo de anemia hemolítica. En la crisis aplásica, el recuento de reticulocitos dará como resultado cero o una cifra muy cercana en la anemia por drepanocitosis. (47)

9.2 PRUEBAS SECUNDARIAS

9.2.1 PRUEBA DE SOLUBILIDAD: DITIONINA.

FUNDAMENTO: La ditionina reduce la HbS y es insoluble en los tampones inorgánicos concentrados. Los polímeros de HbS reducida impiden que los rayos de luz atraviesen la solución. Esta prueba resulta particularmente útil para la exploración de la HbS en gran número de personas. (19)

TECNICA:

- Colocar 0.02 ml de sangre en tubo de ensayo de 12 mm de diámetro. Añadir 2 ml del reactivo de precipitación. Invertir el tubo 3 veces para mezclar su contenido y, después de 3 min de incubación a temperatura ambiente comprobar su opacidad o transparencia. Se considera que la solución es opaca siempre que no se pueda leer una letra impresa de papel periódico a través de la solución a una distancia de 2.5 cm del tubo y con buena

iluminación. (18)

INTERPRETACION: La opacidad indica una Hb insoluble que casi siempre es HbS (o hemoglobina falciforme no HbS), indistintamente en el estado homocigótico, heterocigótico o heterocigótico mixto. (19)

9.2.2 DREPANOCITOSIS: PRUEBA MICROSCOPICA SIN AGENTE REDUCTOR.

Si no se dispone de una solución reductora, puede colocarse una gota de sangre sobre un porta objetos aplicando un cubre objetos por encima de éste. En la anemia drepanocítica se observa a las pocas horas la formación de células en forma de hoz, lo cual requiere más tiempo en los casos de rasgo drepanocítico. Si se coloca una banda de goma alrededor del dedo para desoxigenar la sangre in vivo antes de obtener la muestra por punción cutánea se consigue acortar con ello el tiempo necesario para efectuar esta observación. (18)

9.2.3 PRUEBA MICROSCOPICA DEL METABISULFITO.

FUNDAMENTO: Las células desoxigenadas que contienen HbS presentan un aspecto falciforme. El proceso de desoxigenación aumenta al añadir una sustancia reductora a la preparación. (18)

TECNICA:

- Se añade una gota de sangre a dos gotas de metabisulfito de sodio al 2% recién preparado (se obtiene fácilmente en forma de cápsulas de 200 mg. dispuestas para su adición a 10 ml. de agua

destilada). Se coloca un cubre objetos encima del porta, el cual puede sellarse con vaselina o guardarse en una cámara húmeda, preferiblemente a 37 C. A modo de control se hace otra preparación similar pero con suero salino en lugar de hacerla con el agente reductor. Los porta objetos se examinan al microscopio con el objetivo seco de gran aumento a los 30 min., a las 2 hrs y a las 24 hrs antes de concluir que la prueba es negativa.

La drepanocitosis se observa mejor en los bordes del cubreobjetos. Las pruebas parcialmente falciformes presentan la forma de hoja de acabo.(53)

INTERPRETACION: la prueba no distingue la anemia drepanocítica de la presencia de rasgo drepanocítico u otros síndromes de la HbS; todas las células adoptarán un aspecto drepanocítico, puesto que la HbS se distribuye de forma homogénea entre ellas, también producirá drepanocitosis.(19)

9.2.4 ELECTROFORESIS EN AGAR-CITRATO.

FUNDAMENTO: Las moléculas de hemoglobina en una solución ácida tienen una carga neta positiva y se mueven hacia el cátodo; exceptuando la HbS Y HbC que al mantener su carga negativa su dirección de corrimiento es hacia en ánodo en un sistema electroforético a una velocidad proporcional a la fuerza de su carga. Pueden idearse diferentes tipos de aparatos para la electroforesis de las hemoglobinas. El hemolisado se aplica a un medio de suspensión (papel filtro, acetato de celulosa, gel de

almidón y gel de agar) entre cámaras que contienen una solución tampón que se aplica a un voltaje constante. (18)

