

ACTUALIZACIONES

IMPORTANCIA CLINICA DE LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES

A. RESTREPO

INTRODUCCION

En 1949 Pauling descubrió que la anemia falciforme era debida a una alteración de la molécula de hemoglobina (1). Desde entonces, son muchos los avances en la patología molecular de las hemoglobinas anormales. Las hemoglobinopatías son los trastornos clínicos más comunes que resultan de una sola mutación genética y producen un gran problema de salud pública a nivel mundial. Su estudio ha hecho desarrollar nuevas técnicas que se han aplicado a otras enfermedades, demostrando que la biología molecular, además de ser un bello ejercicio intelectual, puede tener utilidad práctica.

ESTRUCTURA Y SINTESIS DE LA HEMOGLOBINA NORMAL

Estructura. La hemoglobina humana es una proteína globular que consta de cuatro cadenas de polipéptidos. La hemoglobina del adulto normal (Hb. A.) tiene dos cadenas Alfa constituidas por 141 aminoácidos y dos cadenas Beta con 146 aminoácidos. Se escribe $\alpha_2\beta_2$. La molécula del Heme, estructura anular de protoporfirina

compleja que contiene hierro, está unida a cada una de estas cadenas. En la vida fetal el pigmento respiratorio es la Hemoglobina F la cual tiene dos cadenas Alfa idénticas a las de la hemoglobina A y en lugar de cadenas Beta tiene dos cadenas Gamma, se escribe $\alpha_2\gamma_2$

La interacción de las cadenas de aminoácidos se pliegan entre sí en una estructura tridimensional que se observa como una formación compleja a la cristalografía de rayos X. La reproducción exacta tridimensional es necesaria para que pueda efectuar con eficiencia el transporte del oxígeno.

Las áreas de importancia funcional de la molécula de hemoglobina son los contactos entre las cadenas de la globina y los grupos Hemes. Las cadenas Alfa están en contacto con las cadenas Beta en áreas críticas, llamadas contactos $\alpha 1$

$\beta 1$ y $\alpha 1\beta 1$, pero ellas, a su vez, hacen contactos relativamente débiles con la siguiente cadena Alfa. A su vez las cadenas Beta hacen contactos fuertes con la subunidad $\alpha 1\beta 1$ pero lo hace débil con su homóloga. Es importante en el hombre que la curva de disociación del oxígeno sea sigmoide, ya que de otra manera su actividad sería muy limitada. Durante los procesos de oxigenación y de desoxigenación ocurren una serie de alteraciones espaciales tanto dentro, como entre las subunidades, que facilitan la captación y la

Dr. Alberto Restrepo Mesa: Profesor de Medicina, Jefe Sección Hematología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Solicitud de separatas al Dr. Restrepo.

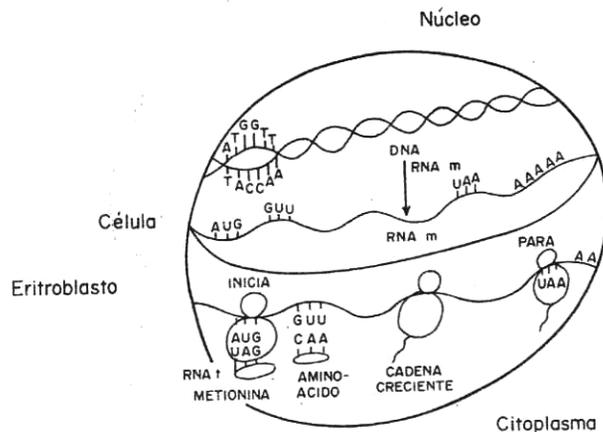


Figura 1 Control genético de la síntesis proteica.

liberación del oxígeno una vez que el grupo Heme se ha oxigenado o desoxigenado.

Además, para que el hierro del Heme pueda realizar efectivamente su función reversible de oxigenador, debe estar protegido en un bolsillo libre de agua. Se reconoce, a su vez, que la molécula de hemoglobina debe conservar impecablemente su configuración tridimensional para ser estable y efectuar su función, ya que la sola sustitución de un aminoácido puede alterar sus propiedades en forma sustancial.

Síntesis y Control Genético. El orden de los aminoácidos en la globina está en la información genética del Desoxirribonucleico (DNA), según el orden de la constitución de las bases: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C). Es una regla que sean en pareja A y T, G y C, en la helice del DNA. El código es de 3 letras o código de 3 bases para determinado aminoácido.

El código es "degenerado" que quiere significar que hay más de una palabra del código para cada aminoácido. La información almacenada en el DNA debe ser transportada del núcleo al citoplasma por un intermediario llamado Ribonucleico mensajero (RNAm). Cuando una molécula de RNAm ha de ser transcrita, la helice del DNA se abre y se copia una información. El Ribonucleico (RNA) es muy similar al DNA excepto que éste tiene un azúcar diferente, desoxiri-

bosa, en lugar de ribosa y la base Timina (T) es reemplazada por Uracilo (U), el cual sólo puede formar un par de bases con Adenina. Una vez que un fragmento de DNA es copiado, el proceso es catalizado por una enzima, la polimerasa del RNA, la banda de RNAm que resulta, a causa de la regla de que las bases van en pares, se hace una copia fiel del DNA. Se conoce claramente que el RNAm inicial es una molécula precursora larga llamada RNAhm (heterógena), la cual después de procesada se hace más pequeña y se difunde por el citoplasma y actúa en la síntesis de proteínas.

