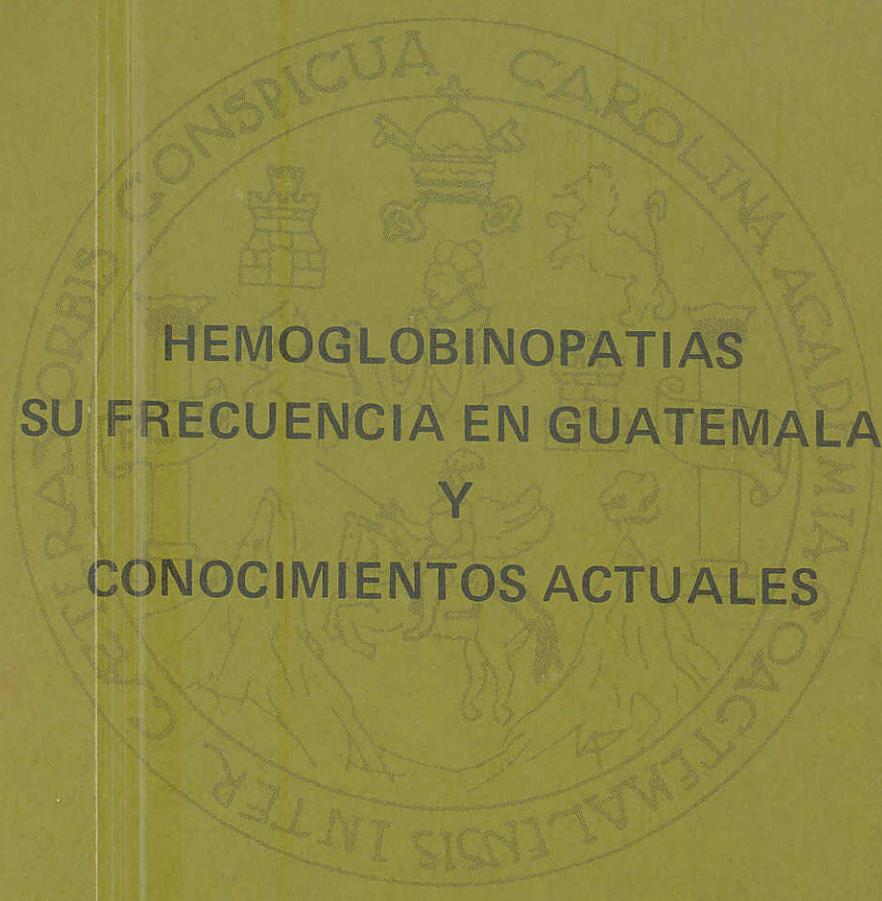


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS



**HEMOGLOBINOPATIAS
SU FRECUENCIA EN GUATEMALA
Y
CONOCIMIENTOS ACTUALES**

MIGUEL A. GARCES DE MARCILLA BOBES

Guatemala, Mayo de 1974.

CONTENIDO

Introducción

Material y Métodos

Resultados

Generalidades sobre las hemoglobinopatías

La estructura de la hemoglobina

Descripción de hemoglobinas humanas normales

Control genético de la síntesis de hemoglobina

Descripción de hemoglobinas anormales

Diagnóstico de laboratorio para hemoglobinopatías

Mecanismos patofisiológicos en las hemoglobinopatías

Cuadro clínico del rasgo drepanocítico A/S

Anemia de células falciformes

Tratamiento de la anemia de células falciformes

Epidemiología de las hemoglobinopatías

Programas de detección en masa y consejo genético

Discusión de resultados

Recomendaciones

Bibliografía.

INTRODUCCION

Las hemoglobinopatías son un grupo de enfermedades causadas por un trastorno genético que altera la síntesis de la hemoglobina y no es ligado al sexo. En unos casos actúa cambiando el tipo o la secuencia de aminoácidos de las cadenas globina y en otros originando una síntesis deficiente de las hemoglobinas normales lo que provoca una alteración importante en la proporción de las mismas dentro del eritrocito normal.

La severidad de estas enfermedades varía grandemente, habiendo algunas que no producen sintomatología clínica de importancia, y otras que causan trastornos hematológicos severos que acortan la vida. La enfermedad usualmente es más grave cuando es causada por la presencia homocigótica de alguna de las hemoglobinas anormales, principalmente la "S" y la "C". Para que ocurra la forma homocigótica tiene que haber unión entre dos personas portadoras del gene responsable, las que pueden ser homo o heterocigotas. La probabilidad que la descendencia sea homocigótica está determinada por la característica genética de los padres (homo u heterocigotos) y por la combinación al azar que sufren los genes.

Sabemos, por estudios en otros países, que las hemoglobinas anormales son más frecuentes en negros, siendo la "S" y la "C" las que más comunmente se presentan.

La hemoglobinopatía más frecuente en Guatemala es la anemia de células falciformes que es causada por la forma homocigótica de la hemoglobina "S", se presenta casi exclusivamente en negros y produce manifestaciones clínicas importantes por lo que es relativamente fácil de diagnosticar. La situación no es así cuando esta hemoglobina se presenta en forma heterocigota asociada a la hemoglobina A pues entonces no se producen síntomas clínicos bajo condiciones normales, por lo que su diagnóstico es puramente a base de pruebas de laboratorio. Creemos que es importante conocer entonces la frecuencia de estos casos heterocigotos, asintomáticos, dentro de

la población general, para así conocer la probabilidad de formación de parejas entre personas portadoras las cuales correrán el riesgo de tener hijos homocigóticos.

En Guatemala desconocemos la frecuencia con que se presentan las hemoglobinas anormales, principalmente en su forma heterocigota.

Hemos efectuado una investigación en la población guatemalteca con el objeto de determinar la frecuencia de las mismas entre las personas de raza negra y entre personas mestizas en las cuales no hay ascendencia negra. Existen algunos estudios previos a este respecto efectuados en Guatemala. Paiz (38) investigó 99 personas de raza "indígena pura" y encontró un caso de hemoglobina A/S en un residente de Amatitlán. En este caso es difícil llegar a alguna conclusión con respecto a la presencia de esta variante en persona "no-negra" pues como sabemos, en Amatitlán, en la época colonial hubo fuerte inmigración de negros y este caso pudiera tratarse de un descendiente de tales personas. Tejada (51) y Avendaño (3) efectuaron pruebas de "formación de drepanocitos" entre un grupo de negros de Livingston y de Puerto Barrios, pero no identificaron las hemoglobinas causantes de esta anomalía, por lo que no podemos saber que variantes se encuentran en esa población.

Se trata con este trabajo, de ofrecer un pequeño aporte al conocimiento de la patología nacional. Debido a que la mayoría de la información respecto a estas enfermedades, y específicamente a la anemia de células falciformes, es escasa, algunas veces no actualizada y en su mayoría en idioma inglés, se decidió hacer una revisión de la literatura médica al respecto, tratando de cubrir los aspectos principales en cuanto a mecanismos genéticos y fisiopatológicos, diagnósticos clínico y de laboratorio, tratamiento y epidemiología. Se ha puesto especial énfasis en lo concerniente a anemia de células falciformes por ser la más frecuente en nuestro país.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas y entidades que con su ayuda hicieron posible la

elaboración de este trabajo: al doctor Rodolfo Lorenzana por su cuidadosa asesoría y haber facilitado el equipo de laboratorio, al doctor Jaime Cohen por su acuciosa revisión, al Dr. Raúl Aldana por su valiosísima ayuda en la obtención de las muestras de sangre en Puerto Barrios, a la señorita Gloria M. Garcés por su ayuda técnica y a los hospitales Roosevelt de Guatemala y Nacional de Puerto Barrios por permitirme tomar muestras de sangre de entre sus pacientes.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 2 grupos de población. Uno de 83 personas fenotípicamente negras, residentes en Puerto Barrios, Izabal, que fueron escogidas al azar y sin tomar en cuenta sexo o edad. Hubiera sido preferible estudiar un grupo de jóvenes y anémicos para aumentar las probabilidades de encontrar casos de hemoglobinopatías homocigóticas que se acompañan de anemia y reducción del tiempo de vida, siendo frecuente que los pacientes no vivan más allá de los 25 años, pero no se pudo hacer debido a lo difícil de la obtención de personas que se prestaran al examen.

El otro grupo estudiado fue de 100 personas —no negras— que negaron tener ascendencia de color y que en su mayoría eran mestizos. Con estos si fue posible hacer selección, de modo que sólo escogimos los menores de 25 años y con nivel de hemoglobina inferior a 11 g/dl.

OBTENCION DE LA MUESTRA DE SANGRE

Se extrajeron aproximadamente 4 ml de sangre por punción de una vena periférica usando tubos al vacío que contenían una mezcla de oxalatos que actuaba como anticoagulante. Esta muestra se procesó posteriormente en un período de tiempo no mayor de 6 horas.

PREPARACION DEL HEMOLIZADO

La muestra de sangre se centrifugó por 5 minutos a una fuerza centrífuga relativa de 40 gravedades (5000 RPM en una centrífuga de 6 pulgadas de diámetro) obteniendo así la separación entre las células y el suero. Se decantó el suero y la capa de glóbulos blancos. Los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución salina. Después de la centrifugación final se removió el sobrenadante de solución salina y se añadieron 0.5 ml de agua destilada por cada mililitro de células empacadas, se agitó y se puso en el congelador hasta que se congeló completamente, entonces se extrajo y después de descongelarse se añadieron 0.4

ml de cloroformo por cada mililitro de células empacadas, se agitó vigorosamente por 5 minutos y se centrifugó por 15 minutos a una fuerza centrífuga de 40 gravedades. La parte hemolizada quedó en la capa superior y era de color rojo carmín.

OBTENCION DE FROTES PERIFERICOS

A cada persona investigada se le practicó un frote de sangre periférica para observar los cambios que ocurren en el mismo en ciertas hemoglobinopatías.

Para hacer el frote periférico fue necesario tomar la sangre que queda en la punta de la aguja después de la venopunción pues la mayoría de pacientes no quisieron que se les puncionara también la yema del dedo.

PROCEDIMIENTO DE ELECTROFORESIS

Cada hemolizado se sometió a electroforesis usando los siguientes materiales y equipo:

Cámara de electroforesis marca Gelman, Mod. 51211

Fuente de poder para electroforesis marca Gelman, Mod.38206, 115 v/50-60 Hz.

Tiras de poliacetato de celulosa marca Gelman, Mod. Sepraphore III.

Buffer para hemoglobina marca Gelman, Mod. 51122. (Solución 0.13 M de pH 9.1 de Tris-EDTA borato)

Tubos capilares para aplicación de la muestra.

Tiras absorbentes para absorber exceso de buffer, marca Gelman, Mod. 51290

Colorante de Ponceau "S" marca Gelman, Mod. 51281.

Acido acético glacial al 5o/o.

La técnica seguida fue:

Cada hemolizado se sometió a electroforesis sobre una tira de acetato de celulosa. Se colocaron, por medio de un tubo capilar, dos muestras de los hemolizados a investigar y una muestra patrón de Hb-A en cada tira. Se corrió la electroforesis a 210 v. por 35 a 40 minutos, con buffer de Tris-EDTA borato de pH 9.1. Las tiras se tiñeron con colorante de Ponceau "S" y se decoloraron con ácido acético glacial al 5o/o.

Cuando se identificó alguna hemoglobina con velocidad electroforética distinta a la del patrón de Hb-A (normal), se repitió la electroforesis de la misma corriéndola simultáneamente con un patrón conocido de velocidad electroforética similar. Si ambas hemoglobinas eran iguales sus velocidades electroforéticas eran idénticas.

RESULTADOS

Grupo de negros:

Entre 83 personas se encontraron 5 con Hemoglobina A/S, o sea un 60/o de la muestra. Entre éstos la edad mínima fue de 7 años y la máxima de 63 años. Los frotis periféricos de los casos con hemoglobina A/S no presentaron ninguna anormalidad.

Grupo de "no-negros":

Los 100 casos investigados mostraron hemoglobina normal A/A.

Antes de pasar a discutir nuestros resultados y proponer nuestras recomendaciones, creemos conveniente, para una mejor comprensión de estas enfermedades, hacer una revisión sobre los conocimientos actuales a este respecto.

GENERALIDADES SOBRE LAS HEMOGLOBINOPATIAS

Las hemoglobinopatías son un grupo de enfermedades, de muy variable severidad, que se caracterizan por presentar una anomalía intrínseca de los eritrocitos que consiste en una lesión bioquímica que origina la síntesis de una hemoglobina "anormal", aunque en otros casos como en la "Talasemia" hay un doble defecto eritrocítico: síntesis deficiente de hemoglobina más disminución del tiempo de vida del eritrocito. En ambos casos puede ocurrir hemólisis y según su severidad se puede llegar a establecer una enfermedad hemolítica de importancia clínica.

Entendemos al hablar de "Hemoglobinopatías" que incluimos un grupo de enfermedades cuyo común denominador bioquímico es la estructura de la molécula de la hemoglobina o una síntesis deficiente de hemoglobina como vimos anteriormente, ocurriendo alteraciones en la proporción de hemoglobinas normales pero sin producción de hemoglobina anormal.

Actualmente se sabe que existen en el eritrocito normal tres tipos de hemoglobinas: Hemoglobina A₁, Hemoglobina A₂ y Hemoglobina F (Fetal). También sabemos que hay un gran número de variantes anormales y que algunas de ellas producen enfermedad hemolítica mientras que otras no.

La parte "HEM" de la molécula de hemoglobina es igual en todas las variantes, la diferencia está en el componente protéico, específicamente en el tipo y número de cadenas polipéptidas que forman la parte "GLOBINA". Por esta razón debemos enfocar nuestra atención en la síntesis de las cadenas polipéptidas de las distintas hemoglobinas.

Debido a que tenemos las técnicas para identificar la composición de aminoácidos y la secuencia de cadenas polipéptidas de las hemoglobinas normal y anormal, entonces podemos establecer un "código molecular" para la estructura polipéptida de ambas.

Muchos investigadores han contribuido al entendimiento de estas enfermedades: Korber, en 1866, descubrió que en la sangre del cordón umbilical existen dos tipos de hemoglobina: Hemoglobina Fetal (Hb-F) y Hemoglobina del adulto (Hb-A), habiendo una mucha mayor proporción de la Hb-F. Este descubrimiento lo pudo hacer debido a que observó que la Hb-F es más resistente a la desnaturalización por álcali que la Hb-A.