TECNICA:

- Lavar los eritrocitos problema y testigo con solución salina (1:1000) hasta que el sobrenadante quede claro. Al paquete se le agrega un volumen de agua destilada y 1 ml. de cloroformo, agitar y dejar en reposo. Del sobrenadante del lisado se toma una muestra que se corre a 250 volts. 30 min. (Buffer a pH 8.0). Tefir con benzidina durante 5 min. Lavar con ácido acético 3 o 4 veces. Fijar con formol al 30 % durante 1 min. Lavar con glicerol al 7 % durante 3 min. y colocar sobre un vidrio y secar al horno.

Nota: Buffer (citrato de sodio a 0.05 M y ácido cítrico al 30 %).

RESULTADOS E INTERPRETACION:

Con la finalidad de una comparación se muestran en la figura 9.1 dos diferentes medios de corrimiento: acetato de celulosa y agar-citrato.

El acetato de celulosa a pH alcalino representa un método práctico para la electroforesis habitual de la hemoglobina; en dicho medio se observa la separación de la HbS, F, C, A, y A₂. El problema de este medio de suspensión para la determinación de Hb, es que en la misma banda de la HbS, se presenta la D y G, lo que hace menos específica este tipo de electroforesis. (13)

La electroforesis en agar-citrato a un pH ácido facilita la separación de las hemoglobinas que se desplazan conjuntamente en acetato de celulosa: S de D y G, y C de E y O; lo que hace mas

especifica esta electroforesis. (19)

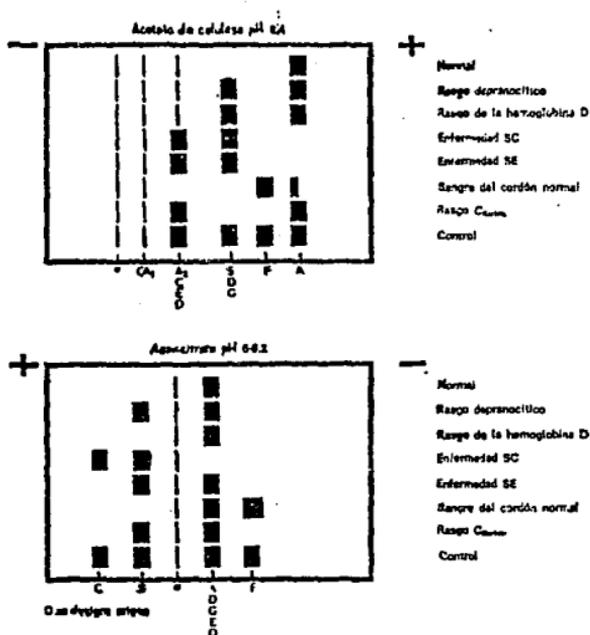


Fig. 9.1 Electroforesis de la hemoglobina. Comparación de diversas muestras de hemoglobina en acetato de celulosa y agar-citrato, que demuestra las movilidades relativas. El control es una muestra completa-compuesta. Las cantidades relativas de hemoglobina no son necesariamente proporcionales al tamaño de la banda; por ejem. en el rasgo falciforme (HBAS), la cantidad de la hemoglobina A, siempre es superior a la de la HbS. (19)

9.2.5 DETECCION DE LA HbS EN LIQUIDO AMNIOITICO

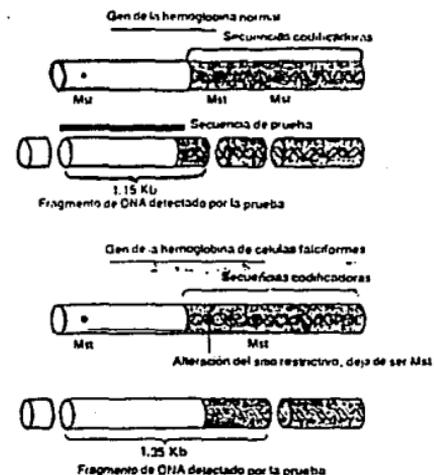
FUNDAMENTO: Para saber si un feto desarrollará la enfermedad de células falciformes (HbS) es necesario examinar el DNA de las células del líquido amniótico, y no las de su sistema circulatorio. La secuencia de las bases del alelo de la HbA, que codifica para ácido glutámico y sus aminoácidos vecinos, contiene un sitio de reconocimiento para la enzima restrictiva MstII. El cambio en una sola base del alelo de la HbS, es suficiente para prevenir el rompimiento de la molécula de DNA por la enzima restrictiva, en el sitio correspondiente. (25)