La síntesis proteica se hace en tres etapas (Figura 1) denominadas iniciación, alargamiento y terminación, a) Iniciación: Los aminoácidos que forman una molécula de globina no pueden interactuar directamente con el RNAm, necesitan ser movilizados por un vehículo, el Ribonucleico transportador (RNA t). Cada RNA t tiene 3 bases, llamadas anticodon, que se adaptan a las tripletas complementarias del RNAm. Para iniciar la síntesis proteica se necesita un RNA t específico que lleva metionina. Hay una palabra inicial o tripleta base en el RNAm, que es probablemente AUG, a la cual se une el RNA t. b) La cadena de péptidos iniciada es alargada por el ribosoma. Estos, son moléculas específicas hechas de RNA y proteínas. Los ribosomas tienen una subunidad grande y otra pequeña, que al unirse sostienen la cadena en crecimiento, tienen sitio para alojar el RNA t, las enzimas adecuadas y ensamblan los distintos aminoácidos que forman la cadena. Una vez que el primer aminoácido está en posición, se mueve el segundo por el RNA t y se forma una unión peptídica entre las dos. La cadena tiene en este momento 2 aminoácidos. Este proceso continúa por acción del RNAm sobre el Ribosoma y la cadena aumenta en longitud, c) El proceso de alargamiento y traslado continúa hasta cuando hace su aparición una tripleta básica específica con la información "Fin". Luego el Ribosoma suelta el RNAm y la cadena de péptidos completa es liberada.

La parte del Heme de la molécula de hemoglobina es sintetizada separadamente por una serie de etapas enzimáticas controladas que se inicia con succinato activo del ciclo de Krebs y

Tabla 1 - Producción de hemoglobina falciforme por cambio de una base en el código genético.

HEMOGLOBINA A - CADENA BETA -				
Gene	TGA	GGT	CTC	CTC
RNA _m	ACU	CCA	GAG	GAG
Globina	Treo	Pro	Glu	Glu

HEMOGLOBINA S - CADENA BETA -				
Gene	TGA	GGT	<u>CAC</u>	CTC
RNA _m	SCU	CCA	<u>GUC</u>	GAG
Globina	Treo	Pro	<u>Val</u>	Glu
Posición Cadena	4	4	6	7

termina en el anillo protoporfirínico complejo con el hierro en el centro.

A medida que se sintetizan las cadenas de globina éstas se pliegan entre sí y el Heme se inserta en su bolsillo y se ensamblan para formar el tetrámero de hemoglobina.

En el proceso ordenado de este sistema tiene función completa el ritmo de transcripción del RNA_m para que la célula alcance su nivel óptimo de hemoglobina. Una revisión reciente de la Síntesis de la Hemoglobina fué hecha por Clegg (2).

HEMOGLOBINAS ANORMALES

El trastorno genético de la síntesis de las hemoglobinas anormales ocasiona una alteración estructural en la cadena de la globina lo cual afecta la función y estabilidad de la molécula.

El mecanismo más simple en la producción de una variante de la hemoglobina es la sustitución de una base en el código genético que da origen a una mutación. El más conocido, es el cambio de configuración molecular que ocasiona la sustitución del ácido glutámico por valina en la posición 6 de la cadena Beta, que da origen a la anemia falciforme (3), (Tabla 1). Esta mutación ocasiona que la molécula de hemoglobina quede bloqueada durante la desoxigenación y produce distorsión de la célula en forma de hoz. Esto da origen a los dos hallazgos clínicos más importantes: las trombosis vasculares y la anemia

hemolítica por la disminución de la sobrevivencia de los eritrocitos.

Hasta octubre de 1973 en el Atlas de secuencia protéica se habían descrito 174 hemoglobinas anormales con estructura química anormal de la hemoglobina, así: 61 alteraciones de la cadena Alfa (α), 99 de la cadena Beta (β), 8 en la cadena Gamma (γ) y 6 en la cadena Delta (δ). Además, 9 cambios en la longitud de la cadena, así: 6 variantes Beta por la delección de uno a cinco aminoácidos dentro de la cadena y una con el excedente de 10 residuos de aminoácidos al fin de la cadena y 2 variantes Alfa con más residuos al fin de la cadena (4).

Si bien la mayoría de las sustituciones de aminoácidos no causa anormalidad clínica o fisiológica, algunos, por su posición en la cadena alteran la función o la estabilidad de la hemoglobina y pueden ocasionar varios síndromes clínicos. La supervivencia de los eritrocitos puede estar disminuida si se reduce la solubilidad de la hemoglobina, los eritrocitos son más rígidos que lo normal y no pueden pasar fácilmente a través de la microcirculación. Esto es lo que ocurre en la anemia hemolítica discreta observada en la hemoglobinopatía C.

HEMOGLOBINOPATIAS COMUNES EN COLOMBIA

En Colombia se han descrito más de 20 variedades de hemoglobinas anormales, incluyendo la talasemia, en la cual hay un déficit cuantitativo de la síntesis de hemoglobina (5). Entre éstas se encuentran las hemoglobinopatías más comunes y de importancia clínica como la anemia falciforme (Hb. S-S), la enfermedad hemoglobina S-C, la enfermedad Hb. C-C y la Talasemia hemoglobina S. Un resumen de sus principales hallazgos clínicos se observa en la Tabla 2.

