

**Investigación de hemoglobina fetal en recién
nacidos y residentes adultos a 3.600 mts.
de altura.**

Las hemoglobinas normales y patológicas

En: Anuario 1970: 207-20

Investigación de hemoglobina fetal en recién nacidos y residentes adultos a 3.600 mts. de altura.

Las hemoglobinas normales y patológicas

Jorge Ergueta Collao
Nancy Gutiérrez V.

Hemoglobinas normales

Pauling en 1949, inició un nuevo capítulo dedicado al estudio de las hemoglobinas, empleando técnicas electroforéticas. El fundamental aporte de sus estudios es el descubrimiento de algunas variedades normales de hemoglobina humana.

Hasta hace poco tiempo, describió 3 variedades normales de hemoglobina humana, habiéndolas denominado con el nombre de hemoglobina A, A₂ y F.: muy recientemente se incluye la hemoglobina ϵ (epsilon) o hemoglobina Gowers, presente en épocas iniciales de la vida fetal.

Hemoglobina A.— Es la hemoglobina que constituye el principal pigmento de la sangre del adulto, representado aproximadamente el 97 a 98 por ciento del total de hemoglobina. Sin embargo, se ha descubierto dentro de esta fracción, otra mínima que migra electroforéticamente a mayor velocidad, habiéndosela denominado hemoglobina A₃, aunque

esta fracción es físicamente diferente, químicamente no presenta diferencia.

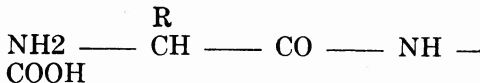
Hemoglobina A₂.— Se distingue por tener una migración electroforética más lenta. Representa el 2 al 3 % de la cantidad total de hemoglobina.

Hemoglobina F.— Es el componente normal de la sangre fetal. Representa el 80% de la hemoglobina total en el momento del nacimiento (sangre del cordón), pero esta concentración disminuye rápidamente durante los 3 primeros meses de la vida, restando solamente algunos vestigios al final del primer año de vida.

Se diferencia de la hemoglobina A, por tener una migración electroforética ligeramente más lenta y también por ofrecer una resistencia a la acción de soluciones de sales de potasio.

Estructura molecular.— La hemoglobina es una molécula muy grande pertenece al grupo de las heteroproteínas. Se halla compuesta por la unión de una proteína llamada hemoglobina y de un grupo prostético, el heme.

El heme está constituido por un núcleo tetrapirrólico, llamado protoporfirina que encierra un átomo de hierro bivalente, cuya única función es la de transportar el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos. Cualquiera que sea la variedad de hemoglobina, el heme es invariable en su estructura.



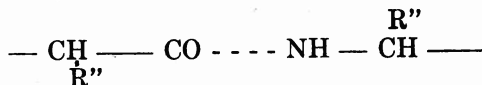
Los ácidos aminados se suceden manteniendo un orden genéticamente determinado, siendo numerados a partir del grupo AMINO (NH₂).

Las hemoglobinas normales, A, A2 F y GOWERS, tienen en común un par de cadenas llamadas alfa (α) y un par de cadenas con particularidades propias a cada variedad. La hemoglobina A, tiene 2 cadenas alfa (α) y 2 cadenas beta (β); la hemoglobina A2 tiene 2 cadenas alfa y dos cadenas delta (δ) la hemoglobina F, tiene 2 cadenas alfa y dos cadenas gamma (γ) y la hemoglobina GOWERS, dos cadenas alfa y 2 cadenas epsilon (ϵ).

La cadena alfa (α) está constituida en los mamíferos, por 141 ácidos aminados, mientras que la cadena beta (β) tiene 146, siendo muy parecida a la de la mioglobina. Las cadenas alfa y beta contienen 61 ácidos aminados comunes a ambas.

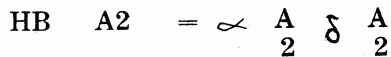
La hemoglobina A se escribe de la siguiente manera:

La globina, es en cambio el componente que determina la calidad de la hemoglobina. Corresponde a un tetramero donde cada unidad es parecida a la única cadena polipeptídica de la mioglobina. Esta globina está formada por 4 cadenas polipeptídicas idénticas dos a dos. Cada cadena está definida por el número y lugar que ocupan en ella los ácidos aminados que la constituyen. En cada extremo de una cadena se encuentra una función AMINA libre, mientras que en el otro un carboxilo libre, de acuerdo al siguiente esquema.