No ocurrió nada de importancia durante los años sucesivos hasta el 1925 cuando Cooley y Lee en los Estados Unidos y Rietti en Italia describieron una enfermedad, que posteriormente se llamaría "Talasemia" y diferenciaron la misma de la "Anemia infantum pseudoleucemica de Von Jaksch's, que era un término ampliamente usado para referirse a la anemia severa con esplenomegalia en los niños. Después de 1925 hubo descubrimientos muy importantes. Por un lado se estudió la talasemia y se describieron sus varias formas e interacciones. Por otro lado se hicieron estudios genéticos y de laboratorio de las hemoglobinas.

Para una mejor comprensión de las hemoglobinas anormales ocurrieron tres sucesos de importancia: a) La identificación de la Hemoglobina "S" (Hb-S) por Pauling e Itano en 1949 utilizando la técnica de electroforesis, b) los estudios genéticos de Neel y otros en 1949 mostrando que la Hb-S se heredaba como un factor mendeliano y aclarando los mecanismos genéticos de los estados homocigótico y heterocigótico y c) la técnica desarrollada por Ingram en 1956 de la "Impresión digital" que hizo posible la caracterización molecular de las hemoglobinas anormales.

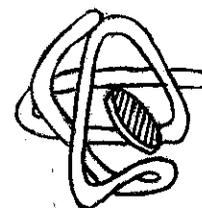
Técnicas más recientemente desarrolladas nos muestran más complejos detalles de la síntesis de hemoglobina normal y anormal.

Todos los temas que han sido introducidos en este capítulo serán vistos con la extensión que nuestro trabajo requiera en los capítulos sucesivos.

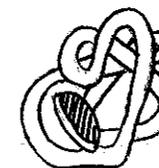
LA ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA

Desde hace muchos años se conoce la estructura básica de la molécula de hemoglobina que es de 4 grupos "HEM", cada uno atado a una "GLOBINA". La estructura química y la relación de los componentes protéicos con los grupos Hem ha sido revelada sólo recientemente (Perutz et al, 1960-1962). Usando cristalografía con rayos X de cristales sencillos de hemoglobina de caballo y luego de hemoglobina humana se ha podido construir un modelo bastante exacto de la molécula de hemoglobina. Actualmente es posible describir la molécula de hemoglobina en términos aplicables a cualquier proteína.

La molécula de hemoglobina está hecha de 4 subunidades (estructuras terciarias) que son dos pares de cadenas polipéptidas. En la hemoglobina normal del adulto (Hb-A₁) hay dos cadenas de polipéptidos ALFA y dos cadenas de polipéptidos BETA. Cada cadena está unida a su grupo HEM. Las 4 subunidades (una cadena polipéptida con el grupo hem unido) están arregladas en una forma gruesamente esférica y forman una molécula simétrica (Figuras No. 1 y 2).



CADENA
ALFA



CADENA
BETA

Figura No. 1

Configuración de las cadenas polipéptidas de la hemoglobina normal (Hb-A₁).

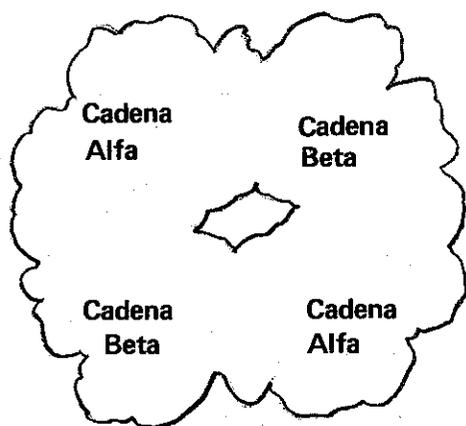


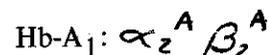
Figura No. 2

Configuración de la molécula de hemoglobina.

Las cadenas polipeptídicas están en íntima yuxtaposición, quedan parcialmente una sobre otra y están unidas por una estructura covalente.

Las cadenas alfa y beta de la Hb-A₁ difieren entre sí tanto en el número como en la secuencia de aminoácidos. La cadena alfa está hecha de 141 aminoácidos, mientras que la beta contiene 146. No consideramos importante en este trabajo escribir todos los aminoácidos que componen estas cadenas, basta la comprensión de los fenómenos que ocurren en dichas cadenas y que iremos viendo detenidamente, sin embargo el que desee consultar este dato puede referirse al texto de Miale (28).

La Hb-A₁, de acuerdo a las cadenas que la forman, se reconoce por la siguiente fórmula:



O sea, que la fórmula indica que la molécula está hecha de dos cadenas ALFA y dos cadenas BETA normales.

En 1949, Ingram demostró, por la técnica de impresión digital que la hemoglobina de las células falciformes (Hb-S) difiere de la hemoglobina normal (Hb-A) por la sustitución de un aminoácido VALINA (carga neutra) por un ACIDO GLUTAMICO (carga negativa) en la posición número seis de la cadena BETA.

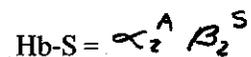
En la Figura No. 3 se muestran las sustituciones que pueden ocurrir en el aminoácido número 6 de la cadena BETA de la hemoglobina normal para formar la Hb-S ó Hb-C.

| | Hb-A | Hb-S | Hb-C |
|---|------------------------|------------------|------------------------|
| 1 | VAL | VAL | VAL |
| 2 | HIS ⁺ | HIS ⁺ | HIS ⁺ |
| 3 | LEU | LEU | LEU |
| 4 | THR | THR | THR |
| 5 | PRO | PRO | PRO |
| 6 | <u>GLU⁻</u> | <u>VAL</u> | <u>LIS⁺</u> |
| 7 | GLU ⁻ | GLU ⁻ | GLU ⁻ |
| 8 | LIS ⁺ | LIS ⁺ | LIS ⁺ |

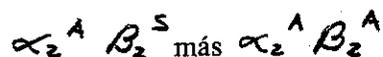
Figura No. 3

Observe la sustitución del aminoácido No. 6 de la cadena BETA de la hemoglobina normal para formar Hb-S y Hb-C.

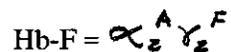
Esto explica la diferencia en movilidad electroforética, pues al sustituir el aminoácido se cambia la carga eléctrica total y por ende la movilidad electroforética. Como la sustitución del aminoácido está en la cadena BETA, entonces la fórmula de la Hb-S puede ser la siguiente:



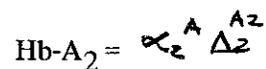
La fórmula indica que la molécula está hecha de dos cadenas alfa normales como en la Hb-A₁ y dos cadenas beta anormales características de la Hb-S. El individuo con anemia de células falciformes (Hb-S/S homocigótica) presenta sólo esta hemoglobina y no puede sintetizar Hb-A. Cuando sólo existe la presencia heterocigótica de la Hb-S (Hb A/S), se piensa que existen tanto la Hb-A como la Hb-S en el mismo eritrocito, por lo que la fórmula sería:



En el año 1961 Ingram demostró que la Hb-F (fetal) está hecha de dos cadenas ALFA normales y dos cadenas polipéptidas diferentes a todas las otras conocidas y que se han denominado cadenas "GAMMA". La fórmula de la Hb-F es la siguiente:



Al mismo tiempo Ingram demostró que la molécula de la variante de hemoglobina normal, llamada Hb-A₂ estaba hecha de dos cadenas ALFA normales y otras dos cadenas diferentes que él llamó DELTA. La fórmula es:



La secuencia de aminoácidos de la cadena anormal de la Hb-F y de la Hb-A₂ puede consultarse en el texto de Miale (28).

En los eritrocitos de un embrión humano muy joven se encontraron las hemoglobinas "Gower I" y "Gower II" que se cree presentan un quinto tipo de cadena polipéptida cuya estructura no se conoce y que se ha dado en llamarla "EPSILON". Estas pudieran ser hemoglobinas embrionarias primitivas y la cadena Epsilon pudiera representar el tipo más primitivo de cadena polipéptida.

DESCRIPCION DE LAS HEMOGLOBINAS HUMANAS NORMALES

Como ya hemos dicho, existen más de cien variedades de hemoglobinas que se ha dado en llamarles "anormales", aunque sólo unas pocas de ellas producen sintomatología clínica. Por otro lado hay tres variedades de hemoglobina, las que llamamos "normales" que se encuentran en los eritrocitos de todas las personas que no padecen de una de las hemoglobinopatías ya vistas (considerando "hemoglobinopatía" como la presencia de una variante de hemoglobina sin importar el que produzca síntomas o no). Las hemoglobinas "normales" son: Hb-A₁, Hb-A₂ y Hb-F (fetal). Bajo ciertas condiciones de electroforesis y cromatografía se detecta otro componente menor que se le ha llamado Hb-A₃, aunque su real naturaleza se desconoce y se piensa que se produce al almacenar los hemolizados por mucho tiempo.

Hb-A₁: Este es el mayor componente de la hemoglobina humana normal, formando aproximadamente del 94 al 95o/o del total de la hemoglobina. Su composición química ya fue vista detenidamente previamente. Algunas de sus propiedades más importantes las iremos evaluando en el transcurso de esta exposición.

Hb-A₂: Esta fracción se puede separar de la Hb-A₁ por electroforesis en acetato de celulosa, gel de almidón o bloque de almidón. Los valores normales para esta hemoglobina varían según el método usado para su detección, así si se usa electroforesis en bloque de almidón la concentración será de 1.8 al 3.2o/o. Usando otros métodos se encuentran valores ligeramente más altos. Una variante de la Hb-A₂ ha sido descrita por Horton y Huisman, es conocida como A₂ ó B₂, es genéticamente determinada y se considera hemoglobina anormal. Se describe aquí sólo por ser una variante de la Hb-A₂.

Hb-F: La hemoglobina fetal fue descubierta por Korber en 1866, pero Haurowitz en 1929 fue el responsable de los primeros estudios sobre la cinética de la reacción de desnaturalización característica de esta variedad. La Hb-F muestra profundas diferencias de la Hb-A. Ambas muestran distintas propiedades en la disociación del oxígeno y son inmunológicamente diferentes. La Hb-A en forma de oxihemoglobina es rápidamente desnaturalizada por un álcali fuerte (después de un minuto se ha desnaturalizado el 99o/o de la Hb-A), no así la Hb-F. La hemoglobina normal del adulto tiene 2o/o o menos de Hb-F.

Es poco lo que sabemos sobre la producción de Hb-F en las células fetales y el por qué esto ocurre. En el feto también se produce Hb-A aunque en mucho menor proporción. La proporción de Hb-A en el feto fue medida por Kazazian y Woodhead (22) quienes midieron la síntesis de Hb-A en los reticulocitos obtenidos de 42 embriones y fetos que medían desde 3.5 cm hasta 20 cm encontrando una concentración de la misma que varió del 4.3o/o al 13o/o de la hemoglobina total. El porcentaje de Hb-A fue directamente proporcional a la longitud del feto. En un recién nacido normal la mitad o más de su hemoglobina es Hb-F. Después del nacimiento la concentración de la misma decae rápidamente siempre que no haya algún desorden hematológico y a la edad de 1 a 2 años ha bajado hasta el nivel que mantendrá el resto de la vida. La figura No. 4 muestra la proporción relativa de cadenas alfa, beta y gamma en el feto humano y en el neonato.

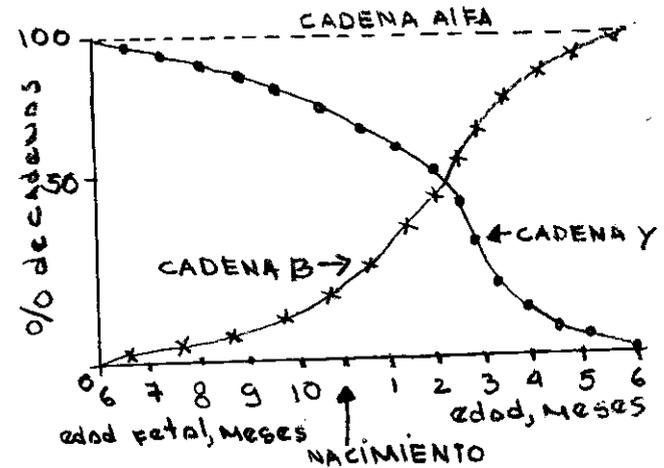


Figura No. 4
Proporción relativa de cadenas alfa, beta y gamma en el feto humano y en el neonato.

Hay desórdenes hematológicos en los que se aumenta la concentración de Hb-F, entre ellos tenemos: Varios tipos de hemoglobinopatías, en la persistencia hereditaria de Hb-F en forma homocigótica o heterocigótica y en la forma homocigótica de talasemia. En la anemia de células falciformes puede llegar hasta una concentración del 80o/o. En el rasgo drepanocítico heterocigoto (Hb A/S) usualmente está normal y si se encuentra elevada en uno de estos casos debemos sospechar una combinación con talasemia.

Se ha reportado aumento de Hb-F en enfermedades diferentes a las hemoglobinopatías, entre ellas: leucemia aguda, desórdenes mieloproliferativos, anemia perniciosa, anemia aplásica, hemoglobinuria nocturna paroxística, transfusión feto-materna (en sangre materna) y anemia esferocítica congénita. Newman, Pierre y Linman (34) estudiaron 193 adultos.

que habían tenido examen de médula ósea por diversas razones, encontraron 87 pacientes con niveles de Hb-F mayores al 3.10/o y la mayoría de estos pacientes tenían desórdenes mieloproliferativos, con o sin otros tipos de enfermedad neoplásica. Los pacientes con desórdenes hematológicos benignos como estados de deficiencia y síndromes hiperesplénicos no mostraron elevación de la Hb-F. Este dato sugiere que niveles altos de Hb-F frecuentemente reflejan un serio desorden de la médula ósea. La naturaleza del mecanismo responsable por esta respuesta eritrocítica es desconocido. Todos los datos disponibles indican la necesidad de una búsqueda cuidadosa de desórdenes serios en pacientes que presentan anemia o disproteinemia o ambas con niveles altos de Hb-F.

A baja tensión oxígeno la Hb-F es mejor transportador de oxígeno que la Hb-A y también libera el CO₂ más rápidamente. Por otro lado la Hb-F es más rápidamente convertida a metahemoglobina que la Hb-A, razón por la mayor susceptibilidad de metahemoglobinemia mostrada por los infantes.

CONTROL GENETICO DE LA SINTESIS DE HEMOGLOBINA

Haremos primero un recordatorio sobre el sitio de producción de la hemoglobina para luego entrar a considerar los mecanismos genéticos que regulan la misma.