DESCRIPCION DE LA TECNICA:

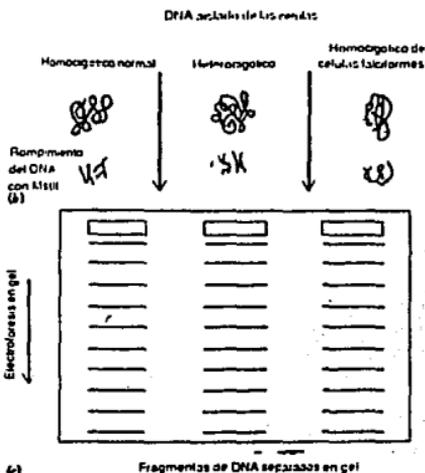
- a) El gen de la hemoglobina normal posee sitios restrictivos para la enzima MstII, la cual rompe el DNA, formando fragmentos de 1.15 Kb. El cambio mutante de una sola base que produce la formación del gen de la hemoglobina de la anemia de células falciformes, altera el sitio de acción de la enzima MstII en el DNA. Cuando la MstII rompe el gen anormal de hemoglobina, se produce un fragmento de 1.35 Kb.
- b) Este gen es detectado mediante el aislamiento del DNA total de células obtenidas del líquido amniótico y el rompimiento de este DNA con la enzima MstII, luego; los fragmentos se separan mediante electroforesis en gel.
- c) El DNA del gen se transfiere a filtros de nitrocelulosa, en los que se somete a hibridación con una prueba de DNA radiactivo de un fragmento clonado con MstII, de 1.5 Kb del gen de la HbA.

Las secuencias de DNA complementarias de la prueba se detectan mediante su exposición a un filtro para rayos X.

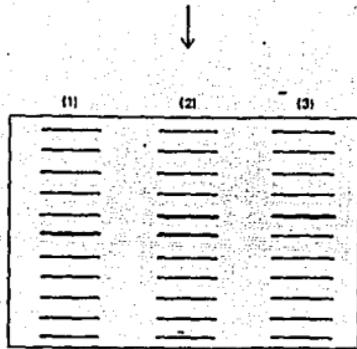
d) Los individuos homocigóticos normales muestran una banda simple expuesta en la placa, localizada en una posición correspondiente a un peso molecular de 1.15 Kb. El DNA de individuos homocigóticos para el gen de la anemia de células falciformes muestra una banda simple de 1.35 Kb. Los heterocigóticos poseen una de cada gen, el DNA de estos individuos produce dos bandas, en las posiciones correspondientes de 1.35 y 1.15 Kb. (50)



(a)



(b)



INTERPRETACION: Las técnicas de ingeniería genética se utilizan en la caracterización y detección de distintas enfermedades genéticas. Estudios tempranos de esta clase se efectuaron en relación con la enfermedad de células en hoz, ya que dicha enfermedad produce una anomalía proteínica bien caracterizada. (25)

Cuando el DNA humano normal se rompe con la enzima MstII, se detecta una banda radiactiva en el filtro secante, dicha banda corresponde a una molécula de DNA que tiene 1.15 Kb de longitud. debido a que el sitio de restricción ha desaparecido en los individuos que presentan el gen de la anemia de las células en hoz, se detecta un fragmento de longitud mayor: su longitud es 1.35 Kb. Los individuos heterocigóticos poseen una copia del alelo normal y una del alelo de la enfermedad de células falciformes. Al analizar el DNA de estos individuos, pueden detectarse dos tipos de bandas en las pruebas que corresponden a los fragmentos de 1.15

y 1,35 Kb de longitud. De esta manera es posible distinguir a los individuos homocigóticos normales, de los homocigóticos recesivos y de heterocigóticos portadores. (29) Hoy día los métodos de pruebas de DNA para detección, no se utilizan en la identificación de la anemia de células en hoz en adultos debido a que pueden detectarse en forma más sencilla la HbS de estos individuos, analizando directamente las proteínas de hemoglobina de los pacientes sospechosos. (50)