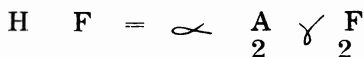


HBA = $\alpha^2 \beta^2$ El exponente superior A indica la hemoglobina a la cual pertenece la cadena y el exponente inferior "2", el número de cadenas de ese tipo.

La hemoglobina A2, está constituida igualmente por 4 cadenas polipeptídicas, siendo 2 cadenas alfa y dos cadenas delta (δ) específicas de la hemoglobina A2. La hemoglobina A2 se escribe de la siguiente manera:

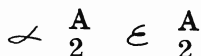


La hemoglobina F, tiene también 4 cadenas polipeptídicas siendo 2 cadenas alfa, idénticas a las de la hemoglobina A y A2 y dos cadenas gamma (γ) que le son característicamente propias. Se escribe así:



La hemoglobina GOWERS, está presente durante los 3 primeros me-

ses de la vida embrionaria, tiene 2 cadenas alfa (α) y 2 cadenas epsilon (ϵ). Se escribe así:



Configuración molecular.— La forma general de la molécula de hemoglobina es la de un esferoide que mide aproximadamente unos 60 Å de diámetro, existiendo ligazones como la ligazón hidrógeno entre un grupo aminado de un ácido aminado y el grupo carboxilo de otro ácido aminado. El resultado es una espiralización de la cadena que define la estructura secundaria. Esta estructura a su contorno crea numerosas fuerzas electrostáticas de Van der Waals que influyen en el apelotonamiento de su trama sobre si misma, para que adopte una forma definitiva de su estructura terciaria.

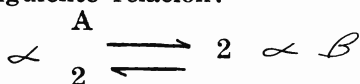
La configuración de una cadena polipéptica que resulta de un ordenamiento interno, no depende sino de la secuencia de los ácidos aminados que la constituyen, siendo esta secuencia dictada por un código genético.

Cuando se ha constituido la molécula de hemoglobina por combinación de las cuatro cadenas polipépticas, ofrece 4 espacios laterales donde se introducen las 4 moléculas del Heme, allí el hierro cambia una valencia con dos puntos de la cadena polipéptica en los sitios 58 y 87 de la cadena alfa y los sitios 63 y 62 de la cadena beta.

La estructura tridimensional presenta mucha analogía con la mioglobina. Se encuentra en cada cadena las 8 regiones helicoidales alfa derecha. Los contactos entre las 4 cadenas polipépticas son variables,, así

las 2 cadenas alfa y las 2 cadenas beta están ligadas por ligazones polares.

Muchos investigadores han observado que la hemoglobina humana se halla en condiciones de solución en un estado de equilibrio rápido de asociación y disociación de acuerdo a la siguiente relación:



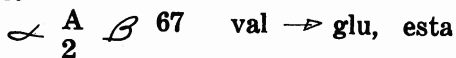
Este hecho representaría un factor importante para las características funcionales de la hemoglobina. La separación y recombinación de las sub-unidades en 2 hemoglobinas diferentes, permite obtener los híbridos.

La bioquímica comparada aportó numerosos argumentos en favor de la mioglobina que será la que provee las sub-unidades de hemoglobina por evolución filogenética.

Hemoglobinas anormales.— Se ha descrito hasta la fecha más de 50 variedades de hemoglobina. Para considerar una hemoglobina como compuesto anormal, no solamente se toma en cuenta su estructura, sino también la anormalidad de la repartición proporcional que integra cada cadena normal (solamente tomando en cuenta a las 3 hemoglobinas normales humanas).

Nomenclatura de las anomalías de estructura.— La antigua nomenclatura que utilizaban las letras del alfabeto, es considerada hoy como insuficiente, porque el número de hemoglobinas anormales sobrepasa al número de letras existentes en el alfabeto. También existe otro aspecto; la existencia de 2 hemoglobinas estructuralmente diferentes pero con la

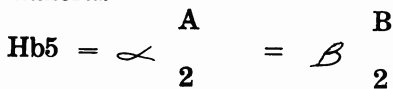
misma velocidad de migración electroforética. La nueva nomenclatura se basa en recomendar que toda hemoglobina recién descubierta, sea designada por la letra correspondiente a la velocidad de su migración electroforética, a la que se añade el nombre de la ciudad, del hospital o del laboratorio donde la hemoglobina ha sido descubierta: el siguiente ejemplo nos aclara la norma expresada: hemoglobina M MILWAUKEE. Cuando se conoce la modificación de la cadena que se alteró, se registra el sitio del ácido aminado cambiado por el del ácido cambiante, de esa manera la hemoglobina M MILWAUKEE del ejemplo anterior, se escribirá así:



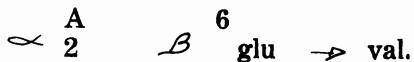
fórmula significa que la valina de la posición 67 de la cadena beta, ha sido cambiada por el ácido glutámico.