Otras variantes estructurales y de función de la hemoglobina normal de importancia clínica son:

A. Hemoglobinas M. Metahemoglobinemias Hereditarias. Cianosis Congénita (6). El hecho clínico llamativo asociado con las hemoglobinas M es la cianosis o más precisamente el color grisáceo de la piel. Esta anormalidad se presenta desde el nacimiento en las variantes de la cadena-Alfa y desde los 6 meses de edad en los portado-

Tabla 2 *Hallazgos clínicos de las hemoglobinopatías comunes*

CLINICA Y OTROS	S-S	S-C	S- β TALASEMIA	C-C
1 Anemia	Grave	Ligera ó Moderada	Moderada ó Grave	Ligera ó Moderada
2 Ictericia	Siempre	Variable	Variable	A veces
3 Dolor óseo y articular	Si	Si	Si	Ocasional
4 Desarrollo físico	Subdesarrollo normal muy alto	Normal	Normal ó como S-S	Normal
5 Esplenomegalia	Si en la niñez	Común	A veces	A veces
6 Hepatomegalia	Común	Rara	A veces	Rara
7 Ulceras en las piernas	Común	Rara	Ocasional	Rara
8 Necrosis aséptica cabeza femoral	A veces	Común	A veces	Rara
9 Hemorragia del vítreo	Muy rara	Común	Muy rara	No
10 Protrusión de dientes y mandíbula	Común	Rara	A veces	Muy rara
11 Deformidad del cráneo	Común	Rara	A veces	No
12 Cabello erizado Rayos X cráneo	A veces	No	A veces	No
13 Cambios óseos Rayos X	Siempre	Común	Común	Rara
14 Cardiomegalia con o sin soplos	Común	Rara	A veces	Muy rara
15 Hematuria	A veces	A veces	A veces	No
16 Historia de Priapismo ocasional	Si	Si	Si	No
17 Prueba del "Siclaje"	Positiva	Positiva	Positiva	No
18 Dianocitos en extendido	Si	Si	Si	Si
19 Prueba de cristalización	-	Diagnóstica	-	Diagnóstica
20 Gravedad	Grave	Ligera ó Grave	Moderada ó Grave	Ligera ó Moderada

res de la anormalidad en la cadena Beta. La coloración de la piel se debe a cambios en color de la sangre inducido por absorción especial de la luz de los grupos Hemes, además, en las hemoglobinopatías M que exhiben poca afinidad por el oxígeno hay cianosis, Vgr.: Hb. M. Boston. En las variantes de la cadena Beta hay proceso hemolítico.

La cianosis no se asocia con dedos en palillo de tambor o disnea de esfuerzo y las personas afectadas, tienen un promedio de vida normal. Su mayor importancia clínica es la posibilidad de un mal diagnóstico. Se informa de un niño quien iba a ser intervenido para pseudotronco arterioso. La cirugía no se efectuó al conocerse que un familiar era portador de la hemoglobina M. Boston.

Diagnóstico: a) Su diagnóstico debe considerarse en toda persona con cianosis o coloración homogénea anormal de la piel, especialmente cuando se ha descartado anormalidad cardio-pul-

monar. b) Se puede sospechar, también, cuando la sangre toma color anormalmente oscuro después de exponerla al aire. La sangre normal toma color rojo cuando se le adiciona cianato. Las hemoglobinas M no cambian de color excepto la M. Milwaukee y M. Saskatoon. c) Es muy útil el examen espectroscópico del hemolisado. d) La electroforesis de la hemoglobina es de valor limitado. Las oxihemoglobinas no se separan por los métodos usuales de electroforesis en medio alcalino. En agar, se separan a un pH de 7,0.

Relación de estructura y función: En 4 de las 5 hemoglobinas M la histidina proximal o distal, relacionada con el grupo Heme de las cadenas Alfa o Beta, está reemplazada por tirosina. En la quinta, la hemoglobina M. Milwaukee, la valina en posición 67 de la cadena Beta está reemplazada por el ácido glutámico. La sustitución de aminoácidos en estas hemoglobinas tiene un hecho común y es la fijación del hierro del Heme en forma férrica. En la Tabla 3 se observan las propiedades de las hemoglobinas M (7).

Tabla 3 - *Propiedades de las hemoglobinas M*

HEMOGLOBINA M	SINONIMOS	ESTRUCTURA	RESIDUO HELIPTICO	AFINIDAD O2 P 50	EFFECTO DE BORH
M. Boston	Osaka Kiskinhalas Guthenburg	$\alpha_2 \beta_2$ 58 HIS-TIR	E 7	Disminuída	Disminuído
M. Iwate	Kankakee Oldenburg	$\alpha_2 \beta_2$ 87 HIS-TIR	F 8	Disminuída	Disminuído
M. Saskatoon	Chicago, Radom Emory, Kurume Hamburg, Arthur	$\alpha_2 \beta_2$ 63 HIS-TIR	E 7	Normal	Presente
M. High Park	Akita	$\alpha_2 \beta_2$ 95 HIS-TIR	F 8	Normal	Presente
M. Milwaukee		$\alpha_2 \beta_2$ 67 VAL-GLU	E 11	Disminuída	Presente