La síntesis de hemoglobina comienza en los eritroblastos y continua a todo lo largo de la etapa normoblástica. Incluso cuando glóbulos rojos jóvenes abandonan la médula ósea y pasan al torrente vascular, siguen formando hemoglobina durante varios días. O sea, que la formación de hemoglobina no depende de una estructura específica de la médula ósea, sino de una capacidad intrínseca de las propias células rojas jóvenes (18). Los detalles sobre los pasos bioquímicos para la formación de las porfirinas hasta llegar al grupo HEM y la posterior incorporación de las globinas no es importante de exponer en este trabajo y puede consultarse en el texto de Miale (28) o cualquier otro libro especializado.

Al estudiar el control genético de la síntesis de hemoglobina debemos comenzar por conocer la síntesis de las cadenas polipéptidas que son las que a la larga determinan el tipo de hemoglobina pues recordemos que todas tienen el mismo grupo HEM.

Ya se ha dicho que la estructura de las hemoglobinas normales y anormales se diferencian por la composición y posición de los aminoácidos en por lo menos cuatro cadenas polipéptidas (Alfa, Beta, Gamma y Delta) y posiblemente una quinta (Epsilon). La síntesis de una cadena dada o combinaciones de cadenas está bajo control genético y asumimos que cada tipo de cadena polipéptida es determinado por un correspondiente gene estructural. La información del producto a ser sintetizado es acarreada desde el gene estructural a los ribosomas por un ARN mensajero (ácido ribonucleico); así la síntesis de las cadenas polipéptidas ocurre en el ribosoma. (Fig. 5)

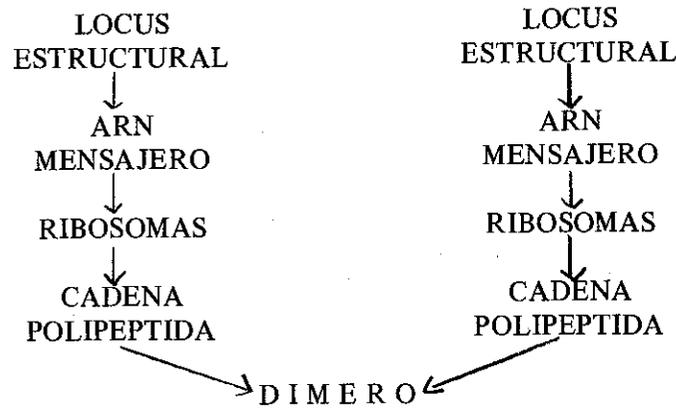


Figura No. 5

Síntesis de una cadena polipeptídica y de el dímero bajo el control de un par de locus estructurales.

Mientras que este modelo es aplicable a la síntesis de todas las proteínas, el control de la síntesis de las cadenas polipeptídicas de la globina envuelve ciertas situaciones especiales. La primera es que mientras cada gene estructural opera de un modo independiente, la molécula final de globina está compuesta de dos pares de cadenas formando un tetrámero. La segunda es que en los eritrocitos de un adulto normal se encuentra no sólo un tipo de hemoglobina, sino tres, cada uno compuesto de diferentes tetrámeros. Aún más, las tres hemoglobinas normales no están presentes en concentraciones iguales, habiendo aproximadamente 40 veces más Hb-A₁ que Hb-A₂ y 90 veces más Hb-A₁ que Hb-F. También característico de la síntesis de hemoglobina es el cambio en la producción de Hb-A₁ y Hb-F de la vida fetal a la vida adulta. Finalmente, la velocidad de síntesis de un tipo de cadena es, como en los síndromes talasémicos, afectada por la presencia de un gene actuando como un represor sobre la síntesis de ese tipo de cadena.

Sobre la base de los conocimientos actuales se puede asumir que los locus estructurales están ubicados como se muestra en la siguiente figura (Fig. 6).

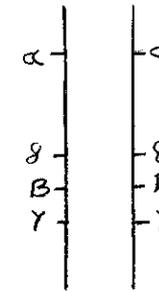


Figura No. 6

Probable relación de los 4 genes estructurales para la síntesis de la hemoglobina.

La evidencia es que los locus estructurales alfa y beta no están cercanos, se cree que se encuentran separados por cierta distancia en el mismo cromosoma o en diferentes cromosomas. Hay buena evidencia en favor de que los locus beta y delta están más cercanos y posiblemente también estén cerca el beta y gamma como se muestra en la figura. La evidencia obtenida por estudio de individuos teniendo múltiples hemoglobinas así como de experimentos in vitro de disociación y recombinación indican que dos cadenas de polipeptidos del mismo tipo se combinan para formar dímeros y que los dímeros de diferentes tipos entonces se combinan para formar varias combinaciones de tetrámeros. En el adulto normal se forman dímeros de las cadenas alfa "A", beta "A" y gamma "F", aunque no en proporciones iguales. Entonces ellos se combinan para formar las tres hemoglobinas normales como se muestra en la Figura No. 7.

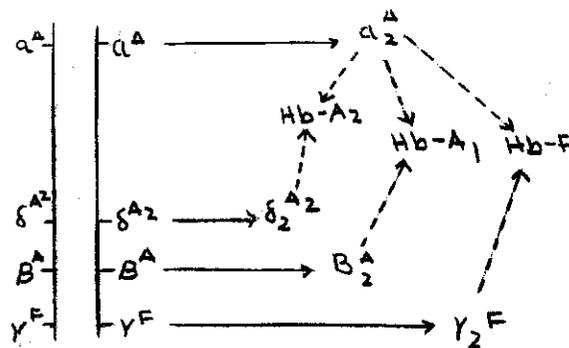


Figura No. 7

Los locus estructurales y la combinación de dímeros para formar las tres hemoglobinas normales.

Como no hay una evidencia sustancial en favor de una afinidad variable entre los diferentes dímeros, se asume que la proporción de las varias hemoglobinas formadas depende de la velocidad de síntesis de las diferentes cadenas. En el feto, al contrario de lo que pasa en el adulto, la velocidad de síntesis de las cadenas gamma es rápida mientras que la de las cadenas beta es lenta por lo que hay una alta concentración de Hb-F y una baja concentración de Hb-A₁. Los mecanismos que controlan la velocidad de síntesis son desconocidos. Sin embargo y particularmente en los síndromes talasémicos, se piensa que hay genes anormales que actúan como supresores de la actividad de los genes normales. También se acepta que la velocidad de síntesis de las cadenas anormales es menor que la de las cadenas normales.

En la Figura No. 8 se pueden observar los locus estructurales en la anemia de células falciformes y en el rasgo drepanocítico heterocigoto.

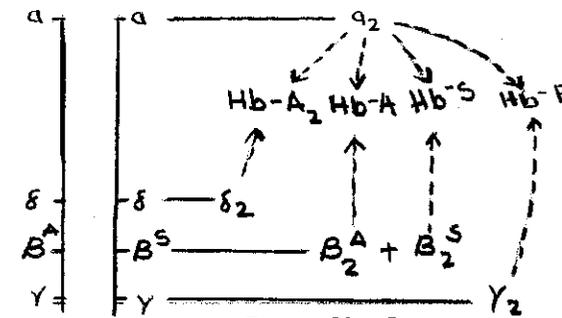


Figura No. 8

Locus estructurales en las hemoglobinopatías S/S y A/S.

Se tiene evidencia que en el control genético de la síntesis de hemoglobina hay intervención, al igual que en la síntesis de proteína, de genes operadores y reguladores tal como propuesto por el modelo de Jacob y Monod (28).

"LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES"

Actualmente se conocen poco más de un centenar de variantes de hemoglobinas, todas ellas siendo reflejo de un trastorno a nivel genético el cual, en algunos casos, es responsable de la producción de enfermedad hemolítica severa. Estudiaremos a continuación las hemoglobinopatías que, como producto de una lesión genética, son las causantes de enfermedad hematológica seria. Excluimos de nuestro estudio las "Talasemias" pues en éstas no hay producción de una variante anormal de hemoglobina, sino alteración en la proporción de los diversos componentes de la "hemoglobina normal" del adulto. La lista completa de todas las variantes de hemoglobina, así como su descubridor, puede consultarse en el texto de Miale (28).

Las Hemoglobinas "S", "C", "D" y "E" son las causantes de las principales hemoglobinopatías de importancia clínica.

Antes de considerar los aspectos clínicos de estas enfermedades estudiaremos las características de las hemoglobinas anormales y los métodos diagnósticos para identificación de las mismas.

Hemoglobina - "S". ($\alpha_2 \beta_2^S$).

La Hemoglobina-S (Hb-S) es característica de los eritrocitos que toman la forma falciformes o de drepanocito cuando son expuestos a agentes reductores. Este fenómeno y su expresión clínica en la forma heterocigota de Hb-S, han sido conocidos por muchos años. La formación de drepanocitos fue descrita en 1904 por Dressbach y el término "Anemia de Células Falciformes" fue introducido en 1922 por Mason. Diggs, en 1933, distinguió claramente entre el síndrome clínico de la anemia de células falciformes y el rasgo heterocigótico de células falciformes. Esto fue una contribución importante considerando que precedió a los estudios definitivos sobre las diferencias moleculares y la participación genética.

En 1927, Hahn y Gillespie sugirieron que la formación de drepanocitos ocurría en el estado reducido de la molécula, pero no fue hasta 18 años después que se estableció una diferencia en el comportamiento electroforético entre la Hemoglobina normal y la Hb-S, como fue demostrado por Pauling e Itano. Neel fue el responsable por la descripción de los mecanismos genéticos que actualmente conocemos y que veremos más adelante. Se conocen combinaciones entre la Hb-S y otras hemoglobinas diferentes a la Hb-A.

La formación de cristales, en soluciones de Hb-S, con forma de drepanocitos fue demostrada por Harris en 1950 y dio la explicación de la forma particular asumida por los eritrocitos con esta hemoglobina. Algunos investigadores (Ponder y Dervichian) consideran que esta forma es debida a una formación de una ultraestructura por la interacción de la hemoglobina con las lipoproteínas de la membrana del eritrocito.

La Hb-S se diferencia de la Hb-A porque en la posición No. 6 de la cadena beta presenta un aminoácido Valina de carga neutra en lugar del ácido glutámico de carga negativa de la Hb-A.

La Hb-S tiene una velocidad electroforética menor que la Hb-A.

Hemoglobina - "C". $\alpha_2^A \beta_2^{Glys}$.

Esta variante fue descubierta en 1950 por Itano. Se diferencia de la Hb-A por presentar en la posición No. 6 de la cadena beta un aminoácido Lisina en lugar del ácido glutámico de la Hb-A. A un pH de 8.6 y sobre papel filtro es la hemoglobina de más lenta migración que se conoce. Se encuentra principalmente en negros y raramente en Caucásicos.

Puede ser heredada en combinación con la Hb-S o Talasemia o en forma homocigótica o en combinación heterocigótica A/C. Los eritrocitos con esta hemoglobina, bajo condiciones de hipoxia, también toman forma de drepanocitos. Esta hemoglobina puede acompañarse de enfermedad hemolítica

en su forma homocigótica o en combinación con otra variante o con talasemia. Es frecuente identificar eritrocitos en forma de tiro al blanco en las personas con esta hemoglobina. Las variantes "S" y "C" son las que más frecuentemente se acompañan de enfermedad hemolítica.

Hemoglobina - "D".

Se agrupa bajo este nombre a varios tipos de hemoglobina anormal en las cuales puede haber anomalías tanto en la cadena alfa como en la beta. Se agrupan juntas por tener las mismas características electroforéticas sobre papel filtro. Pueden ser diferenciadas por la técnica de impresión digital y análisis de las cadenas polipeptídicas. Por lo tanto el término "Hb-D" se refiere a un grupo heterogéneo de variantes que tienen en común la misma movilidad al hacer electroforesis en papel.

Fue descubierta en 1951. No muestra predilección por ningún grupo étnico. La movilidad electroforética es la misma que la de la Hb-S a un pH 8.6. La distinción entre ambas se debe hacer por la técnica de reducción de la hemoglobina para formación de drepanocitos (ver más adelante) lo cual no ocurre con la Hb-D y sí con la "S"; otro método para diferenciarlas es por la técnica de solubilidad en ferrohémoglobina (ver "Diagnóstico de laboratorio").

Hemoglobina - "E" $\alpha_2^A \beta_2^{2Glys}$.

Fue descrita por primera vez por Itano en el año 1954. Se diferencia de la Hb-A por tener un aminoácido Lisina en la posición No. 26 de la cadena beta en lugar del ácido glutámico que se encuentra en la Hb-A. Su mayor frecuencia es en Asia Suroriental. Tiene la misma movilidad electroforética sobre papel filtro que la Hb-A₂, para diferenciarla de ésta hay que determinar su secuencia de aminoácidos. En su forma heterocigótica es capaz de producir hemólisis, aunque lo más común es que se asocie a talasemia. Los eritrocitos con esta hemoglobina característicamente toman la forma en "tiro al blanco".

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO PARA HEMOGLOBINOPATIAS

Introducción:

Las técnicas disponibles para el estudio de una hemoglobinopatía varían desde las muy simples hasta las sofisticadas. Antes de discutir estas técnicas queremos enfatizar que las indicaciones para estudios especiales usualmente son resultado de hallazgos clínicos poco comunes o anormalidades encontradas en estudios más o menos rutinarios de sangre periférica. Las hemoglobinopatías de significancia clínica son caracterizadas por una anemia que puede variar de moderada a muy severa y que es refractaria al tratamiento. El frote de sangre periférica muestra varias de las siguientes características, que aunque no son absolutamente diagnósticas, sí sugieren la posibilidad de una hemoglobinopatía: microcitosis, hipocromía, células en tiro al blanco, normoblastosis, anisocitosis, poikilocitosis, eritrocitos deformados con forma de drepanocitos o formación intraeritrocítica de cristales. Cuando la hemólisis es severa como en las crisis hemolíticas de la anemia de células falciformes, no sólo hay severa normoblastosis, sino una marcada leucocitosis con desviación a la izquierda que sugiere un proceso infeccioso. Como la anemia de una hemoglobinopatía es del tipo hemolítico, usualmente aparece reticulocitosis, notándose policromatofilia, basofilia difusa, punteado basófilo y eritrocitos macrocíticos. En el recién nacido los hallazgos pueden confundirse con los que se encuentran en la enfermedad hemolítica isoimmune.