La mayor parte de las hemoglobinas con anomalías de estructura, las presentan en la cadena beta.

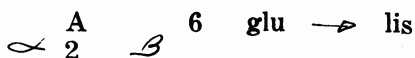
La hemoglobina δ de la anemia direpanocítica, presenta la sustitución en la cadena beta, de un ácido glutámico de posición 6 por una valina; se expresa de la siguiente manera:



o también así:



La hemoglobina C corresponde a la siguiente fórmula:



En el grupo de las cadenas alfa, las anomalías son menos frecuentes,

entre ellas tenemos la hemoglobina J. Paris 2, el cambio se efectuó en la cadena alfa cuya glutamina de la posición 54 se cambia por el ácido glutámico.

En la hemoglobina J. Paris, la alanina que ocupó la posición 12 de la cadena alfa, se cambió con el ácido aspártico.

Las anomalías de ordenamiento. Este tipo de anomalía es bastante raro, citamos como ejemplo las Hb H, constituida por 4 cadenas beta de estructura normal. Su fórmula es la siguiente:



La hemoglobina BARTS está constituida por 4 cadenas gamma y se la expresa así: $\gamma 4$

Las anomalías de proporción o repartición.—En las hemoglobinas normales del hombre adulto, existe una proporción exacta de cadenas de uno u otro tipo. La ruptura de esta proporción en la constitución de la hemoglobina, determina la alteración patológica; de esa manera en las talasemias se observa una persistencia de la hemoglobina F. En los casos graves de talasemia, la proporción elevada de hemoglobina A2 sumada a la presencia de hemoglobina F., determina la gravedad del cuadro.

Relación entre estructura y función

Actualmente se admite lo siguiente:

a) Las soluciones de oxihemoglobina y de hemoglobina desoxigenada son diferentes entre sí.

b) Los cristales de ambas variedades no son isomorfos.

c) Las modificaciones estructurales han sido sugeridas por las experiencias de GIBSON en 1969, este autor observó el hecho siguiente: Inmediatamente después de la disociación de la carboxihemoglobina por acción de un rayo de luz ultravioleta con duración superior a una milésima de segundo, se produce una recombinación posterior 16 veces más rápida que en condiciones normales. La aplicación del mismo rayo luminoso pero con duración de una centésima de segundo produce un tiempo de recombinación normal. Esta experiencia hace ver que la forma altamente reactiva de la carboxihemoglobina disociada por la luz ultravioleta, puede ser interpretada como un estado de mantenimiento de la configuración molecular de la carboxihemoglobina durante un tiempo muy corto, necesario para el restablecimiento de la configuración característica de la hemoglobina no combinada. De esa manera se puede suponer que exista una relación entre los caracteres funcionales particulares de hemoglobina y de su estructura molecular producidos por la fijación de una ligadura.

La escuela de Cambridge, recientemente realizó estudios analíticos de los diagramas de difracción con los rayos X aplicados a los cristales de hemoglobina, demostrando que las sub-unidades de pigmento giran unas en relación a otras. Después de la oxigenación la distancia entre las dos cadenas beta disminuye de 6,5 Å y las de dos cadenas alfa aumentan 1 Å.

La hemoglobina oxigenada y la desoxigenada, corresponden a dos estados estructurales diferentes que Perrutz designa por los términos "O" y "R" respectivamente. "Estos cambios de forma dan la impresión de una molécula que respira de una

manera paradójica, pues ella se dilata cuando pierde su oxígeno y viceversa".