B. Hemoglobinas inestables. Anemia Hemolítica Congénita de cuerpos de Heinz (AHCCH) (8, 9). Desde la década del 50 se conocían en Hematología casos clínicos de anemia hemolítica congénita de cuerpos de Heinz. En 1962 Grimes y Meisler demostraron que parte de la hemoglobina de pacientes que sufrían de AHCCH se precipitaba con el calor (10). Los trabajos de Carrel y Lehmann en 1966 (11) demostraron la patología molecular en este tipo de anemia y que la inestabilidad de la molécula de hemoglobina era debida a la sustitución de aminoácidos. Anormalidades similares han sido confirmadas subsecuentemente en las siguientes hemoglobinas inestables descubiertas. Invariablemente el aminoácido sustituido es importante para mantener la estructura del polipéptido; a su vez el aminoácido reemplazante, por su tamaño, carga o ambos, debilita la unión con el grupo Heme o la estructura terciaria de la molécula.

Los efectos clínicos varían de, anemia hemolítica grave, diagnosticada en el primer año de vida, a anemia hemolítica discreta, exacerbada por drogas o infecciones como la Hb. Zurich o Hb. Köln.

El grado de hemólisis se correlaciona con el grado de mutación de la hemoglobina; a mayor alteración, mayor hemólisis. El diagnóstico generalmente se ha hecho en familiares y en pacientes quienes han tenido anemia hemolítica congénita por años. El diagnóstico no ha sido hecho en recién nacidos o en niños con ictericia neonatal.

Los hallazgos clínicos, como ictericia, palidez, esplenomegalia, orinas oscuras con pigmenturia y dipirroluria se correlacionan con la hemólisis; además han sido informadas cianosis de la piel y úlceras en las piernas en dos pacientes con hemoglobina Köln.

El valor de la hemoglobina puede ser normal o bajo. Es constante el hallazgo de la disminución del promedio de hemoglobina corpuscular. El extendido de sangre puede no ser significativo si el paciente no ha sido esplenectomizado. En el paciente esplenectomizado se observan signos de hemólisis y abundantes cuerpos de Heinz; cerca del 50% de las células tienen un cuerpo de inclusión que no se adhiere a la membrana. En la médula ósea se encuentra hiperplasia eritroide e inversión de la relación leuco-eritropoyética.

En el paciente con sospecha clínica de AHCCH es importante para establecer el diagnóstico: 1. La demostración de los cuerpos de Heinz. La sangre fresca se trata con colorantes supravitales como el violeta de metilo al 1%. Si el paciente tiene bazo es necesario incubar la sangre 24 o 48 horas. Una prueba positiva revela cuerpos de inclusión púrpura. 2. Prueba de estabilidad al calor. Hemolisados de sangre fresca del paciente, y de un control normal, se diluyen en solución tampón de fosfatos al 0,1 M a pH 7,3 (concentración de hemoglobina del 0,5 al 1%). Se incuba a 50°C durante una hora. Si la muestra contiene hemoglobina inestable se observa precipitación. Otra prueba más sensible, es la incuba-

ción de la muestra de sangre con una solución de isopropanol al 17% a pH 7,4, en la cual se observa la precipitación de la hemoglobina. 3. Electroforesis de la hemoglobina. Se han descrito trazos electroforéticos anormales en la mayoría de las hemoglobinas inestables. En algunos casos se requieren métodos especiales. Se ha encontrado aumento discreto de Hb. A2 y F. 4. Curva de disociación de la hemoglobina. Las hemoglobinas inestables frecuentemente tienen afinidad anormal por el oxígeno. 5. Otros estudios: La autohemólisis es positiva y parcialmente corrige con glucosa. Durante la incubación, el suero se torna marrón y opaco, lo cual se debe a la hemoglobina precipitada en forma de cuerpos cocoides. Si estas células se tiñen supravitalmente se observan los cuerpos de Heinz. La fragilidad osmótica es normal.

Complicaciones: Las hemoglobinas inestables usualmente no ocasionan la muerte. Se puede aumentar la hemólisis con infecciones virales y bacterianas. En algunas (Hb. Zurich, Hb. Torino, Hb. Köln) la hemólisis se intensifica con la administración de drogas similares a las que ocasionan crisis hemolíticas en la deficiencia de G.6.F.D. La anemia se agrava con el embarazo.

Diagnóstico diferencial: La entidad puede verse como episodio hemolítico agudo durante infecciones o con la administración de drogas o presentarse como una anemia hemolítica crónica. El estudio del paciente es preferible durante la recuperación, que en la crisis. El diagnóstico radica en demostrar los cuerpos de Heinz y la hemoglobina termolábil.

Tratamiento: Es paliativo y sólo debe hacerse en las crisis o en anemia hemolítica no compensada. La esplenectomía puede ser útil y en niños sólo después de 6 años. En algunos la esplenectomía disminuye la hemólisis, en otros, vgr.: Hb. Duarte, aparecen policitemia y complicaciones tromboembólicas.

El pronóstico es reservado en las formas agresivas de la enfermedad.