El frote periférico es pues una prueba que nos conduce a sospechar una hemoglobinopatía, pero el diagnóstico de certeza y la identificación de la misma se puede hacer a través de las siguientes pruebas:

1. Pruebas para provocar la formación de drepanocitos:

Cuando los eritrocitos conteniendo Hb-S son expuestos a una tensión reducida de oxígeno, toman una forma marcadamente distorsionada semejando "bananitos", estas células son las conocidas como drepanocitos y presentan proyecciones filamentosas irregulares. El fenómeno de la formación del drepanocito es un reflejo de la cristalización de la hemoglobina dentro del eritrocito.

La formación de drepanocitos es muy sugestiva de la presencia de Hb-S pero debe recordarse que los eritrocitos conteniendo Hb-C, Hb-I y Hb-Barts pueden en algunas ocasiones asumir la forma de drepanocitos.

Se han usado varios métodos para demostrar la formación de drepanocitos: Si colocamos una gota de sangre con Hb-S sobre un portaobjetos y la cubrimos con un cubreobjetos y sellamos los bordes del mismo, el oxígeno presente será consumido por los eritrocitos en poco tiempo, de modo que al bajar la tensión de oxígeno se formarán los drepanocitos. Este efecto se alcanza en pocas horas cuando se trata de anemia de células falciformes, pero es más lento si la sangre tiene Hb-A/S. En presencia de ésta, además de ser un proceso más lento la formación de drepanocitos, también hay formación de menor cantidad de ellos y con una morfología menos bizarra que en el caso de Hb S/S.

Se puede provocar formación de drepanocitos colocando una banda de hule por 5 mtos. alrededor del dedo del cual tomaremos la muestra, pues de este modo producimos una hipoxia intensa provocando la drepanocitosis.

Se puede alcanzar aún mayor formación de drepanocitos si se añade a la sangre un agente reductor como el metabisulfito sódico o la ditionita sódica.

Con este método los eritrocitos con Hb A/S o S/S siempre formarán drepanocitos. Hay unos pocos casos reportados

de eritrocitos con Hb A/S que no formaron drepanocitos, pero se cree que esto se debió a que la concentración de Hb-S era menor a la requerida para la formación de drepanocitos, que es del 100/o o más, sin embargo la evidencia no es del todo convincente. Se ha visto que una alta concentración de Hb-F aparentemente inhibe la formación de drepanocitos como se ha visto en los eritrocitos de recién nacidos con Hb-A/S.

Al hacer determinaciones de concentración de hemoglobina se ha notado que los eritrocitos conteniendo Hb-S se hemolizan incompletamente en el reactivo de cianuro, apareciendo una solución turbia. Este hallazgo accidental debe orientarlo a uno por la presencia de Hb-S.

2. Prueba de turbidez en tubo de ensayo:

Wei-Ping-Loh (25) y Greenberg, Harvey y Morgan (15) reportaron casi simultáneamente una prueba para identificación de la Hb-S basada en la baja solubilidad de la misma al ser deoxigenada en presencia de un buffer concentrado de fosfato. El reactivo precipitante se forma mezclando un buffer de fosfato 2.36 M con una solución de saponina al 50/o y una solución de ditionita sódica al 200/o en un pH de alrededor de 7.

Para la prueba se mezclan 0.02 ml de sangre completa (con o sin anticoagulante) en un tubo de ensayo de 12 mm de diámetro, con 2 ml del reactivo precipitante, agitando el tubo suavemente, luego se deja reposar por 3 minutos para permitir la lisis de los eritrocitos. Si la solución se vuelve "opaca" es signo indicativo de la presencia de Hb-S, aunque también se ha observado opacidad en casos de hemoglobina A/C (Harlem).

Con Hb S/S la prueba es positiva cuando el hematocrito es mayor del 100/o (concentración de Hb-S de 3.2 g x 100 ml) y es negativa con hematocrito de 50/o o menos (concentración de Hb-S de 1.6 g x 100 ml).

Al tener Hb A/S la prueba es positiva con hematocrito arriba del 150/o (2.2 g x 100 ml de Hb-S), pero no hay

precipitación al bajar al 10o/o (1.4 g x 100 ml de Hb-S).

Puede ocurrir una prueba positiva falsa en pacientes con mieloma múltiple debido a la precipitación de proteínas plasmáticas (15).

Esta prueba se ha encontrado ser más sensitiva y exacta que la prueba de formación de drepanocitos con metabisulfito. Se calcula que el costo del material por cada examen es de 3 a 4 centavos de quetzal por lo que puede ser usada para programas de detección en masa.

3. Prueba de solubilidad sobre portaobjetos:

Ratanaubol et al (41) basados en la característica de la insolubilidad de la Hb-S reducida por la ditionita sódica en presencia de un buffer fuerte de fosfato, idearon una prueba que consiste en cubrir un frote de sangre periférica con una mezcla de ditionita sódica y un buffer de fosfato 2.19 M, seguidamente se lava con alcohol metílico absoluto y agua destilada y luego se tiñe con Safranina. El frote se puede examinar macroscópica o microscópicamente. En presencia de Hb-S el frote toma un color rojizo o rosado oscuro. Se interpreta negativo si no se colorea o si permanece rosado pálido. Al examen microscópico encontraremos, en los casos de Hb-S (homocigótica o heterocigótica), células coloreadas que aún contienen hemoglobina. Esto nos indica que esta hemoglobina fue insoluble en la solución que usamos por lo que permaneció dentro de la célula y se coloreó con la safranina. Obviamente en los casos negativos se verán células no coloreadas o sólo estroma debido a la disolución de la hemoglobina por el reactivo. Con esta prueba no se puede diferenciar la Hb A/S de la HB S/S. Se le reconocen varias ventajas sobre las otras pruebas de solubilidad: a. Los frotos positivos o negativos son estables por varias semanas después de preparados. b. El frote puede servir como un record permanente para futuros exámenes. c. Otros poikilocitos no se confunden con los drepanocitos. d. El procedimiento es corto y fácil.

Los frotos que van a ser examinados por este método no deben ser guardados más de dos semanas antes de procesarlos para evitar falsos positivos.

4. Desnaturalización por álcali:

Algunas hemoglobinas son desnaturalizadas por álcali, mientras que otras no. El mecanismo responsable de esto no es aún bien entendido pero baste decir que la Hb-F es resistente a la desnaturalización mientras que la Hb-A no lo es. Las hemoglobinas "Bart's" y "J" tienen mayor resistencia a la desnaturalización que la Hb-A. Todas las otras variantes de hemoglobina son desnaturalizadas por un álcali fuerte. Este método ha sido muy usado para la diferenciación entre Hb-F y Hb-A.

Es importante apreciar que mientras el valor de este método es indiscutible, la desnaturalización no es una reacción de "todo o nada", sino que está en función de tiempo, pH y solubilidad alterada. Cuando una solución de oxihemoglobina es hecha fuertemente alcalina, la molécula de hemoglobina es desnaturalizada y se vuelve insoluble a un pH normal. La Hb-F tiene una velocidad de desnaturalización mucho más lenta que la Hb-A. En la sangre normal hay aproximadamente un 2o/o de "hemoglobina resistente al álcali".

5. Solubilidad de la Ferrohemoglobina:

La aplicación de medidas de solubilidad a las soluciones de hemoglobina muestra que mientras la oxihemoglobina "A" y la "S" se comportan similarmente, la ferrohemoglobina "S" tiene una solubilidad menor que cualquier otra. Este hecho se aprovecha para distinguir entre la Hb-S y la Hb-D pues ambas tienen idéntica movilidad electroforética. La ferrohemoglobina "C" tiene una solubilidad mayor que la "A".

6. Electroforesis sobre papel filtro:

La técnica de la electroforesis ha sido la más útil herramienta para la detección de las principales variantes de

hemoglobina. Hace unos años se efectuaba sobre papel filtro, pero actualmente el medio de soporte que más está usándose es el acetato de celulosa. Veremos ahora los principios de la técnica de electroforesis los cuales son los mismos con cualquier medio de soporte que usemos.

Cuando soluciones de hemoglobina adecuadamente preparadas son sometidas a una carga eléctrica, a un pH fijo, los diferentes tipos de hemoglobinas mostrarán una movilidad electroforética diferente. La movilidad también depende de la fuerza iónica del buffer. A menor fuerza iónica, más rápida migración y menor desarrollo de calor: una mayor fuerza iónica produce bandas electroforéticas más definidas pero la migración es más lenta. La siguiente fórmula define la fuerza iónica (1):

donde: $U = 0.5 \sum M Z^2$

U = Fuerza iónica
m = molaridad de cada ión
z = valencia de cada ión

En electroforesis sólo se puede usar corriente eléctrica "directa". Esta corriente es dirigida del electrodo negativo (cátodo) a través del buffer y el medio de soporte hacia el electrodo positivo (ánodo). El exceso de calor debido al flujo eléctrico puede destruir algunos componentes lábiles y producir distorsión de los patrones de migración. Usando sistemas de enfriamiento se puede obtener una óptima migración, aún con buffers de alta fuerza iónica (1). Para "correr" las electroforesis se escoge un pH al cual las diferentes hemoglobinas mostrarán diferente movilidad debido a sus distintas cargas eléctricas. Se usa una fuerza iónica lo suficientemente baja como para permitir una migración óptima pero no tan baja como para interferir con la conductividad eléctrica.

Debe siempre recordarse que la movilidad electroforética depende de la carga neta de la molécula y que solamente aquellas

sustituciones que cambian la carga neta, afectarán la velocidad de migración. La electroforesis separará sólo aquellas hemoglobinas que difieren en su carga neta en la molécula por lo que es posible tener extensas sustituciones de aminoácidos formando cadenas polipéptidas muy diferentes pero que muestran igual velocidad de migración electroforética. Por lo tanto, dos muestras de hemoglobina teniendo características electroforéticas idénticas pueden ser diferentes con respecto a su estructura de las cadenas polipéptidas.

Las principales ventajas de esta técnica son simplicidad y bajo costo de los aparatos. El uso de dos o tres búferes diferentes ayuda a diferenciar entre la mayoría de variantes de hemoglobina. Para uso rutinario un buffer de pH 8.6 es bueno para distinguir las hemoglobinas A, S y C.

En la Figura No. 9 mostramos las posiciones relativas de las principales variantes de hemoglobina después de electroforesis con buffer de barbital a pH 8.6. La barra gris separa las hemoglobinas velocidad rápida (anódicas) de las lentas (catódicas). La hemoglobinas anormales más comunes son las lentas F, S, C, D y E.

Las hemoglobinas "S" y "D" que tienen igual velocidad electroforética a pH 8.6 se pueden diferenciar electroforéticamente usando un buffer de citrato con pH 6.2 (26).

Las principales desventajas de la electroforesis sobre papel filtro (que no ocurre al usar acetato de celulosa) son: 1. Método relativamente poco sensitivo pues por ejemplo no detecta menos del 15o/o de Hb-S en una mezcla de Hb A/S y no permite distinción de componentes menores como la Hb-A₂. 2. La movilidad no es mesurable en unidades absolutas sino sólo relativas. 3. La técnica está pobremente adaptada para cuantificación de los componentes de las hemoglobinas.

Estas desventajas han sido superadas con el uso de acetato de celulosa y lo veremos más adelante.

7. Electroforesis sobre acetato de celulosa y gel de agar:

Como ya dijimos, la técnica de electroforesis en papel tiene varias desventajas y a veces se producen electroforegramas borrosos. Han sido usados otros medios de soporte tales como el acetato de celulosa, el gel de agar, gel de almidón, gel de acrilamida y la agarosa. Los dos últimos dan muy buena resolución pero requieren mucho tiempo y cuidado para prepararlos. El acetato de celulosa ha probado ser el medio más práctico. Su uso se reportó por primera vez por Kohn en 1957. Su trabajo mostró el valor de las pruebas diagnósticas hechas en acetato de celulosa y su superioridad sobre los otros medios usados en ese tiempo. En el 1962 se introdujo comercialmente una tira de poliacetato de celulosa de bajo costo que demostró ser un excelente medio de soporte en donde se obtienen separaciones bien definidas en aproximadamente 30 minutos.

El equipo necesario no es caro y es fácil de usar. Los patrones electroforéticos de la hemoglobina normal de adulto hechos sobre acetato de celulosa muestran una fracción muy intensa de Hb-A (95 a 98o/o) que está seguida por una fracción de Hb-A₂ (menos de 3.5o/o). Se pueden observar dos productos adicionales que no forman parte de la hemoglobina, son la anhidrasa carbónica I y II.

Ha sido bien establecido que el acetato de celulosa es un medio estabilizante rápido y conveniente para la separación de las soluciones de hemoglobina. Los electroforegramas son reproducibles, capaces de detectar la Hb-F en pequeñas cantidades y muestran separación de Hb-A₂ en presencia de Hb-S. Además es posible separar Hb-F en presencia de alta cantidad de Hb-A.

Actualmente con la técnica recomendada por la Compañía Gelman (1) para electroforesis de hemoglobina claramente se puede diferenciar la Hb-A de la Hb-F. La presencia de Hb-F se detectará en todos los hemolizados normales, aunque la cantidad es tan pequeña que su cuantificación es imposible. La

fracción de Hb-F migra aproximadamente 2 mm detrás de la Hb-A y 1 mm delante de la Hb-S. Para mejores resultados los hemolizados deben ser frescos. Es preferible correr simultáneamente hemoglobinas patrones ya conocidas junto con la muestra para comparar las distancias de migración.

8. Electroforesis sobre acetato de celulosa gelatinizado:

El método anteriormente descrito sobre acetato de celulosa no puede diferenciar entre las hemoglobinas "H" y "Bart's" de migración rápida. Chindavanig y Gumnardetch (11) hicieron un estudio usando acetato de celulosa gelatinizado (diacetato de celulosa combinado con un gel) para la separación de estas hemoglobinas. Se ha visto que este medio da resoluciones muy claras aún de las hemoglobinas "rápidas" por lo que puede ser usado para la separación de las hemoglobinas "H" y "Bart's", y después, y después se puede hacer cuantificación densitométrica de las mismas. Con este medio y usando un buffer "Tris-glicina" de pH 8.6 a 250 volts se pueden obtener separaciones de las hemoglobinas "A", "F", "S", "A₂", "H" y "Bart's". La A₂ y la E viajan a la misma velocidad por lo que no pueden ser separadas. Usando este medio la Hb-"H" apareció como una banda estrecha claramente definida, al contrario de lo que ocurre al usar acetato de celulosa donde aparece ancha y difusa. Este método se recomienda principalmente para la separación de las hemoglobinas inestables "H" y "Bart's" pues las demás pueden ser bien separadas usando el acetato de celulosa.