9.2.6 PRUEBA DE LAS HUELLAS DACTILARES. (Modificación de la técnica de Sanger del análisis de proteínas) ver referencia (26)

FUNDAMENTO: Las cadenas polipeptídicas de la Hb son rotas en fragmentos peptídicos por medio de la enzima tripsina, que rompe específicamente los enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo de la lisina o la arginina y el grupo amino del otro aminoácido, los péptidos más cortos resultantes son separados por la combinación de electroforesis en papel y cromatografía en ángulo recto a la dirección de la electroforesis. (48)

DESCRIPCION DE LA TECNICA E INTERPRETACION:

- Se somete la hemoglobina a la digestión con tripsina.
- Los péptidos más cortos resultantes se separan por una combinación de electroforesis en papel y cromatografía.
- Este tratamiento produce 30 manchas identificables (48) recibiendo un número distinto. Los fragmentos peptídicos

separados forman entonces la huella dactilar de la proteína. (31)

- La figura 9.2 muestra un diagrama de los resultados obtenidos con hemoglobina normal y hemoglobina de anemia falciforme. En ambos esquemas los fragmentos peptídicos muestran una posición idéntica salvo el fragmento 4, que es uno de los fragmentos derivados de la cadena polipeptídica β .
- El análisis de la secuencia de aminoácidos del fragmento 4 de la HbA y HbS demuestran una diferencia en el sexto aminoácido.

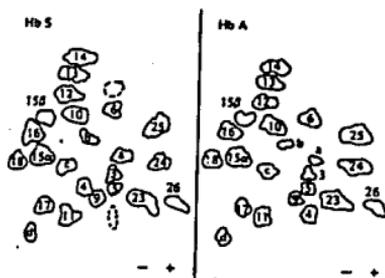


Fig. 9.2 Diagrama de la huellas dactilares de la HbA y de la HbS. Comparación cromatográfica de péptidos producidos por digestión con tripsina, mostrando un desplazamiento de posición el péptido 4. (46)

Los resultados obtenidos se observan en la tabla 9.3; indicando que la HbA tiene un ácido glutámico en la posición seis, mientras que la HbS posee valina en esa posición. (25)

Tabla 9.3 Resultados de los análisis de las secuencias de aminoácidos del péptido 4 de la cadena β de la HbS y HbA. (25)

Tipo de Hb	Aminoácidos numerados en orden.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	val	his	leu	treo	pro	ac. glu	ac. glu	lis
S	val	his	leu	treo	pro	val	ac. glu	lis

10.0 TRATAMIENTO

No hay tratamiento efectivo para el individuo relativamente asintomático que sufre una anemia por drepanocitosis sin complicaciones; los intentos de tratarlo pueden perjudicarlo. Por ejemplo aunque unos pocos casos escogidos puedan exigir transfusión, ésta puede originar un incremento en la frecuencia de hepatitis infecciosa y conducir a una hemosiderosis. (19) De cualquier manera, el único medio actualmente disponible para normalizar los valores de la sangre son las transfusiones. No se emplea para mantener la sangre en valores normales, pero los pacientes con esta enfermedad se adaptan muy bien a los valores bajos de hemoglobina. Las transfusiones son útiles durante períodos de crisis aplásica, crisis abdominales, y en cualquier otro momento cuando el paciente está muy grave. Es posible que también permitan pasar un embarazo o una intervención quirúrgica, porque las transfusiones múltiples deprimen la eritropoyesis y disminuyen en el porcentaje de células semilunares en la circulación periférica. (21)