Cuerpos de Heinz: Se forman dentro de la célula por oxidación de la hemoglobina pasando a sulfahemoglobina que se precipita en forma de cuerpos de Heinz insolubles, son removidos de la circulación selectivamente por el bazo.

Tipo de anemia en las hemoglobinas inestables: En la mayoría, la mutación de aminoácidos afecta la afinidad por el oxígeno y la estabilidad de la hemoglobina, los cuales influyen la gravedad de la anemia y crean aparentes discrepancias entre las manifestaciones clínicas y los hallazgos de laboratorio. Así, pacientes con Hb. Shepard-Busch, que tiene gran afinidad por el oxígeno, muestran niveles altos de hemoglobina (12 a 13 gms.%) aunque están hemolisando severamente (Reticulocitos 20%) mientras que, pacientes con Hb. Seattle (baja afinidad por el oxígeno), tienen valores bajos de hemoglobina, de 8 a 9 gms.% y valores bajos de reticulocitos, de 2 a 8%.

Cuando se considera la esplenectomía se debe tener en cuenta el tipo de afinidad por el oxígeno que tiene la hemoglobina. En pacientes con hemoglobinas inestables de baja afinidad, aunque tengan hemólisis severa, la esplenectomía debe postponerse hasta los 6 años para no interferir en el crecimiento y desarrollo del niño.

Los pacientes con hemoglobinas de afinidad alta por el oxígeno, aunque tienen cifras altas de hemoglobina (11 a 12 gms.%), presentan síntomas de Hipoxia. La esplenectomía está indicada para disminuir la hemólisis y aumentar los niveles de hemoglobina a cifras normales o de eritremia.

Herencia: Las hemoglobinas inestables se heredan como caracteres autosómicos codominantes. Los individuos afectados son heterocigotos. Ya que el bazo remueve de la circulación selectivamente la hemoglobina precipitada en forma de cuerpos de Heinz, la hemoglobina inestable circulante es sólo del 10 al 30% del total, el resto es hemoglobina A. El homocigote no se ha descrito, probablemente debido a la rareza del gene o a que sea incompatible con la vida. Algunos ejemplos de hemoglobinas inestables han aparecido como mutaciones espontáneas, en estos casos, ambos padres son normales. Es interesante llamar la atención sobre que, de 19 mutaciones espontáneas descritas en hemoglobinas anormales, 16 corresponden a hemoglobinas inestables. Esto no es sorprendente ya que estos pacientes tienen suficientes manifestaciones clínicas para llamar la atención médica y su estudio; en

Tabla 4 - Características de algunas hemoglobinas inestables

Nombre	Estructura	Labilidad Calor	Afinidad Oxígeno	HB. Gms. %	Retic. %	Cuerpos Inclusión	% HB. Anor.	Orina Negra	Otras
Hammersmith	$\alpha_2 \beta_2$ 42 FE-SER	+	Disminuída	6-7 11-12	20-50	+	30	+	
Zürich	$\alpha_2 \beta_2$ 63 HIS-ARG	+	Aumentada	11-12	5-6	+	25	+	Sensible drogas
Seattle	$\alpha_2 \beta_2$ 76 ALA-GLU	+	Disminuída	9-10	3	+	40	+	
Santa Ana	$\alpha_2 \beta_2$ 86 LEU-PRO	+		8-13	6-28	+	10	+	Dos hemes por mol.
Gun Hill	$\alpha_2 \beta_2$ 91-97-0	+	Aumentada	13.5	4-10	0	30	0	Delección de 5 am.
Köln	$\alpha_2 \beta_2$ 98 VAL-MET	+		11-13	5-16	+	10	+	La más común
Casper	$\alpha_2 \beta_2$ 106 LEU-PRO	+	Aumentada	4-13	20-90	+			Leve
Peterborough	$\alpha_2 \beta_2$ 111 VAL-FE	+	Disminuída	12	3.5	0			Moderada
Torino	α_4 3 FE-VAL β_2	+	Disminuída	8-12	6-16	+	8		Grave
Bibba	α 136 LEU-PRO β_2	+		6-7	6-16	+	5-11		

cambio, una mutación silenciosa de la hemoglobina, por lo asintomático del portador, puede pasar desapercibida. De otra parte, las posibilidades de un paciente con AHCCCH grave tiene pocas posibilidades de tener descendencia.

Hasta el presente se ha descrito la estructura de 43 hemoglobinas inestables. Las características de algunas de ellas se observan en la Tabla 4. La mayoría son variantes de la cadena Beta. La conformación de las cadenas de polipéptidos y la estructura anatómica es más o menos rígida, estable y depende de que el grupo Heme esté en posición definida, de la constitución de la α Hélice con cargas hacia el exterior y sin cargas hacia el interior. Los aminoácidos sin carga interior crean un ambiente hidrófobo al Heme, casi una coraza, además, la unión entre las cadenas $\alpha_1 \beta_1$ es firme e impide la disociación del tetrámero en dímeros. La inestabilidad de la hemoglobina surge si la sustitución de aminoácidos interfiere con alguno de estos factores: 1. Muchos de ellos se deben a sustitución de aminoácidos en la vecindad del bolsillo del Heme, ej.: Hb. Hammersmith β_2 Fen-Ser. 2. El reemplazo de residuos de aminoácidos no polares por polares, especialmente si el nuevo aminoácido sale a la superficie, vgr.: Hb. Zurich β_2 63 es His-Arg. 3. La delección o pérdida de uno o más

aminoácidos en el espacio interhelicóntico que interfiera con la constitución helicoidal de la molécula. 4. El reemplazo de aminoácidos por prolina. La prolina sólo se puede acomodar en las primeras tres posiciones de la cadena, en otra posición rompe el segmento y no permite hacer la α Hélice, ej.: Hb. Santa Ana β_2 88 Leu-Pro. 5. El reemplazo de contactos en la subunidad. La sustitución de aminoácidos en contacto $\alpha_1 \beta_1$ puede originar hemoglobina inestable, porque la sustitución debilita las uniones de contacto y permite la disociación del tetrámero en dímeros.