Los cambios de la estructura molecular se realizan a una velocidad muy grande, porque la velocidad de fijación del O₂ se realiza en una milésima de segundo. Las cadenas alfa apenas se desplazan actúan como ejes al torno de los canales se abre la molécula en el curso de la desoxigenación. Cuando las cadenas alfa están ausentes o muy modificadas, los movimientos de las cadenas beta pueden ser casi nulos, este hecho explicaría el comportamiento observado en la hemoglobina H (β $\frac{A}{4}$)

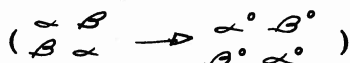
Las enzimas allostéricas y de una manera general las mismas proteínas allostéricas compuestas por sub-unidades se supone que tienen dos sitios receptores esteroespecificamente diferentes. El uno fijaría el sustrato, siendo responsable de la actividad biológica específica de la proteína y el otro sitio allostérico sería complementario de la estructura de un efector allostérico que fija específicamente en forma reversible. Esta ligazón con el efector allostérico determina un cambio reversible de la estructura molecular de la proteína. Monod, Wyman y Chaceux, encontraron estos caracteres allostéricos en la molécula de hemoglobina con la particularidad de que tanto el efector como el sustrato, resultarían diferenciados solamente ligando oxígeno. Se considera al oxígeno como un sustrato, pero por su fijación a una sub-unidad se podría considerarlo como un efector allostérico que actuando sobre otra sub-unidad, provoca la modificación estructural.

La importancia de la disociación de la hemoglobina en dos partes si-

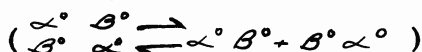
métricas: 2 ($\alpha\beta$) en el curso de su oxigenación fue confirmada por Wyman en 1967, mediante análisis matemáticos.

Los trabajos de Benesch y colaboradores (1965) proponen la siguiente secuencia de reacciones:

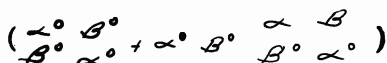
1ª etapa: una parte de Hb se transforma en oxihemoglobina



Esta reacción conduce por las modificaciones de estructura molecular al estado "O" de Perutz. Esta oxihemoglobina se disocia en 2 partes:



Una hibridación se produce entre la hemoglobina no oxigenada.



Las modificaciones estructurales de la mitad oxigenada ($\beta^o\alpha^o$) impone por una contracción espacial mo-

Técnica

Test de Desnaturali-

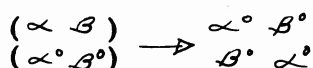
Hemoglobina Fetal en sangre de cordón umbilical.— Hemos investigado la concentración de la hemoglobina fetal en 293 muestras obtenidas de cordón umbilical.

Raza blanca

0 a	19%	de Hb fetal	47	muestra	=	43,2%
20 a	39%	" "	31	"	=	28,4%
40 a	59%	" "	20	"	=	18,37%
60 a	79%	" "	9	"	=	8,37%
80 a	99%	" "	2	"	=	1,8%

Total 100%

dificaciones estructurales a la mitad no oxigenada (señaladas por asteriscos) que adquieren por ese hecho una afinidad creciente por el oxígeno:



Este aumento progresivo de la afinidad por una modificación estructural allostérica de las sub-unidades globulínicas; parece expresar de una manera satisfactoria la forma sigmoidea de la curva de disociación

Investigación de Hemoglobina Fetal Realizada en muestras de sangre Obtenida a 3.600 m. de altura. (*)

Material.—

a) sangre umbilical obtenida en el Servicio de Obstetricia del Hospital de Clínicas de La Paz.

b) Sangre venosa obtenida en menos de 21 días hasta 2 años de edad.

zación Alcalina

Se ha considerado una clasificación empírica de las razas (blanca, mestiza e indígena).

(*) Este trabajo ha recibido la colaboración del Dr. José Valle Antelo Dr. Miguel Delgado y personal médico del Instituto de Maternidad Prof. Natalio Aramayo del Hospital de Clínicas.

Raza Mestiza

0 a	19%	de	Hb fetal	56	muestra	=	36,6%
20 a	39%	"	" "	50	"	=	32,7%
40 a	59%	"	" "	28	"	=	18,3%
60 a	79%	"	" "	16	"	=	10,5%
80 a	99%	"	" "	3	"	=	1,9%

Raza indígena

0 a	19%	de	Hb fetal	15	muestras	=	48,4%
20 a	39%	"	" "	6	"	=	19,4%
40 a	59%	"	" "	6	"	=	19,4%
60 a	79%	"	" "	3	"	=	9,6%
80 a	99%	"	" "	1	"	=	3,2%

CUADRO N° 1

Hemoglobina fetal en sangre venosa

Hemos investigado los porcentajes de hemoglobina fetal en sangre venosa en un total de 54 niños cuyas edades fluctuaban desde 21 días hasta 2 años. Hemos clasificado empíricamente en razas blanca, mestiza e indígena.