Además de que se ha observado, que al aplicar una transfusión (acompañada de fármacos de eficacia limitada) en los pacientes con anemia de células falciformes éstos alivian notablemente su dolor. (19) Las transfusiones llamadas de recambio parciales, que cambian la extracción de la sangre del paciente con la sustitución de células aglomeradas, aumentan la concentración de hemoglobina y

disminuyen la de células en hoz más rápidamente que la transfusión sola. El intercambio es particularmente deseable en pacientes con insuficiencia cardíaca franca o incipiente, y puede lograrse sin aumento del volumen de sangre. No sabemos si tal tratamiento, efectuado con intervalos regulares, pueda disminuir la frecuencia de crisis. El valor de estas medidas en las crisis y en el embarazo ha sido confirmado en varios informes. (25)

El hierro no sirve y, si se administra, también incrementa la hemosiderosis. Tampoco la vitamina B₁₂ es de utilidad; en cambio, el ácido fólico puede ser útil para evitar cambios megaloblásticos en presencia de una eritropoyesis aumentada. (9)

Estudios recientes han demostrado que el ácido fólico; administrado por vía oral en dosis de 5 a 10 mg diariamente, corrige las manifestaciones hemopoyéticas y gastrointestinales por deficiencia de vitamina B₁₂. (8)

Por otra parte se han combinado el tratamiento de ácido fólico con un suplemento de zinc oral; arrojando buenos resultados. (9)

Se han utilizado varias medidas intentando disminuir la producción de glóbulos en hoz, y así aliviar la gravedad de los síntomas en éstos enfermos. Entre ellas se hallan cortisona, ACTH, tolazolina, bicarbonato de sodio y acetazolamida.

Desgraciadamente ninguno de éstos agentes puede considerarse de valor demostrado. (25) Los enfermos pueden estar muy graves durante episodios de crisis. Por entonces son necesarias transfusiones sanguíneas y antibióticos. Parece justificado

utilizar antibióticos por breve tiempo, incluso cuando no puede demostrarse la presencia de una infección, porque éstos episodios van precedidos de infartos. El oxígeno no tiene valor en el tratamiento de la crisis de drepanocitosis a menos que exista enfermedad pulmonar, porque la hemoglobina que queda es completamente oxigenada en los pulmones. (10)

A. Cerami y J.M Manning han estudiado que tratando eritrocitos de pacientes con anemia falciforme con cianato sódico in vitro, se impide en gran manera la deformación de las células cuando disminuye la tensión de oxígeno; tales células sobreviven un tiempo más prolongado y aparentemente funcionan mejor que las células falciformes no tratadas cuando son devueltas al paciente.

El tratamiento con cianato provoca la carbamilación del grupo amino-libre en el resto de la valina N-terminal de la hemoglobina S. Esta reacción provoca el efecto de eliminar la carga eléctrica positiva que se halla normalmente presente en éste grupo amino. Se pone así de manifiesto que la alteración de un solo grupo cargado en la molécula de la hemoglobina, puede corregir su conformación, de suerte que la molécula se oxigena y desoxigena otra vez normalmente sin deformación significativa. Este efecto de cianato se está estudiando para probar su posible utilidad en el tratamiento clínico de las crisis que se producen en la anemia falciforme. (26)

Otro tipo de sustancia que se utilizó para disminuir los primeros síntomas de la enfermedad fué la urea, (41) administrada

por via intravenosa en una dosis de 0.1 a 1.0 g /kg de peso corporal.(9) pero dado que ésta sustancia era demasiado colateral se restringió su uso. (41)

Por otro lado, dado que la hemoglobina S sufre una polimerización el 5-bromotriptófano ha demostrado ser un excelente agente que impide dicha polimerización. (11)

El priapismo, complicación grave y dolorosa, que muchas veces origina impotencia se ha tratado con buen resultado, en dos pacientes por lo menos, con un derivado del veneno de serpiente de cascabel (Arvin) que produce desfribinación.(28)