El mecanismo íntimo por el cual se hemolisan los eritrocitos en la AHCCCH no está plenamente conocido. Se sabe que la sustitución de aminoácidos induce la inestabilidad de la molécula la cual se presenta como cuerpos de Heinz, éstos cuerpos contienen igual proporción de cadenas α y β y probablemente una porción del Heme. Los eritrocitos con cuerpos de Heinz tienen poca filtrabilidad, son atrapados en la microcirculación y selectivamente removidos en los sinusoides esplénicos, de ahí que no sorprenda, que pacientes con hemoglobinas inestables, esplenectomizados, tengan más cuerpos de Heinz y proporcionalmente mayor cantidad de hemoglobina inestable.

Tabla 5 - Hemoglobinas anormales con aumento de afinidad por el oxígeno. - Estructura y función

Variante	Sustitución	Afinidad O ₂	Efecto Bohr	Policitemia	Máxima HB. Gms. %
1 Chesapeake	α 92 ARG LEU	+	Normal	Si	19.9
2 J. Capetown	α 92 ARG GLIC	+	Normal	Si	16.6
3 Denmark Hill	α 95 PRO ALA	+	-	No	-
4 Rampa	α 95 PRO SER	+	-	No	-
5 Georgia	α 95 PRO LEU	+	-	No	-
6 Olimpia	β 20 VAL MET	+	Normal	Si	20.7
7 Hirose	β 37 TRI SER	+	Disminuído	No	-
8 Malmo	β 97 HIS GLI	+	Normal	Si	21.3
9 Yakima	β 99 ASP HIS	+	Normal	Si	22.9
10 Kempsey	β 99 ASP ASPA	+	Presente	Si	21.3
11 Ypsilanti	β 99 ASP TIR	+	-	Si	19.0
12 Brigham	β 100 ORP LEU	+	Normal	Si	20.0
13 Heathrow	β 103 FEN LEU	+	Normal	Si	21.0
14 San Diego	β 109 VAL MET	+	Normal	Si	18.1
15 Little Rock	β 143 GIS GLIC	+	Normal	Si	23.0
16 Andrew Minneapolis	β 144 LIS ASPA	+	Mitad	Si	19.8
17 Rainier	β 145 TIR CIS	+	Mitad	Si	21.0
18 Bethesda	β 145 TIR HIS	+	Reducida 2/3	Si	20.5
19 Hiroshima	β 146 HIS ASP	+	Mitad	Si	17.4

C. Hemoglobinas con alteración de la afinidad por el oxígeno. I. Mayor afinidad por el oxígeno: La primera de estas hemoglobinas anormales asociada con policitemia familiar fué la hemoglobina Chesapeake (12). El paciente tenía 81 años y la anomalía la presentaron 15 miembros de la familia. El hematocrito varió entre 45 y 55%. La hemoglobina anormal era cerca del 30% del total de la hemoglobina. La anomalía estaba en la cadena Alfa (α 92 Arg-Leuc β_2). La curva de disociación del oxígeno estaba desviada a la izquierda. Se transmite como un gene autosómico dominante.

Hasta el presente se han descrito 19 variantes de hemoglobinas anormales con aumento de la afinidad por el oxígeno (Tabla 5).

El aumento de afinidad por el oxígeno es variable en las diferentes hemoglobinas así como el grado de eritrocitosis, el cual es menor en las variantes Alfa.

El cuadro clínico puede ser muy discreto o caracterizarse por plétora y congestión conjuntival. Cuando se presenta la eritrocitosis aumenta proporcionalmente la hemoglobina y el hemato-

crito, así como la masa de células rojas. El recuento de leucocitos y plaquetas, es normal. El bazo no es palpable. Comúnmente se encuentra historia familiar de policitemia o plétora y el estudio sanguíneo de los familiares muestra valores altos de hemoglobina y hematocrito. La herencia es de un carácter autosómico dominante, excepto en un ejemplo, la hemoglobina Bethesda, la cual, aparentemente, es una mutación espontánea.