9. Electroforesis sobre bloque de almidón:

Este método le sirvió a Kunkel y Wallenius para descubrir el componente menor de la Hb-normal, la Hb-A₂. Desde entonces se ha convertido en la técnica más empleada para separar y cuantificar la Hb-A₂. También es útil para separar la Hb-Lepore de la Hb-A. Es un buen método para separar las hemoglobinas de migración rápida como la "H" y la "Bart's" pero, a diferencia del anterior, tiene la desventaja que es un procedimiento complicado y no se puede hacer cuantificación por densitometría. Por ello se

recomienda el medio de acetato de celulosa gelatinizado para la separación de estas hemoglobinas.

10. Electroforesis sobre gel de almidón:

Es de los mejores métodos de electroforesis. Da una excelente resolución no sólo de Hb-A y Hb-F sino de muchos otros componentes. El problema es que es mucho menos práctico para trabajar que la técnica del acetato de celulosa.

11. Electroforesis y pruebas de solubilidad con muestras de sangre obtenidas sobre papel filtro:

Se puede practicar electroforesis a una muestra de sangre que se ha colocado en un papel filtro. La técnica consiste en poner una gota de sangre sobre un papel filtro. Luego esta gota se diluye o separa mediante un reactivo hemolizante especial, la hemoglobina así obtenida se puede estudiar por electroforesis y por pruebas de solubilidad (17). Se ha usado el método de electroforesis con acetato de celulosa y para aquellos hemoglobinas que no se separan en este medio se ha usado una adaptación del método de agar-citrato. También se ha usado un nuevo sistema para análisis de las cadenas de globina por electroforesis en acetato de celulosa.

Se han confeccionado pruebas de solubilidad usando la muestra en papel filtro para diferenciar hemoglobinas que forman drepanocitos y que no los forman pero que tienen igual movilidad electroforética. Esta técnica es recomendada para estudios en masa debido a su bajo costo (17). Haynes e Ingram (19) han reportado una variedad de la técnica anterior en la cual colocan una muestra de sangre completa sobre papel filtro "Whatman" de 3 mm, esperan a que seque y luego el papel con la muestra y una membrana de electroforesis de acetato de celulosa son mojados con una mezcla de búferes para electroforesis (19). Las hemoglobinas se transfieren directamente poniendo en contacto el papel mojado con la muestra de la membrana de celulosa. Se obtiene una buena separación de las hemoglobinas "A", "S" y "C". Las hemoglobinas pueden identificarse aún sin

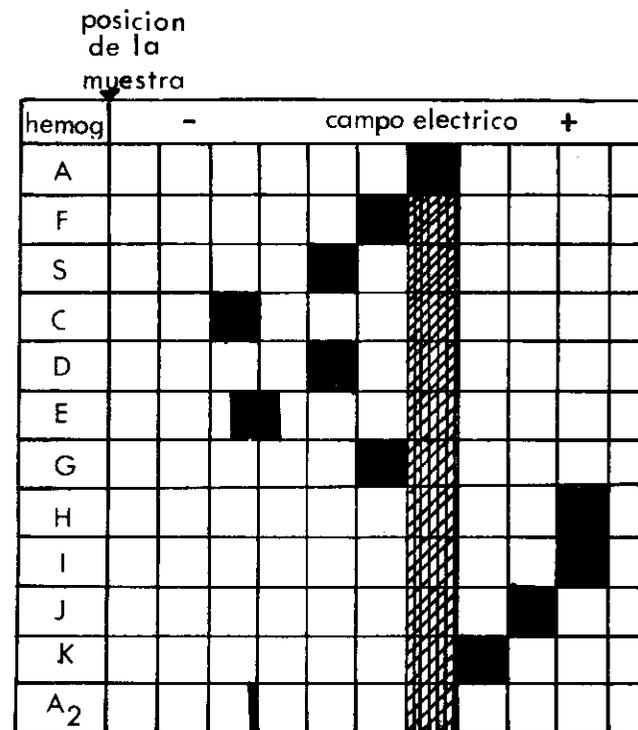


Figura No. 9

Posiciones relativas de algunas variantes de hemoglobina después de electroforesis con buffer de barbital a pH 8.6. La barra gris en la posición de la hemoglobina "A" separa las hemoglobinas "rápidas" de las "lentas".

tinción siempre que la sangre seca no haya sido guardada por más de dos semanas a temperatura ambiente.

12. Cromatografía de intercambio iónico:

Las técnicas más sensibles para la separación y cuantificación de las fracciones de hemoglobina están basadas en la cromatografía de intercambio iónico. Varios aniones y cationes de intercambio han sido usados: Amberlite, IRC 50, Carboximetil celulosa, DEAE celulosa, DEAE sephadex. Uno de los que más ha trabajado en esto ha sido Huisman quien prefiere DEAE celulosa. Mayores detalles pueden consultarse en el texto de Miale (28).

13. Técnica de impresión digital:

Esta técnica, desarrollada por Ingram, está basada en la digestión trípica de la hemoglobina seguida por electroforesis en papel filtro en una dirección y cromatografía en ángulo recto. La tripsina divide las cadenas polipéptidas sólo en aquellos puntos donde se encuentran los aminoácidos básicos lisina y arginina. El cromatograma resultante es un mapa bidimensional de los péptidos trípticos, cada péptido estando colocado en una posición definida y característica, de ahí el nombre de "impresión digital". Por esta técnica se detectan diferencias gruesas en los polipéptidos de las hemoglobinas. Cuando se identifica un péptido trípico anormal, éste puede ser aislado por cromatografía en columna y su composición exacta de aminoácidos puede determinarse por los métodos apropiados.

14. Técnica de hibridización:

Cuando una solución de hemoglobina se pone en medio ácido con pH menor de 5 o alcalino con pH mayor de 11, la molécula de hemoglobina se disocia en dos subunidades de la mitad del tamaño de la molécula original. Trayendo el pH de nuevo a neutro las subunidades se recombinan espontáneamente. Es probable que la disociación sea de la molécula entera (e.g. $\alpha_2\beta_2$) formando moléculas simétricas que son la mitad

($\alpha\beta$) y luego pasando a formar cadenas individuales (α y β). Las cadenas individuales se pueden entonces recombinar para formar nuevas mitades de moléculas simétricas y luego la molécula original. Si estos eventos ocurren en una mezcla de subunidades de dos hemoglobinas diferentes, la recombinación puede entonces ocurrir entre subunidades de una hemoglobina con las de la otra o bien con las de la misma hemoglobina. Por lo tanto podemos formar moléculas "híbridas" que difieren en propiedades físicas (como la movilidad electroforética y la conducta cromatográfica) y que se pueden identificar como diferentes de las moléculas originales. Esta técnica ha sido usada ampliamente para detectar cuando una anomalía de la molécula de hemoglobina reside en la cadena alfa o en la beta. También es útil para probar la igualdad o diferencia entre dos hemoglobinas; por ejemplo si las dos hemoglobinas a estudiar tienen cadenas alfa y beta (o de otro tipo) idénticas, entonces la recombinación no formará un híbrido diferente a la molécula original. Si la composición de la cadena de alguna de ellas fuera diferente entonces se formará un "híbrido" diferente a la molécula original.

MECANISMOS PATOFISIOLÓGICOS EN LAS HEMOGLOBINOPATIAS

Una hemoglobinopatía existe cuando hay una anemia hemolítica debida a un defecto eritrocítico intrínseco y hereditario causado por la presencia de una hemoglobina anormal o por una síntesis deficiente de hemoglobina (talasemia) o por una combinación de las dos condiciones anteriores. Ya hemos enfatizado que la presencia de una hemoglobina anormal por sí misma no necesariamente produce enfermedad hemolítica.

Los principales desórdenes hematológicos encontrados en la presencia de algunas variantes de hemoglobinas humanas son directamente atribuibles a cambios en la secuencia de aminoácidos que dan lugar a una variedad de cambios estéricos en la molécula. Estos pueden afectar la solubilidad de la hemoglobina, su habilidad para reaccionar con oxígeno o pueden causar inestabilidad que produzca la precipitación de la hemoglobina dentro del eritrocito (10).

En general, la presencia en forma heterocigótica de una hemoglobina anormal, como la Hb A/S, es asintomática. Por el otro lado el estado heterocigótico doble es algunas veces acompañado por anemia hemolítica moderada a severa como en la Hb-S/Talasemia.

El estado homocigótico para ciertas hemoglobinas anormales (Hb-S y Hb-C) está siempre acompañado por anemia hemolítica moderada a severa. Con otras hemoglobinas anormales el estado homocigótico es casi siempre asintomático, sin embargo, una hemoglobina anormal que es asintomática aún en el estado homocigótico, puede en combinación con talasemia o alguna otra anomalía eritrocítica producir enfermedad hemolítica.

Repetidamente se ha demostrado que en las hemoglobinopatías el tiempo de vida de los eritrocitos está disminuido pero aún no se ha explicado el por qué de este

fenómeno en un eritrocito que contiene una hemoglobina anormal sólo en un aminoácido. En la anemia de células falciformes hay formación de drepanocitos los que se agrupan en los pequeños vasos. Esto da una explicación lógica para pensar que se aumenta la lisis (disminuyendo el tiempo de vida de los eritrocitos), principalmente porque los drepanocitos tienen una fragilidad mecánica aumentada. Sin embargo esta explicación no se aplica a otras hemoglobinopatías. Por microscopía electrónica se ha obtenido alguna evidencia de que en la talasemia hay anomalías estructurales de la membrana del eritrocito. Podemos especular que la sobrevida disminuida pudiera ser explicada en base a anomalías de la membrana del eritrocito, particularmente si nosotros consideramos la membrana como una orientación especial de moléculas de hemoglobina y lípidos. Como la integridad de esta membrana es mantenida por sistemas de enzimas intracelulares los cuales desaparecen a medida que el eritrocito envejece, es obvio que tendremos que saber más de los procesos de envejecimiento del eritrocito antes de poder explicar la sobrevida disminuida.

Eyimofe Boyo y J. Ikomi-Kumm (4) efectuaron estudios de calorimetría con eritrocitos de pacientes con hemoglobina normal, con Hb S/S, Hb S/C y Hb C/C. Los eritrocitos que formaban drepanocitos mostraron una producción de calor metabólico significativamente mayor que el de las células normales. Se ha sugerido que los cambios conformacionales en la estructura de la Hb-S o C causados por la deoxigenación pueden causar un incremento en la actividad metabólica y que esto puede contribuir significativamente a reducir la sobrevida de los eritrocitos que contengan estas hemoglobinas.

La perpetuación de la anemia de células falciformes y la presencia de Hb-S en forma heterocigótica ha sido atribuida en parte a una curiosa inmunidad contra la malaria producida por *Plasmodium falciparum* de las personas que presentan esta hemoglobina. Así estas personas están protegidas contra una enfermedad que es endémica en las áreas donde ellos viven y que es causa de alta morbilidad y mortalidad entre las personas que no presentan esta hemoglobina. Una protección igual ocurre en

las personas que presentan una deficiencia hereditaria de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD), aunque ambas condiciones son genéticamente independientes (20) En ambos casos el mecanismo de resistencia es desconocido y pareciera que los eritrocitos con hemoglobina anormal o con contenido enzimático alterado no son de la predilección del parásito. Piomelli et al (40) han estudiado pacientes que habían heredado simultáneamente ambos defectos y concluyeron que estos pacientes se beneficiaban con esto pues parece que un defecto mitiga el otro. La anemia de células falciformes hace menos aparente el defecto enzimático de los eritrocitos hasta el punto que el genotipo productor de la deficiencia de G-6-PD puede ser enmascarado. Por el otro lado la deficiencia de G-6-PD modifica la severidad clínica de la anemia de células falciformes. Este efecto parece ser tan importante que sería en extremo conveniente investigar los mecanismos para esta protección a fin de poder emplear este conocimiento en la terapéutica de la enfermedad. Konotey-Ahuleu et al (24) no están de acuerdo con la opinión de Piomelli et al (42) y por el contrario reportan que en sus pacientes han observado que la presencia de Hb S/S con deficiencia de G-6-PD se acompaña de peor curso clínico que cuando se presenta una sola de estas entidades solas. Piomelli et al no aceptan esta interpretación y en efecto parecen tener mejor evidencia para sustentar la primera hipótesis que vimos. La deficiencia de G-6-PD aparece únicamente en el sexo masculino. Como regla se observa alta incidencia de la misma en áreas donde la malaria fue endémica en el pasado, pero aún así muchos investigadores se muestran renuentes a aceptar que esto sea el producto de un mecanismo de defensa contra la malaria (48), (14).

CUADRO CLINICO DEL RASGO DREPANOCITICO A/S.

En las personas heterocigóticas con Hb A/S la concentración de Hb S en los hemolizados suele ser inferior al 40o/o, concentración demasiado baja para permitir que se produzca formación de drepanocitos en una atmósfera con tensión de oxígeno fisiológico. Es por esta razón que estas personas no presentan anemia hemolítica u obstrucciones vasculares (35). El fenómeno de drepanocitosis o formación de células falciformes es debido a la marcada insolubilidad de la Hb-S reducida que cristaliza dentro del eritrocito causando que el eritrocito tome esa forma característica. Este fenómeno es fácilmente demostrable incubando los eritrocitos con un agente reductor fuerte como el metabisulfito sódico.

Los pacientes con el rasgo heterocigótico A/S son usualmente asintomáticos pero se pueden presentar casos de hipostenuria o hematuria idiopática (10). Statius van Eps et al (47) efectuaron estudios microangiográficos en los riñones de pacientes con Hb S/S, Hb A/S y Hb S/C respectivamente.

Los pacientes con Hb S/S mostraron lesiones gruesas de los vasos de la médula renal con ausencia casi completa de los "vasa recta". Los pacientes con Hb A/S o Hb S/C mostraron reducción del número de los "vasa recta" y pérdida de la arquitectura normal de las pirámides. Estos hallazgos sugieren que la lesión básica en esta nefropatía es obliteración de los "vasa recta" lo que causa las anomalías observadas en la función de concentración (hipostenuria), pues estos vasos forman una parte intrínseca del sistema de contracorriente del asa de Henle. Los eritrocitos que atraviesan la médula renal hiperosmótica (debida a una multiplicación de la contra-corriente) sufrirán transformación a forma drepanocítica. El incremento en viscosidad que acompaña a este fenómeno obstaculiza la circulación a través de los "vasa recta" creando hipoxemia con acidosis concomitante, y ambos factores a su vez promueven

mayor formación de drepanocitos y de micro trombos con obliteración de estos vasos. Para información más amplia a este respecto se recomienda consultar el trabajo de Statius van Eps et al (47).