La esplenectomía está raramente indicada a menos que el órgano sea extremadamente grande y se halla demostrado que es un factor importante en la destrucción extravascular de la sangre.(2) La esplenectomía a veces resulta beneficiosa en niños. (19)

Si las úlceras crónicas de las piernas son un problema, deberán ser tratadas a base de reposo en cama, desbrindamientos cuidados locales y antibióticos, por ejemplo, a base de penicilina.(18)

Estas úlceras se pueden curar efectuando transfusiones de sangre al enfermo y manteniendo su hemoglobina por encima de los 10 g /100ml. También puede ser preciso el injerto de piel.(19)

Como en la anemia drepanocítica el tratamiento no ha sido eficaz, debe insistirse más en la prevención del transtorno. Si bien esta enfermedad se observa una vez por cada 500 nacimientos en personas de raza negra y significa una supervivencia media de solamente 20 años, se ha prestado relativamente poca atención al tratamiento de las personas afectadas.(29)

11.0 REFERENCIAS

- 1.- Anson, J.; Koshy, M. et al. (1991) Subarachnoid hemorrhage in sickle cell disease. *J-neurosurg.* 7(4) pp 552-8.
- 2.- Anyaibe, S., Castro, O. et al. (1985) Distribution of hemoglobins A and S among erythrocytes of heterozygotes. *Hemoglobin*, 9(2) pp 137-155.
- 3.- Ayala, F.; Kigner, J. *Genética moderna*, Ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A. 1a ed. Barcelona 1989.
- 4.- Briehl, R.; Mann, E.; et al. (1990) Length distributions of hemoglobin S fibers. *J. Mol. Biol.*; Vol. 211 No 4 pp 693-698.
- 5.- Cantarow, Shepartz. *Bioquímica*. Ed. Interamericana. 4a ed. México 1989.
- 6.- Cawein, J.; O'Neill, R.; Danzer, L. et al. (1969) A study of the sickling phenomenon and oxygen dissociation curve in patients with hemoglobins SS, SD, SF and SC. *Blood*, Vol 34, No 5 pp 682-690.
- 7.- Clinton, J. (1990) Deoxygenation-Induced cation fluxes in sickle cell. II. Inhibition by stilbene disulfonate. *Blood*, Vol. 76 No 1 pp 212-220.
- 8.- Curtis, H. *Biología*. Ed. Médica panamericana, 4a ed., México 1990.
- 9.- Drill. *Farmacología Médica*. Ed La Empresa Médica Mexicana, 2a ed. México 1988.
- 10.- Dudley, a.; Waddell, C. (1991) Crisis in sickle cell trait. *Hum-pathol.* 22(6) pp 616-8.
- 11.- De Cross, P.; Sangdee, P. et al. (1990) Hemoglobin S antigelation agents based on 5-bromotryptophan with potential for sickle cell anemia. *J. med. Chem.* VOL 33, No.12 pp 3138-3142.
- 12.- Dimousky, A.; Altay, C. et al. (1992) Sequence variations in the 5 hypersensitive site-2 of the locus control region of β^S chromosomes are associated with different levels of fetal globin in HbS homozygotes. *Blood*, Vol 79, No 3 813-819.