Se han descrito dos ejemplos de estas hemoglobinas asociados con angina pectoris (Chesapeake y Brigham). Es probable que las hemoglobinopatías con gran afinidad agravan el curso clínico de la enfermedad arterioesclerótica coronaria (13). En general, pacientes con estas hemoglobinas tienen un curso clínico benigno y promedio de vida normal. Estos pacientes tienen aumento de la viscosidad sanguínea por aumento de la masa de células rojas. La conducta clínica es individual similar a los pacientes con policitemia de origen cardiopulmonar. En la persona sintomática se deben hacer flebotomías con precaución y a modo de ensayo; se debe extraer sangre suficiente para bajar la viscosidad sanguínea y si

Tabla 6- Hemoglobinopatías con baja afinidad por el oxígeno

Hemoglobina	Estructura	Efecto Bohr	Hallazgo clínico
Agenogi	α 2 β 90 GLU-LIS	Disminuído	"Anemia" leve
Kansas	α 2 β 102 ASPA-TRE	Normal	Cianosis
Yoshizurka	α 2 β 108 ASPA-ASP	Disminuído	"Anemia" leve

Algunas hemoglobinas inestables también tienen baja afinidad por el oxígeno, vgr. HB. Seattle y Peterborough.

se observa mejoría clínica deben continuarse las flebotomías a intervalos regulares, pero no se deben bajar las cifras sanguíneas a lo normal. Bajo ninguna circunstancia se debe administrar fósforo radioactivo o drogas radiomiméticas. Precisamente, para evitar este tipo de tratamiento, el clínico debe buscar y diagnosticar los trastornos moleculares.

Diagnóstico Diferencial: Debe hacerse con las otras policitemias. Se sospecha en cualquier caso de policitemia de causa no conocida, en personas jóvenes menores de 30 años y de carácter familiar. Debe excluirse enfermedad cardiopulmonar, enfermedad neoplásica especialmente de riñon y policitemia Rubra Vera. Medir la afinidad de la sangre total por el oxígeno P50 (presión del oxígeno necesaria para la media saturación) a 37°C y a pH 7,4. Normalmente debe ser 26 mm de Hg en técnica standard. Son significantes disminuciones de más de 3 mm de Hg. Si la afinidad de la sangre es anormal se debe medir al hemolizado; si éste también es anormal, probablemente se trata de hemoglobinopatía. La electroforesis de la hemoglobina es anormal en la mitad de los casos descritos. Posteriormente debe hacerse estudio de la familia y la secuencia de aminoácidos de la globina.

Si la afinidad por el oxígeno es normal debe buscarse trastornos del difosfoglicerato y medir los niveles de eritropoyetina.

La localización y naturaleza de la sustitución de aminoácidos en estas variantes ha sido clasificada por los estudios cristalográficos de Morimoto, Lehmann y Pertuz (14) y se han enunciado 5 categorías de sustituciones de aminoácidos en los cuales puede alterarse la afinidad por el oxígeno: 1. Compromiso de los aminoácidos en el bolsillo de la globina donde se aloja el Heme. 2. Sustitución de aminoácidos que

alteran el efecto de Böhr (alteración de la curva de disociación por el oxígeno por cambio de pH).

3. Sustitución de aminoácidos que alteran los sitios de unión del difosfoglicerato. 4. Sustitución en la interfase Alfa 1 Beta 1 que perturban la conformación isomérica entre la forma Oxi y Desoxi. 5. Sustituciones que desvían la estructura cuaternaria de la molécula como un todo.

El mecanismo fisiológico por el cual estas hemoglobinas producen policitemia parece estar en relación con la tensión del oxígeno en el árbol vascular postarterial: capilares y vénulas. La desviación izquierda de la curva de disociación del oxígeno interfiere con la liberación de oxígeno a los tejidos ocasionando "hipoxia tisular", lo cual estimula la producción de eritropoyetina y ésta, al aumentar la masa de células rojas, compensa por volumen la hipoxia tisular. Los gases arteriales son normales.

II. Hemoglobinas anormales con baja afinidad por el oxígeno: Se han descrito tres variantes de la hemoglobina cuya característica principal es la baja afinidad por el oxígeno y curva de disociación del oxígeno desviada a la derecha (Tabla 6). Es de anotar que algunas hemoglobinas inestables también tienen baja afinidad por el oxígeno como la Hb. Seattle y Hb. Peterborough.

En estas variantes, la hemoglobina es menos saturada de oxígeno que la hemoglobina normal y la sangre arterial, por la poca saturación, puede dar cianosis clínica como se describe en una de estas hemoglobinas, la Hb. Kansas (15).

Debería esperarse en estas hemoglobinopatías valores bajos de hemoglobina, "anemia". Por la desviación derecha de la curva de disociación del oxígeno, lo liberan más fácilmente a los tejidos y disminuirían la producción de eritro-

poyetina. Algunas de las personas portadoras de las hemoglobinas Yoshizurka y Agenogi tienen cifras bajas de hemoglobina, pero los portadores de la hemoglobina Kansas, no.

Diagnóstico: El diagnóstico debe considerarse ante una persona con cianosis inexplicable y cuando se ha excluido trastorno cardíaco o pulmonar.

La prueba crucial es la determinación de la afinidad por el oxígeno en sangre total y en el hemolizado. Conjuntamente, debe medirse el 2, 3 difosfoglicerato el cual debe ser normal. Si está alterado, puede corresponder a otras entidades clínicas con baja afinidad por el oxígeno.

Las tres hemoglobinas descritas tienen movilidad electroforética anormal a pH 8,6 (Hb. Kansas y Agenogi son lentas y la Hb. Yoshizurka es más rápida que la Hb. A.) pero debe esperarse que una movilidad electroforética normal no las excluiría.