Cuando un sujeto con Hb A/S es sometido a una atmósfera con baja tensión de oxígeno como puede ocurrir en grandes altitudes o durante la anestesia general, puede presentarse formación intravascular de drepanocitos en el hígado, bazo, cerebro o pulmones causando infartos. Se han reportado varios casos de estos pacientes que han muerto durante la anestesia general (25). La única medida terapéutica en esta situación es dar una cantidad adecuada de oxígeno. Se han reportado casos de muerte súbita ocurridos en personas con Hb A/S sometidas a ejercicio intenso (21).

ANEMIA DE CELULA FALCIFORMES:

Este desorden fue descrito por vez primera por Herrick en 1910 después de encontrar eritrocitos en forma de drepanocitos en la sangre de pacientes que padecían de una forma peculiar de anemia crónica. Aproximadamente 1 de cada 600 negros en los Estados Unidos sufren de esta enfermedad hereditaria que es causante de hemólisis. En Guatemala se desconoce la prevalencia de esta enfermedad. En nuestro estudio investigamos 83 personas de raza negra aparentemente sanas, residentes en Puerto Barrios, Departamento de Izabal y no encontramos ningún caso, aunque conocemos varios casos detectados en el Hosp. Roosevelt. Los resultados de esta investigación son analizados ampliamente en el capítulo sobre "Resultados". Los casos que se encuentran en la literatura en personas no-negras son en su mayoría combinaciones de Hb-S con otra variante anormal o bien con talasemia o son personas cuyos antecesores son negros. En Guatemala, J. Alvarado M y col (2) reportaron en el 1971, dos casos de anemia de células falciformes detectados en una familia de indígenas en los que aparentemente no había ascendencia de raza negra. Se investigó hasta la tercera generación no encontrando negros. Todos los de la familia son originarios del municipio de San Raymundo las Casillas, Depto. de Guatemala.

Patogénesis:

La mayoría de las manifestaciones en esta enfermedad están relacionadas con la propiedad característica de la Hb-S que es la cristalización al estar en una atmósfera con baja tensión de oxígeno. El fenómeno de formación de drepanocitos es directamente proporcional a la concentración de Hb-S y se favorece cuando existe un pH ácido y bajo condiciones de estasis que tienden a aumentar la deoxigenación de la hemoglobina. Por ello es que los tejidos que normalmente contienen sangre a tensiones bajas de oxígeno y un pH reducido, tal como ocurre en la médula renal y en las arteriolas pulmonares, son particularmente susceptibles a la formación de drepanocitos y la sucesión de eventos que siguen después. O sea, que se desarrolla

un círculo vicioso pues los drepanocitos son prácticamente atrapados en los capilares más pequeños, en las arteriolas terminales y en las venas, causando con ésto estasis que se sigue de un aumento en la deoxigenación de la hemoglobina, baja del pH y consecuente aumento en la formación de drepanocitos que a su vez causa trombosis e infartos locales. Además, debido a la hipoxia local ocurrirá daño celular, vasoespasmo, formación de edema, hemoconcentración y deposición de fibrina. Este mecanismo patogénico es seguramente el responsable de la mayoría de los daños encontrados en esta enfermedad, tales como dolor y edema de los órganos afectados, autoesplenectomía, necrosis aséptica de huesos (especialmente en cabeza de húmero y fémur), úlceras en las piernas, hematuria, priapismo y complicaciones pulmonares y del sistema nervioso central. El mismo mecanismo probablemente es también el responsable de las crisis dolorosas periódicas típicas de esta enfermedad que se localizan más frecuentemente en abdomen, huesos y articulaciones. Además del daño localizado a ciertos órganos producido por la drepanocitosis intravascular, también puede ocurrir formación masiva y sistémica de drepanocitos que en algunos casos ha sido responsable de muerte súbita, principalmente en pacientes muy jóvenes y mujeres embarazadas.

El proceso hemolítico se incrementa en los drepanocitos pues éstos tienen una fragilidad mecanicaumentada y son más rápidamente fagocitados y destruidos que las otras células sin Hb-S. Muchas de las otras manifestaciones patológicas de esta enfermedad son consecuencia directa del proceso hemolítico establecido, como por ejemplo los desórdenes hepáticos y de la vesícula biliar, ictericia, hiperplasia de la médula ósea, litiasis biliar. La hemólisis también es causante de la anemia crónica la cual causa un desarrollo subnormal y la aparición de complicaciones cardíacas.

Manifestaciones clínicas:

Los síntomas atribuibles a esta anemia aparecen gradualmente durante los últimos meses del primer año de vida después de que la Hb-fetal normal del recién nacido ha sido

reemplazada por Hb-S. Lo frecuente es que estos pacientes vivan pocos años, sin embargo, debido a las mejoras en la terapéutica de esta enfermedad, frecuentemente se han visto pacientes que han vivido hasta los 40 años. La prolongación de la sobrevivencia lógicamente nos lleva a ver más frecuentemente eventos trombóticos en diferentes órganos. Después de los 30 años de edad parece haber una curiosa reducción en la severidad de las crisis dolorosas.

Tal vez las complicaciones más peligrosas en esta anemia son los episodios repetidos de infección. En los años recientes se han obtenido claras evidencias de que estos pacientes sufren una marcada susceptibilidad a infecciones severas, especialmente a la meningitis neumocócica (20). Pearson y col (10) han mostrado que los niños con esta enfermedad no pueden remover de la sangre partículas coloidales del tamaño de las bacterias, aparentemente porque el bazo está repleto de drepanocitos. Este estado de "asplenia funcional" puede explicar al menos en parte la propensidad a la enfermedad bacterémica neumocócica en esta población. Winkelstein y Drachman (20) han demostrado que el suero de pacientes con anemia de células falciformes es deficiente en opsoninas para el neumococo y que no tiene capacidad para incrementar la fagocitosis de los neumococos tal como lo hacen los sueros normales. Se piensa que la opsonización deficiente es debida a un defecto en el sistema de la properdina.

Barrett-Connor y col (42) condujeron un estudio en el condado de Dade, Florida, donde estudiaron las hospitalizaciones por procesos infecciosos bacterianos en un grupo de negros con esta anemia. En 166 pacientes encontraron 250 hospitalizaciones por las causas antes dichas. Un 30o/o de las hospitalizaciones fueron en niños de menos de 4 años de edad. Al comparar el riesgo de contraer infecciones bacterianas entre los negros con Hb S/S y los negros sanos encontraron que los primeros presentaban una posibilidad 25 veces mayor de contraer salmonelosis, 7 veces mayor para shigellosis, 8 veces mayor para tuberculosis y 309 veces mayor para meningitis bacteriana y entre estas fue 579 veces mayor para meningitis neumocócica y 116 para meningitis por influenza. Del total de la población de pacientes enfermos

con Hb S/S hubo un 90/o que mostró mayor susceptibilidad que el resto. Los niños tienen mayor susceptibilidad que se cree debida a la falta de anticuerpos específicos a los muchos tipos antigénicos de neumococos y otros piógenos.

Se sabe, por los mecanismos ya explicados anteriormente, que en esta enfermedad se desarrollan áreas de hipoxia focal en hueso, bazo, sistema nervioso central, pulmón, piel y riñón. En estas áreas localizadas es posible que como resultado de la hipoxia la capacidad bactericida de los leucocitos esté dañada. Es interesante que las cepas de Shigella, Salmonella y Neumococo que frecuentemente se encuentran en estos pacientes crecen bajo condiciones anaeróbicas. Por lo tanto estos pacientes son particularmente susceptibles a estas bacterias.

Otras causas de muerte, además de las infecciones, son descompensación cardíaca secundaria a la anoxia, descompensación hepática y procesos trombóticos principalmente del cerebro. Hay un estudio sobre la trombosis en vasos cerebrales hechos por Stockman y col (49) quienes usando angiografía cerebral estudiaron 7 pacientes con anemia de células falciformes y que mostraban déficit neurológico secundario a disfunción del sistema nervioso central. En 6 de los 7 pacientes se encontró una oclusión parcial o completa de vasos cerebrales grandes. En los 6 pacientes se encontró afectada la arteria carótida interna. También se observó trombosis de la cerebral anterior y cerebral media, así como de la vertebral. Estos hallazgos, raramente reportados, nos hacen pensar que la creencia de que las manifestaciones patológicas del sistema nervioso central en esta enfermedad son debidas a obstrucción de pequeños vasos cerebrales puede ser errónea.

El curso clínico de esta anemia se caracteriza por un proceso hemolítico crónico severo con crisis periódicas de dolor en huesos, articulaciones, espalda y abdomen. Estos ataques irregulares de dolor son a menudo extremadamente severos, migratorios en su naturaleza y pueden estar acompañados por fiebre, sensibilidad, espasmo muscular y leucocitosis. Las crisis abdominales pueden simular cuadros de abdomen agudo que a

veces han conducido a intervenciones quirúrgicas sin ninguna causa. A veces el inicio de las crisis dolorosas se relaciona con cuadros infecciosos, pero ocurren muchos episodios similares sin causa aparente. La mayoría de tales crisis duran de 5 a 7 días, dejando al paciente exhausto, debilitado y quejándose de malestar general. Estos episodios no se acompañan de cambios significantes en el metabolismo de los eritrocitos y deben ser distinguidos de las crisis hematológicas menos frecuentes que también pueden ocurrir.

Los hallazgos físicos y de laboratorio dependerán de qué órganos han sido afectados.

En los primeros años de la vida es frecuente observar dactilitis en los dedos de las manos y pies como un resultado de la oclusión vascular en los huesos distales. Las crisis de edema doloroso y calor local suelen recurrir con cierto intervalo hasta que finalmente desaparecen sin deformidad residual. Los pacientes con esta anemia tienen usualmente pobre desarrollo físico y cierto grado de retraso en las características sexuales secundarias. El hábito corporal es típico por la desproporción entre las extremidades largas y delgadas y el abdomen corto y redondeado. Las membranas mucosas y los lechos ungueales se encuentran pálidos y las escleróticas están usualmente intéricas. Pueden encontrarse procesos ulcerativos indolentes en la región de los maleolos o bien cicatrices atróficas de ulceraciones antiguas. En el fondo de ojo es común encontrar vasos tortuosos e irregularmente dilatados, además se ven trombos venosos en las regiones periféricas. Esto puede causar formación de nuevos vasos creciendo dentro del vítreo y causando hemorragia vítrea. Pueden ocurrir crisis recurrentes de dolor de pecho con infiltración pulmonar debido a obstrucción mecánica de los pequeños vasos pulmonares por los drepanocitos. Si esta trombosis ocurre en una área grande de la circulación pulmonar puede haber desarrollo secundario de anomalías cardíacas. El corazón está constantemente sometido al esfuerzo de un débito cardíaco aumentado impuesto por la anemia severa, así se llega a producir cardiomegalia y pueden llegar a haber soplos sistólicos o diastólicos.

Raramente se encuentra esplenomegalia después de la primera década de vida pues los episodios repetidos de trombosis e infarto en el bazo causan que este se fibrose gradualmente y que virtualmente llegue a "desaparecer". La hepatomegalia sí es un hallazgo frecuente. La enfermedad hepática se puede relacionar con una variedad de factores tales como anemia crónica y hemólisis, colestasis y coledocistitis con obstrucción. Un número significativo de pacientes tienen además episodios de obstrucción intrahepática provocados por masas de drepanocitos. Clínicamente puede ser difícil el diagnóstico diferencial con una hepatitis viral.

También en el riñón, donde la hipoxia es más marcada, pueden ocurrir cambios necróticos focales. Cuando anteriormente revisamos los cambios ocurridos en la presencia del "rasgo drepanocítico" describimos los hallazgos anormales en el riñón, detectado por microangiografía, tanto en los pacientes homocigóticos como en los heterocigotos.

Se han reportado episodios de artritis en varias formas durante y fuera de las crisis dolorosas. Orozco-Alcalá y Baum (37) estudiaron una paciente durante una crisis dolorosa y que presentaba dolor y edema de la rodilla derecha. El examen del líquido sinovial mostró hallazgos compatibles con un proceso infeccioso intraarticular sin embargo el frote no mostró bacterias y los cultivos para aerobios y anaerobios fueron negativos. Sin embargo, otros autores han reportado el hallazgo de líquidos sinoviales no purulentos durante procesos artríticos en estos pacientes. F. Saheb (43) encontró un caso de hemartrosis no asociado a crisis dolorosa. Los rayos X de ese paciente mostraron múltiples infartos óseos en la parte distal del fémur y proximal de la tibia con edema de la articulación, necrosis aséptica de ambas cabezas humerales y deformidad bicóncava de las regiones dorsal y lumbar de la columna. A.R. Patel (39) en un caso similar al anterior reportó el hallazgo radiológico de estrechamiento del espacio articular de la rodilla y osteoporosis del fémur distal y tibia proximal. Otras características radiológicas encontradas son: actividad eritropoética excesiva manifestada por trabeculaciones gruesas y aumento del tamaño de las cavidades medulares y

adelgazamiento de la corteza; los huesos del cráneo pueden presentar en su superficie la apariencia de pelos de punta con engrosamiento de los mismos.

Repetidas veces se ha encontrado derrame sinovial no purulento simultáneamente con las crisis dolorosas.

Se ha encontrado hiperuricemia en un 45o/o de estos pacientes. Las mujeres afectadas de esta enfermedad muestran una fertilidad reducida. El embarazo no es asociado con excesivo peligro en los casos que son adecuadamente manejados excepto por el caso sumamente raro en que ocurre formación masiva y sistémica intravascular de drepanocitos que causa la muerte súbita.

La anemia que se encuentra es normocrómica con recuentos de eritrocitos de aproximadamente 2.5 millones x mm^3 y niveles de hemoglobina de 7 a 8 g x 100 ml. Es frecuente observar leucocitosis moderada. En el frote periférico se encuentran células en tiro al blanco, policromasia, algunos drepanocitos y glóbulos rojos nucleados. Las pruebas de formación de drepanocitos son invariablemente positivas. Hay hemólisis acelerada, lo que se evidencia por la reticulocitosis, hiperplasia eritroide de la médula, índice hemolítico aumentado y disminución de la sobrevivencia de los eritrocitos. El análisis de la hemoglobina muestra la presencia de Hb-S con pequeñas cantidades de Hb-F (2 a 20o/o). No se encuentra Hb-A.