- 13.- Ferrati, P.; Malorni, A.; Pucci, P. et al. (1991) Capillary zone electrophoresis and mass spectrometry for the characterization of genetic variations of human hemoglobin. *Anal-Biochem*, 194(1) , pp 1-8.
- 14.- Gardner, E. Principios de genética. Ed. Limusa, 5a ed. 1a reimpression. México 1990.
- 15.- Gendrel, D.; Kambila, M. et al (1991) Protection against plasmodiumfalciparum infection in children with hemoglobin S. *Pediatr-Infect-dis-J*, 10 (8) pp 620-621.
- 16.- Gonzalez, J.; Kutlar, A. et al (1991) Molecular Characterization of HbS (c) bete thalassemia in American blacks. *Am-J-Hematol*, 38(1) pp 9-14.
- 17.- Goodenough, U. Genética Harvard. Ed. Omega, 1a ed. Barcelona 1981.
- 18.- Henry. Diagnostico y tratamiento clinico por el laboratorio. Vol I, Ed. Salvat Editores, 7a ed. México 1984.
- 19.- Henry, R. Química clinica, Principios y técnicas Tomo II Ed. JIMS, 2a ed. Barcelona 1988.
- 20.- Hillman, R. Manual de hematologia. Ed. El manual moderno, 2a ed. México 1988.
- 21.- Hebbel, R. (1991) Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*, 77(2) pp 214-37.
- 22.- International Hemoglobin Information Center. (1993). *Hemoglobin*, 17 (2) pp 89-177.
- 23.- Javett, L. Métodos Diagnósticos del laboratorio clínico. Vol I Ed. Médica Panamericana, 8a ed. Buenos aires, 1991
- 24.- Kutlara, a.; Hattoria, y.; Klutara, F. et al (1985) Hematological observations con Arabians SS pacientes with a homozygosity of heterozygosity for A $\beta 6$ Chromosome with haplotyp No 31. *Hemoglobin* 9 (6) pp 545-557.
- 25.- Leavell, B. hematologia Clinica. Ed. Interamericana, 4a ed. México 1989.
- 26.- Lehninger, Bioquímica. Ed. Ediciones omega, 2a ed. Barcelona 1988.
- 27.- levine, L. Biología del gen. Ed. Ediciones omega. S.A. 1a ed. Barcelona 1990.

28. - Levine, R. genética. traducción de la 2a edición 4a Impresión México. 1988.
29. - Levison, S. Clinical laboratory diagnosis. Ed. LEA y Febiger, 1a ed. Philadelphia, 1985.
30. - Lewin, B. Genes. Ed Reverte, 3a ed. España 1989.
31. - Linch, M. Métodos de laboratorio. Tomo II. Ed. Interamericana, 2a ed. México 1990.
32. - Losek, J. (1991) Sickle cell screening practice in pediatric emergency departments. *Pediatric Emergency care*, 7 (5) pp 278-280.
33. - Lawrence, C.; Fabry, M.; Nagel, R. (1991) The unique red cell heterogeneity of SC disease crystal formation, dense reticulocytes and unusual morphology. *Blood*, Vol 78, No. 2104-2112.
34. - Molchanova, T.; Huisman, T. (1993) Allele Specific amplification for the identification of several hemoglobin variants. *Hemoglobin*, 17 (5) pp 439-452.
35. - Messmann, R.; Gannon, S.; Sharada, S. et al (1990) Mechanical properties of sickle cell membranes. *Blood*, Vol 75, No. 8 pp 1711-1717.
36. - Miner, P.; Kraus, A.; Scbes, J. et al (1991) Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *Nw-England Journal of medicine*, 325 (21) pp 1476-1481.
37. - Pagnier, J.; Girot, r.; Baudin, U. et al. (1981) Sickle cell
38. - Postnikov, V.; Molchanova, T. et al (1993) Allele-specific amplification for the identification of several hemoglobin variants *Hemoglobin*, 17 (5) pp 439-452.
39. - Powars, D.; Elliott, D.; Chan, L. et al. (1991) Chronic renal failure in sickle cell disease risk factors clinical cause and mortality. *Ann-Intern. Med.*, 115 (8) pp 614-620.
40. - Phillips, G.; Coffey, B. et al. (1991) Reactions hip of clinical senty to packed cell rheology in sickle cell anemia. *Boll*, Vol 78, No 10, pp 2735-2739.
41. - Ranney, H. (1972) Editorial Sickle cell disease. *Blood*, Vol 39, No. 3, pp 452-439.