Diagnóstico diferencial: Es importante no confundir sangre desaturada o cianosis verdadera con sangre que contiene aumento significativo de metahemoglobinemia normal o anormal. Aumento de metahemoglobinemia normal puede resultar por la ingestión de sustancias químicas como nitratos o por deficiencias enzimáticas del eritrocito que mantienen el hierro del Heme en forma ferrosa. En el examen espectroscópico la metahemoglobina tiene un pico espectral típico a 630 nm el cual desaparece cuando se convierte en cianometahemoglobina al agregar cianuro de potasio.

La sustitución de aminoácidos induce cambios estructurales en el área de contacto $\alpha_1\beta_1$ y favorece la conformación del tetrámero en la forma de oxi .

Las hemoglobinopatías de baja afinidad dan cuadros clínicos muy benignos. Los portadores de la hemoglobina Kansas son cianóticos porque su hemoglobina no puede ser completamente oxigenada, pero gracias a la desviación de la curva de disociación del oxígeno los tejidos reciben cantidad normal de oxígeno y los portadores de ellas laboran normalmente y son asintomáticos.

Muchos de los médicos colombianos, que trabajan en centros asistenciales, han visto pa-

cientes ambulatorios muy anémicos, con cifras de hemoglobina inferiores a 4 gms.%. Estos pacientes tienen disnea de medianos esfuerzos, pero pueden caminar en el hospital y en reposo pueden tener frecuencia cardíaca normal. Estos pacientes, entre ellos los uncinariásicos, han desarrollado su anemia por sangría crónica intestinal en forma lenta y progresiva. En este proceso se han verificado una serie de eventos en los cuales el eritrocito se ha adaptado a la anemia. Uno de los fenómenos observados es la disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, por la cual pueden liberar oxígeno a los tejidos más fácilmente que las personas normales (16). La sangre de banco empleada para transfusiones, por el contrario, tiene aumento de la afinidad por el oxígeno.

Las hemoglobinas anormales con trastornos de la afinidad por el oxígeno han dado la base fisiológica a nivel molecular para estudiar y entender problemas clínicos complejos como es la conservación de la vida en seres humanos que viven en los Andes a más de 4.000 metros de altura, o pacientes con anemia grave crónica. Los problemas clínicos, como los moleculares son complejos y difícil de comprender. Seguramente es mucho lo que falta por conocer de ellos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pauling, L. et al.: Sickle cell Anemia: A molecular disease. *Science* 110: 543, 1949.
- 2.- Clegg, J. B.: In *clinics in Haematology*, ed. D. J. Weatherall. London. Saunders. 3: Numb. 2, 1974.
- 3.- Ingram, V. M.: A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle cell anemia. *Hemoglobin. Nature* 178: 792, 1956.
- 4.- Hunt, L. T. and Deyhoff. M. O.: Table of abnormal human globins. *Ann. New Y. Acad. Sci.* 241: 722, 1974.
- 5.- Restrepo, A.: Frequency and distribution of abnormal hemoglobins and thalassemia in Colombia. *South America. In Genetical, functional and physiological studies of hemoglobins.* P. 39. Ed. Arends, et al. S. Karger. Basel 1969.
- 6.- Gerald, D. S. and Efron M. L.: Chemical studies of several varieties of Hb. *M. Proc. Nat. Acad. Sci.* 47: 1758, 1961.
- 7.- Ranney, H. M.: Clinically important variants of human hemoglobin. *New. Engl. J. Med.* 282: 144, 1970.
- 8.- Carrell, R. W. and Lehmann, H.: The unstable hemoglobin hemolytic anemias. *Seminars in Hematology* 6: 11, 1969.

- 9.- White, J. M.: The unstable hemoglobin disorders in clinics in haematology, ed. D. J. Weatherall. London. Saunders. 3: Numb. 2. 1974.
- 10.- Grimes, A. J. and Meisler, A.: Possible cause of Heinz bodies in congenital Heinz body anaemia. *Nature* 194: 190, 1962.
- 11.- Carrell, R. W., Lehmann, H. and Hutchinson, H. E.: Hemoglobin Köln (98 Val-Methi) on unstable protein causing inclusion body anaemia. *Nature* 210: 915, 1966.
- 12.- Charache, S., Weatherall, D. J. and Clegg, J. B.: Polycythemia associated with a hemoglobinopathy. *J. Clin. Inv.* 45: 813, 1966.
- 13.- Nagel, R. L. and Bookchin, R. M.: Human hemoglobin mutants with abnormal oxygen binding. *Semin. Hemat.* 11: 385, 1974.
- 14.- Morimoto, H., Lehmann, H. F. and Pertuz, M. F.: Molecular pathology of human hemoglobin, stereochemical interpretation of abnormal oxygen affinities. *Nature* 232: 403-413, 1971,
- 15.- Bonaventura, J. and Riggs, A.: Hemoglobin Kansas, a human hemoglobin with a neutral aminoacid substitution and an abnormal oxygen equilibrium. *J. Biol. Chem.* 243: 980, 1968.
- 16.- Torrance, J., Jacobs, P., Restrepo, A., Sechbach, J. Lenfant, C. and Finch, C. A.: Intraerythrocytic adaptation to anaemia. *New Engl. J. Med.* 283: 165, 1970.