Una complicación hematológica seria en esta enfermedad es la crisis aplásica que usualmente se encuentra después de algún proceso infeccioso o reacción de hipersensibilidad pero puede aparecer sin causa precipitante. Hay una súbita y casi total cesación de la producción de glóbulos rojos, lo que combinado con la sobrevivencia disminuida produce una rápida declinación en el nivel de hemoglobina y eritrocitos. Si el paciente es mantenido con transfusiones, usualmente hay recuperación medular en 10 a 14 días y la recuperación se acompaña de una reticulocitosis marcada.

TRATAMIENTO

El tratamiento es principalmente de soporte o bien dirigido hacia las complicaciones específicas. Las crisis dolorosas periódicas son mejor manejadas con reposo en cama, analgésicos y si es necesario administración I.V. de fluidos para combatir la deshidratación. Miale (28) considera que la transfusión de eritrocitos puede aliviar la severidad de estas crisis. J.I. Brody (5) es partidario de usar la exsanguíneo transfusión limitada para aliviar o interrumpir las crisis dolorosas. Sin embargo, R. Nalbandian (30), quien ha estudiado ampliamente esta enfermedad, opina que el uso de transfusiones en estos casos es un anacronismo puesto que ya existe suficiente información molecular sobre la Hb-S lo que nos permite aplicar una quimioterapia molecular específica tal como la urea, cianato de potasio (7), (9) y tal vez carbamil fosfato.

Muchos autores están preconizando el uso de la Urea para el tratamiento de las crisis dolorosas y como tratamiento de sostén. R. Nalbandian ha estudiado exhaustivamente las acciones de la misma y concluye que su uso es recomendable para los fines antes indicados siempre y cuando se tenga la precaución de vigilar estrechamente la diuresis masiva que se produce con el uso de urea, principalmente porque para alcanzar niveles terapéuticos debemos mantener una concentración de urea sanguínea de no menos de 140 mg x 100 ml. Es esta la concentración mínima de urea necesaria para evitar la formación de drepanocitos.

Targino de Araujo et al (50) manejaron 20 pacientes con urea oral con 20 controles y encontraron que todos los pacientes tratados mostraron mejoría clínica notable e inclusive en 4 de sus pacientes encontraron aumento en la síntesis de hemoglobina. Lusher y Barnhart reportaron mejoría en 21 pacientes tratados con urea oral. Scrimgeour (44) reportó una mejoría moderada a marcada en 24 pacientes tratados con urea oral. Nalbandian (32) la usado con éxito urea intravenosa en soluciones de azucar. A pesar de estos informes positivos hay algunos autores que han reportado fracaso terapéutico usando urea (24) (36), pero en

todos sus pacientes los niveles sanguíneos de urea no llegaron a la cantidad recomendada.

Hay que insistir en la vigilancia de la diuresis durante el uso de la urea así como en mantener el nivel de urea sanguíneo arriba de 140 mg x 100 ml. Brody (6) reportó casos de diuresis que han variado de 12 a 20 litros de orina en un período de 20 horas después de usada la urea.

Cerami y col (7) investigaron el efecto del cianato como un inhibidor de la formación de drepanocitos, puesto que las preparaciones farmacéuticas de urea contiene pequeñísimas cantidades de cianato. El hallazgo de la actividad "anti-formación" de drepanocitos del mismo se originó con la hipótesis de que el cianato más que la urea era el responsable por los efectos beneficiosos reportados en pacientes tratados con urea. La terapia con urea se basa en que ésta rompe las uniones hidrofóbicas que se forman cuando la hemoglobina S reducida toma forma de gel dentro del eritrocito, pero resulta que las concentraciones necesarias para lograr este efecto son de 1 a 8 molar. La urea es rápidamente eliminada por el riñón por lo que parece difícil que tales niveles sean alcanzados y mantenidos en el paciente. Por otro lado, el cianato está en equilibrio con la urea y se ha demostrado que forma enlaces covalentes con varios grupos funcionales de proteínas. Cuando los eritrocitos de pacientes con Hb S/S son sometidos a una tensión de oxígeno hasta de 6 mm de Hg en presencia de cianato sódico o potásico no ocurre formación de drepanocitos en los mismos. A pesar de estos hallazgos aún no hay suficientes evidencias para derivar conclusiones sobre el papel del cianato en la terapia con urea. Se trataron 7 pacientes con Hb S/S con cianato y se encontró que los eritrocitos de los mismos mostraron una sobrevida mayor que la de los controles. Aún no se puede recomendar el uso clínico del cianato pues sus efectos no se han demostrado completamente. Si se desea ampliar sobre este tema se pueden consultar los trabajos de Cerami y col (7) y los de Charache y col (9).

La oxigenoterapia ha demostrado ser ineficaz en el tratamiento de la anemia de células falciformes. En el

tratamiento de las crisis dolorosas se ha usado bicarbonato, tolazoline, acetazolamida, anticoagulantes y esteroides pero ninguna de estas drogas ha demostrado ser efectiva (10).

La crisis aplásica tiene que tratarse vigorosamente con transfusiones y terapia de soporte hasta recobrar la función medular.

Las úlceras de las piernas se manejan con reposo, terapia local y manteniendo el nivel de hemoglobina arriba de 10 g x 100 ml por dos a tres semanas.

Los niños con gran esplenomegalia, que puede ocurrir antes de que se auto elimine el bazo pueden presentar un hiperesplenismo caracterizado por anemia grave persistente (hemoglobina inferior a 6 g x 100 ml) acompañada de trombocitopenia, leucopenia y una médula ósea hiper celular. Pueden producirse hemorragias espontáneas. El tiempo de supervivencia de los hematíes es sumamente corto y también los glóbulos de los donantes sufren una rápida destrucción. Aunque esta complicación no es frecuente, es importante reconocerla porque las necesidades transfusionales pueden hacerse excesivas y los resultados de la esplenectomía son en general muy buenos. La retención esplénica de los hematíes del donante, puede utilizarse como criterio pronóstico respecto al resultado de la esplenectomía. Hay que tener cuidado en las regiones palúdicas pues una gran esplenomegalia puede ser debida sólo a un caso de paludismo (causado por un plasmodio diferente al falciparum) y la esplenectomía en este caso es sumamente peligrosa.

EPIDEMIOLOGIA DE LAS HEMOGLOBINOPATIAS

Antes de entrar a estudiar la epidemiología de las hemoglobinopatías en Guatemala, y para una mejor comprensión de la misma, haremos una exposición de la distribución mundial de las hemoglobinopatías, sus movimientos migratorios y su frecuencia en los distintos países. Hacemos referencia a datos obtenidos principalmente de fuentes estadounidenses debido a que es en este país donde existen los estudios más completos a este respecto.

EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL

La presencia de las principales hemoglobinopatías en este continente es un reflejo de la inmigración de personas procedentes de Europa, Asia y Africa. La distribución mundial se esquematiza en los siguientes mapas: (Figuras 10 y 11)

Se cree que la mutación que originó la hemoglobina "S" se originó en Africa Central y de allí se extendió al Mediterráneo y Asia Suroriental, aunque esta migración pudo ocurrir en sentido opuesto también.

La mutación que originó la hemoglobina "C" apareció probablemente en el Africa Oriental; la de la hemoglobina "E" en Asia Suroriental; la de la hemoglobina "D" en India y el Cercano Oriente.

La incidencia actual de las hemoglobinopatías en varios países probablemente refleja el flujo de conquistas en el Mediterráneo y el cercano Oriente (28).

La frecuencia de las hemoglobinopatías está siendo actualmente estudiada ampliamente en los Estados Unidos, país en donde ya cuenta con programas funcionales de detección en masa, así como de consejo genético para las personas afectadas. Los programas de detección están siendo actualmente sometidos a controversia pues hay algunos puntos en contra de los mismos pues si no son bien llevados pueden causar un daño en la población negra como veremos detenidamente más adelante.

En los Estados Unidos el rasgo drepanocítico A/S y el rasgo A/C son relativamente comunes entre los negros (29). Los desórdenes más serios como la anemia de células falciformes, la talasemia beta combinada con hemoglobina S, la hemoglobinopatía S/C y otros son muchos menos frecuentes, aunque se encuentran ocasionalmente. Todavía no se dispone de estudios de grandes poblaciones para determinar la frecuencia exacta de éstos.

Se puede calcular la frecuencia esperada de anemia de células falciformes al momento del nacimiento usando el procedimiento estadístico de "Hardy-Weinberg" (29) que se basa en la frecuencia del gene de la hemoglobina S. La incidencia de la misma al nacimiento, en los Estados Unidos, entre la población negra no debe ser más de 1:204 ni menos de 1:1111 y lo más probable es que sea de 1:625. Obviamente, la prevalencia de la enfermedad en adultos será menor que la incidencia al nacimiento y esto es debido a la mortalidad propia de la enfermedad. Es por esta razón que encontramos una prevalencia de la misma muy baja en áreas subdesarrolladas en Africa, pues la mayoría de los pacientes mueren por su anemia durante la infancia. En los Estados Unidos se calcula que la mitad de los pacientes mueren antes de los 20 años de edad y la mayoría no llegan a los 40 a 45 años. Asumiendo estos datos como correctos, la incidencia en una población de 20 años de edad será la mitad que al nacimiento, o sea, un máximo de 1:408, mínimo de 1:2222 y lo más probable 1:1250.

Asumiendo que el promedio de vida de estos pacientes es 1/3 del de las personas supuestamente normales, entonces la prevalencia real entre el total de la población negra tendrá un máximo de 1:612, un mínimo de 1:3333 y lo más probable de 1:1875. Como los pacientes con síntomas clínicos son los que más acuden a los programas de detección, tenemos que los estudios basados en participación voluntaria solamente darán altas frecuencias falsas de desórdenes sintomáticos como la anemia de células falciformes.

Es importante destacar que también se ha detectado una alta frecuencia relativa de desórdenes drepanocíticos diferentes a



Fig. 10

Distribución del gene de "células falciformes" (área sombreada).



Fig. 11

Distribución mundial de las hemoglobinopatías (área sombreada).

la anemia de células faciformes. Si consideramos conjuntamente la hemoglobinopatía S/C y la combinación de beta talasemia con hemoglobina "S" hallamos un número casi igual o mayor al de los casos de anemia de células falciformes, aunque es importante resaltar que para comparar estas entidades tenemos que tomar en cuenta que tanto la Hemoglobinopatía S/C como la Beta talasemia con Hb—"S" tienen un curso clínico usualmente benigno y casi sin síntomas por lo que la mortalidad de éstas será mucho menor que la de la anemia de células falciformes. Para mayores detalles sobre estos datos puede consultarse el artículo de A.G. Motulsky (29).

Prevalencia estimada de todos los casos de desórdenes drepanocíticos en población negra de Estados Unidos

| Hemoglobinopatía | Máximo | Mínimo | Más Probable |
|---------------------|--------|----------|--------------|
| Hb S/S | 1:612 | 1:3333 | 1:1875 |
| Hb S/C | 1:466 | 1:5000 | 1:1250 |
| Hb S/Beta talasemia | 1:1429 | 1:13,333 | 1:3333 |

PROGRAMAS DE DETECCION EN MASA: SUS CONVENIENCIAS E INCONVENIENCIAS

Los programas de detección de hemoglobinopatías son relativamente muy fáciles de montar pues disponemos de pruebas diagnósticas de laboratorio que son muy sencillas, baratas y de alta confiabilidad, como estudiamos ampliamente en el capítulo sobre "Pruebas Diagnósticas". El problema real es determinar cual será la población a estudiar y ya determinada esta debemos establecer un "Consejo Genético" sensato y comprensivo pues de lo contrario puede que sólo logremos causar más ansiedad y frustración en la población susceptible debido al desconocimiento de la importancia real de poseer el rasgo heterocigótico como ocurre en el 80/o de los negros de los Estados Unidos (46), de la comprensión del pronóstico y la importancia de no procrear entre los desafortunados con enfermedad homocigótica. Es por estos inconvenientes que las personas que viven en el Mediterráneo en regiones muy afectadas con Talasemia, no son examinadas de rutina para identificar la misma; tampoco a los habitantes de Ghana se les examina rutinariamente para identificar la hemoglobina-S, excepto cuando se van a someter a un riesgo especial como la anestesia general. Sin embargo, en los Estados Unidos sí existen programas de detección en masa y es interesante aprender la experiencia obtenida por ellos para aplicarla, eventualmente, en nuestro medio

Entre los principales problemas de los exámenes rutinarios en masa tenemos: (46)

a. Determinación de la edad a la cual practicar el examen.

Es un problema decidir a qué edad es cuando debemos identificar la enfermedad. Obviamente que antes del matrimonio es muy tarde, excepto si ambos miembros son heterocigotos y deciden no tener hijos. Examinar a adultos con familias establecidas es de poca utilidad, excepto para ponernos sobreaviso y examinar a los hijos cuando se detecta la

enfermedad en alguno o en ambos padres. El examen al momento del nacimiento es aún técnicamente difícil, aunque esta es la edad más accesible. El examen en la infancia tiene el inconveniente que está aún muy remota la fecha del matrimonio.

b. La creación de registro de portadores.

Los registros de portadores de Hb A/S pueden originar muchos problemas pues estas personas pueden quedar excluidas de algunos seguros de vida o ciertas carreras. En aquellos países donde existe discriminación racial para los negros, esta es una carga más a esta población.

c. Programas de detección simultaneos con consejo genético.

Si identificamos a una persona heterocigota y no tenemos simultaneamente un programa de consejo genético, la persona afectada corre el grave riesgo de no comprender realmente de que se trata su enfermedad y con esto estaremos aumentando su aprehensión y no obtendremos ningún beneficio de esta detección (52). La persona afectada puede creer que su salud está seriamente amenazada y aunque estas personas sí tienen cierto riesgo bajo determinadas condiciones, eso no justifica crear un marcado nivel de ansiedad en aproximadamente el 10o/o de la población negra (10o/o en Estados Unidos).

d. Información al público correcta.

La información al público debe ser clara y precisa. En algunos lugares se ha dado información alarmante y falsa con las consecuencias que podemos esperar (52).

e. Certeza diagnóstica.

Algunos médicos han hecho diagnósticos incorrectos diciéndole al paciente con el rasgo heterocigótico que padecen de "anemia de células falciformes" (52).

f. Identificación de paternidad.

Se puede crear un problema muy serio en una familia al identificar a uno de los hijos con Hb-S y encontrar que el padre no la presenta.