- 42.- Rhoda, m.; Apovo, M. et al (1990) Caz permeability in deoxygenated sickle cells. Blood, Vol 75, No 12 pp 2453-2458.
- 43.- Rao, M.; Acharya, A. (1991) Basic carboxil groups of hemoglobin S: influence of oxy-deoxy conformation the chemical reactivity of glu-43 (beta). J-Protem-Chem, 10(1) pp 129-32.
- 44.- Stern, C. Genética humana. Ed. Alhambra, 3a ed. España 1985.
- 45.- Stansfield, W. Genética. Ed Mc Graw-Hill, 2a ed. México 1988.
- 46.- Strickberger. Genética. Ed. Ediciones omega, S.A. 3a ed. España 1988.
- 47.- Schilliro, G.; Samper, P. (1992) CLinical, Hematological and Molecular fetures,. Hemoglobin, 16 (6) pp 469-480.
- 48.- Samperi, P.; Dibenedetto, S. et al. (1990) Unusual sickle cell disease observed for the first time in Italy: HbS-HbD los angeles. Haematological, 75 (5) pp 464-6.
- 49.- Shackleton, C.; Falick, A. et al (1991) Electrospray mass espectrumetry in the clinical diagnosis of variant Hemoglobins. J. chromatogr., 562 (1-2) pp 175-90.
- 50.- Trent, R.; Davis, B.; et al. (1984) Indentification of β -variant, hemoglobins By DNA restriction endonucleasa mapping. Hemoglobin, 8 (5) pp 443-462.
- 51.- Ville, S. Biología. Ed. Interamericana, Mc Graw-Hill. 2a ed. México, 1992.
- 52.- Wattson. Biología Molecular del gen. Ed. Fondo Educativo Interamericano, 5a ed México 1987.
- 53.- Williams, Hematología, Vol I, Ed. Salvat Editores, 1a ed.. México, 1985.
- 54.- Woodlife, H.; Hermann, D. Hematología Clínica.. Ed. EL manual moderno 2a ed, México 1981.
- 55.- Williamson, ...; Pachulu, E. et al (1990) Erythocyte membrane abnormalities in sickle cell disease. Biotechnol-App. Biochem. 12(5) pp 523-528.

56. - Witkowska, E.; Bertram, H.; Baruchel, S. et al (1991) Sickle cell disease in patient with sickle cell trait and compound heterozygosity for hemoglobina S and hemoglobina Quebec-Chori. Brief report. The New England Journal of Medicine. pp 1150-1154.
57. - Whitley, E., Annison, G.; et al (1980) The detection and use of hemoglobin mutants in the direct analysis of human globin genes. Blood, Vol 55 No 8 pp 1060-1062.
58. - Zachowski, A., Blumenfeld, N. et al (1991) Transmembrane mobility of phospholipids in sickle erythrocytes, effect of deoxygenation on diffusion and asymmetry. Blood, Vol 77 No 4 pp 849-854.
59. - Hochmuth, R; Kinney, E; Coffey, B, et al (1993) Relationship of Clinical Severity and Packed Cell Rheology in Sickle cell Anemia. Blood, 70(10) pp 2735-2739.
60. - Nagel, R; (1993) Severity, pathobiology epistatic affects, and genetic markers in sickle cell anemia. Semin-hematol 28(3) p180-201.
61. - Aseva, E; Lutsenko, I; et al. (1993) Abnormal hemoglobins A beta 6 Glu- Val and C beta 6 Glu-Lys in the Republic of Guinea. Gematol-Transfuziol, 36(19) p35-37.
62. - Rank, B; Carlsson, H; et al (1993) Abnormal redox status of membrane-protein thiol in sickle erythrocytes. J.Clin Invest. 75 :1531.
63. - Franck, P; Bevers, E; et al (1993) Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer. The cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant, activity of sickled cells. J.Clin Invest. 75: pp 183-85.
64. - Jacques, E; Berg, E, et al. (1993) Sequence variation in a negative control region 5 to the β -globin gene correlated with the phenotypic expression of the β S mutation. Blood, 79(3) pp 787-792.
65. - Craescu, C; Zachowski, A. et al Abnormality of phospholipid transverse diffusion in sickle erythrocytes. J.Clin Invest. 75:1713-18. (1993)
66. - Choe, H; Schlegel, R; et al (1993) Alteration of red cell membrane organization in sickle cell anemia. Br. J. Haematol 63: 761- 65.