Como hemos visto, los programas de detección son discutidos en cuanto a su utilidad. Sin embargo hay autores que han reportado programas de detección llevados a cabo simultaneamente con "buen" consejo genético habiendo obtenido resultados muy alentadores (45).

La situación en Guatemala es algo diferente y debemos analizarla de acuerdo a nuestras características. Presentamos esta discusión más adelante en el capítulo respectivo.

"DISCUSION DE LOS RESULTADOS"

Como se era de esperar, la única hemoglobina anormal que se encontró fue la "A/S" y todos los casos fueron en personas de raza negra. La frecuencia obtenida del 60/o es muy similar a la observada en otros países como los Estados Unidos que es del 80/o. No nos extraña no haber encontrado ningún caso de hemoglobina S/S (homocigótica) pues la frecuencia de éstos es muy baja. En los Estados Unidos se calcula que es de 1:600.

La hemoglobina A/S se puede encontrar en cualquier edad pues, salvo excepciones muy notables, no produce ninguna patología.

En Guatemala se han reportado algunos casos aislados de hemoglobina A/S entre personas "no-negras" pero no se ha podido llegar a descartar completamente la posibilidad de ascendencia de color en tales casos (2).

Ya hemos dicho que los casos heterocigotos tienen, en su mayoría, una expectativa de vida normal; entonces nuestra acción debe ir dirigida a evitar la formación de parejas entre personas portadoras y así impedir la eventual procreación de casos homocigóticos o heterocigóticos.

El problema es decidir a qué edad y como se le debe informar a la persona afectada que posee el rasgo heterocigoto, pues no hay duda que ésto creará un mercado grado de ansiedad en ella y si no hacemos nuestro consejo genético debidamente no obtendremos ningún resultado. Es muy importante decidir a qué edad se debe hacer la detección y se debe dar la información. Si la información se da en la infancia, la fecha del matrimonio estará aún muy remota y posiblemente cuando se llegue ya se habrá olvidado el asunto. Si se hace antes del matrimonio como parte del examen pre-matrimonial, difícilmente las personas afectadas cambiarán la decisión respecto a la elección de su pareja. Si se hace en personas casadas es muy difícil que se abstengan de procrear y lo más probable es que corran el riesgo. Si se hace en personas que ya no están en edad fértil no tiene ninguna utilidad.

Así pues la conducta a seguir dependerá de cada caso particular, de acuerdo a la cultura y el carácter de la persona afectada. Los resultados de nuestro "consejo genético" dependen en gran parte del modo como abordemos el problema ante el paciente y de nuestra capacidad para hacer que él comprenda los más importantes aspectos en relación a su estado heterocigótico.

No creo que en ningún caso sea conveniente dar la información sin efectuar simultáneamente un buen consejo.

Comprendemos claramente que la anemia de células falciformes no es un problema prioritario dentro de la patología nacional pues sólo una pequeña minoría de nuestra población la padece, sin embargo sí creemos que debe tener prioridad dentro de la patología específica de la raza negra pues ya hemos visto la alta frecuencia de casos heterocigotos de donde podemos deducir que hay una relativa alta probabilidad de formación de parejas entre ellos, con el consiguiente riesgo de procreación de casos homocigóticos y nuevos casos heterocigóticos.

Tenemos que aclarar que las hemoglobinas S y D tienen idéntica velocidad electroforética y que para diferenciarlas hay que recurrir a procedimientos especiales, sin embargo debido a que la Hb-D es sumamente rara, y que nunca ha sido reportada en nuestro país, mientras que la Hb-S es por el contrario relativamente frecuente, hemos inferido que nuestros hallazgos corresponden a hemoglobina "S".

RECOMENDACIONES

Es un hecho que las hemoglobinopatías y específicamente la anemia de células falciformes no son un problema de importancia primaria en nuestra población, sin embargo, si creo que debemos darle a la población negra —que es la afectada— la ayuda que actualmente está a nuestro alcance y que considero puede ser:

1. Hacer divulgación entre los médicos residentes en áreas de población negra sobre la frecuencia de esta enfermedad en dichas áreas.
2. Poner al alcance de estos médicos toda la información necesaria sobre mecanismos fisiopatológicos, sintomatología, métodos de diagnósticos de laboratorio y tratamiento de las hemoglobinopatías.
3. Insistir que el manejo de casos homocigotos es relativamente sencillo y puede llevarse a cabo en cualquier hospital departamental.
4. Destacar la importancia de la detección de casos heterocigotos y poner énfasis en hacer siempre consejo genético cuando se informe a una persona sobre su estado.
5. Para detección de casos sospechosos recomendamos que se efectúen primero alguna de las pruebas de formación de drepanocitos o reacciones de solubilidad, las cuales son muy económicas y posibles de hacer, aún en la clínica del médico. En los casos positivos debe siempre identificarse la hemoglobina y recomendamos para ello el método de electroforesis sobre acetato de celulosa.
6. Recomendamos que en los futuros censos de población se especifique el número de habitantes de raza negra, ya que en las estadísticas nacionales no existe este dato (16).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Abnormal hemoglobin electrophoresis, technical discussion. Los Angeles, Hyland laboratories, 1967, 7 p.
- 2) Alvarado M. Jorge e I. Fortuny. Anemia de células falciformes en una familia originaria del departamento de Guatemala. Revista del Colegio Médico de Guatemala 22 (1): 9-18 Marzo 1971.
- 3) Avendaño E. Rodolfo. Drepanocitemia y anemia de células falciformes en Guatemala. Tesis (Médico y Cirujano) Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas, 1958. 33 p.
- 4) A.E. and J.A. Ikomi-Kumm. Increased metabolic heat production by erythrocytes in sickle cell disease. The Lancet 1 (7762): 1215, June 3, 1972.
- 5) Brody, J.I. et al. Symptomatic crisis of sickle cell anemia treated by limited exchange transfusion. Annals of Internal Medicine 72 (3): 327-330 March 1970.
- 6) Brody, J.I. Treatment of sickle cell crisis. The New England Journal of Medicine 287 (12): 616, September 21, 1972.
- 7) Cerami, A. Cyanate as an inhibitor of red cell sickling. The New England Journal of Medicine 287 (17): 807-812, October 19, 1972.
- 8) Craddock, P.R. Bacterial infection in sickle cell disease. The New England Journal of Medicine 288 (24): 1301, June 14, 1973.
- 9) Charache, S. and P.F. Milnes. Cyanate effect in sickling. The New England Journal of Medicine 287 (26): 1357-1358, December 28, 1972.

- 10 Chernoff, Amoz I.- The hemoglobinopathies and thalassemia. IN: Beeson and McDermott, Cecil Loeb Textbook of Medicine. 12 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1968, pp. 1043-1047.
- 11 Chindavanig Seepis and R. Gumnardpetch. Separation and quantitation of hemoglobin H and hemoglobin Bart's by electrophoresis on gellatinized cellulose acetate. American Journal Clinic of Pathology 60 (4): 458-461 October 1973.
- 122 Clinical electrophoresis, Gelman procedures for special electrophoresis. Michigan, Gelman Instrument Company, 1970, 72 p.
- 13 Gold, M.S. et al. Sickle cell anemia and hyperuricemia. The journal of the American Medical Association 206 (7): 1572-1573, November 11, 1968.
- 14 Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency and favism. The Lancet 2(7631): 1177, November 29, 1969.
- 15 Greenberg, M.S., H.A. Harvey and C. Morgan. A simple and inexpensive screening test for sickle hemoglobin. The New England Journal of Medicine 286 (21): 1143-1144, May 25, 1972.
- 16 Guatemala, Dirección General de Estadística. Anuario estadístico. 1971, 257 p.
- 17 Gurrick, M.D., P. Dembure and R. Guthrie. Screening for hemoglobinopathies employing blood specimens on filter paper. The New England Journal of Medicine 288 (24): 1265-1267, June 14, 1973.
- 18 Guyton, Arthur C. Tratado de Fisiología Médica. Trad. Alberto Folch y Pi. 3 ed. México, Interamericana, 1967, pp.

- 19 Haynes, J.K. and V.M. Ingram. A simple screening procedure for hemoglobin "S". The New England Journal of Medicine 288 (1): 49, January 4, 1973.
- 20 Johnston, R.B., S.L. Newman and A.G. Strath: Serum opsonins and the alternate pathway in sickle cell disease. The New England Journal of Medicine 288 (16): 803-808, April 19, 1973.
- 21 Jones, S.R., R.A. Binder and E.M. Donowho Jr. Sudden death in sickle cell trait. The New England Journal of Medicine 282 (6): 323-325, February 5, 1970.
- 22 Kazakian Jr., H.H. and A.P. Woodhead. Hemoglobin "A" synthesis in the developing fetus. The New England Journal of Medicine 289 (2): 58-62, July 12, 1973.
- 23 Konotey-Ahulu, F.I.D. G-6-PD deficiency and sickle cell anemia. The New England Journal of Medicine 288 (17): 887-888 October 26, 1972.
- 24 Lipp, E.C., R.A. Rudders and A.V. Pisciotta. Oral urea therapy in sickle cell anemia—a preliminary report—. Annals of Internal Medicine 76 (5): 765-768, May 1972.
- 25 Loh-Wei-Ping. Evaluation of a rapid test tube turbidity test for the detection of sickle cell hemoglobin. American Journal of Clinical Pathology 55 (1): 55-57, January 1971.
- 26 Louderback, A.L. and E. Schanbrom. Hemoglobin electrophoresis. The Journal of the American Medical Association 202 (8): 718-719, November 20, 1967.
- 27 Lusher, J.M. and M.I. Barnhart. Oral prophylactic use of urea in sickle cell disease. EN: Proceedings. Detroit, Annual Blood Symposium, Sickle Cell Disease, 20. Wayne State University School of Medicine, January 20, 1972 pp. 18-22.

- 28 Miale, John. Laboratory medicine hematology. 3 ed. Saint Louis, The C.V. Mosby, 1967 pp. 750-821.
- 29 Motulsky, A.G. Frequency of sickling disorders in U.S. blacks. The New England Journal of Medicine 288 (1): 31-33, January 4, 1973.
- 30 Nalbandian, R.M. More on urea and sickling. The New England Journal of Medicine 287 (20): 1046-1047, November 16, 1972.
- 31 Nalbandian, R.M. Sick cell crisis terminated by intravenous urea in sugar solutions—a preliminary report—. The American Journal of Medical Science 261 (6): 309-324, January 1971.
- 32 Nalbandian, R.M. et al. Oral urea and the prophylactic treatment of sickle cell disease—a preliminary report—. American Journal of Medical Science 261 (6): 325-334, January, 1971.
- 33 Nauman, L.W. Cost of sickle cell test. The New England Journal of Medicine 287 (20); 1046, November 16, 1972.
- 34 Newman, Donald R., R.V. Pierre and J.W. Linman. Studies on the diagnostic significance of hemoglobin F levels. Mayo Clinic Proceedings 48 (3): 199-202, March 1973.
- 35 OMS. Tratamiento de las hemoglobinopatías y trastornos afines. Grupo científico de OMS, 8 de Junio de 1971, Ginebra, 1972, (Serie de informes técnicos No. 509).
- 36 Opió, E. and P.M. Barnes. Intravenous urea in treatment of bone pain crisis of sickle cell disease—adouble blind trial—. The Lancet 2 (): 160-162, 1972.
- 37 Orozco, J.A. and J. Baum. Arthritis during sickle cell crisis. The New England Journal of Medicine 288 (8): 420 February 22, 1973.
- 38 Paiz Carlos. Estudio preliminar de las hemoglobinas en Guatemala. Tesis (México y Cirujano) Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas, 1959, 48 p.
- 39 Patel, A.R. Arthropathy in sickle cell disease. The New England Journal of Medicine 288 (18): 970, May 3, 1973.
- 40 Piomelli, S. et al. Clinical and biochemical interactions of glucose—6—phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell anemia. The New England Journal of Medicine 287 (5): 213-218, August 3, 1972.
- 41 Ratnaubol, K.K. et al. A rapid screening slide test for hemoglobin S. American Journal of Clinical Pathology 52 (6): 705-707, December 1969.
- 42 Rosen, F.S. Sickle cell disease and the properdin system. The New England Journal of Medicine 288 (16): 845-846, April 19, 1973.
- 43 Saheb, F. Arthropathy in sickle cell disease. The New England Journal of Medicine 288 (18): 971, May 3, 1973.
- 44 Scrimgeour, A.W. Oral Prophylactic urea in treatment of sickle cell disease and problems encountered. EN: Proceedings. Detroit, Annual Blood Symposium, Sickle Cell Disease, 20. Wayne State University School of Medicine, January 20, 1972. pp. 35-38.
- 45 Shine, I. Problems of sickle cell screening. The New England Journal of Medicine 288 (18): 971, May 3, 1973.
- 46 Sickle cell—point, counterpoint—. The New England Journal of Medicine 289 (6): 323-324, August 9, 1973.

- 47 Statius van Eps, L.W. et al. Nature of concentrating defect in sickle cell nephropathy. The Lancet 1 (7644): 450-451, February 28, 1970.
- 48 Steinberg, M. and B.J. Dreiling. Glucose 7 phosphate dehydrogenase deficiency in sickle cell anemia. Annals of Internal Medicine 80 (2): 217-220, February, 1974.
- 49 Stockman, J.A. et al. Occlusion of large cerebral vessels in sickle cell anemia. The New England Journal of Medicine 287 (17): 846-849, October 26, 1972.
- 50 Targino de Araujo, J., A. Wronowsky J.S. Cimino. Demonstration of Hb-A in patients with sickle cell anemia (Hb-SS) and the synthesis of "A" and "S" hemoglobins following administration of urea orally. EN: Abstract. Sao Paulo, International Congress of Hematology, 353. July 16, 1972.
- 51 Tejada, Carlos, Nanci L. De Gonzalez y Margarita Sanchez. El factor Diego y el gene de células falciformes entre los caribes de raza negra de Livingston, Guatemala. Revista del Colegio Médico de Guatemala 16 (2): 83-86, Junio de 1965.
- 52 Whitten, C.F. Sickle cell programming -an imperiled promise-. The New England Journal of Medicine 288 (6): 318-219, February 8, 1973.

Br. MIGUEL A. GARCES DE MARCILLA BOBES

Dr. RODOLFO LORENZANA
Asesor

Dr. JAIME COHEN A.
Revisor

Dr. JULIO DE LEON M.
Director de Fase III

Dr. FRANCISCO SAENZ BRAN
Secretario

Vo.Bo.

Dr. CARLOS ARMANDO SOTO
Decano