Raza Blanca

De 0 a	1,9%	de	Hb fetal	8	muestras	=	42%
De 2 a	3,9%	"	" "	10	"	=	53%
De 4 a	5,9%	"	" "	—	"	=	—
De 6 a	7,9%	"	" "	1	"	=	5%

Raza Mestiza

De 0 a	1,9%	de	Hb fetal	13	muestras	=	52%
De 2 a	3,9%	"	" "	5	"	=	20%
De 4 a	5,9%	"	" "	5	"	=	20%
De 6 a	7,9%	"	" "	2	"	=	8%

Raza Indígena

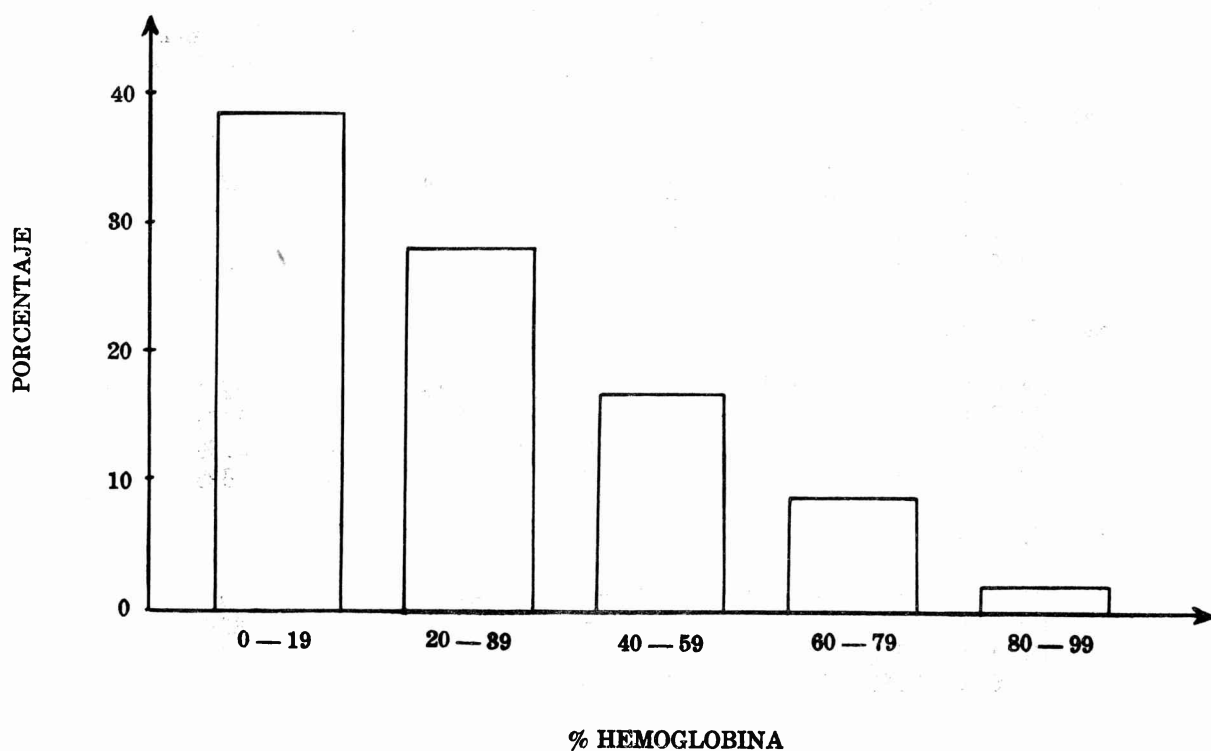
De 0 a	1,9%	de	Hb fetal	1	muestras	=	10%
De 2 a	3,9%	"	" "	6	"	=	60%
De 4 a	5,9%	"	" "	3	"	=	30%
De 6 a	7,9%	"	" "	—	"	=	—

CUADRO N° 2

Hemoglobina Fetal en Sangre Umbilical

% Hb F.	Raza Blanca		Raza Mestiza		Raza Indígena		Totales	
	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
0 — 19	47	43.2	56	36.6	15	48.4	118	40.3
20 — 39	31	28.4	50	32.7	6	19.4	87	29.7
40 — 59	20	18.3	28	18.3	6	19.4	54	18.4
60 — 79	9	8.3	16	10.5	3	9.6	28	9.6
80 — 99	2	1.8	3	1.9	1	3.2	6	2.0
Totales	109	100.0	153	100.0	31	100.0	293	100.0

GRAFICO 1

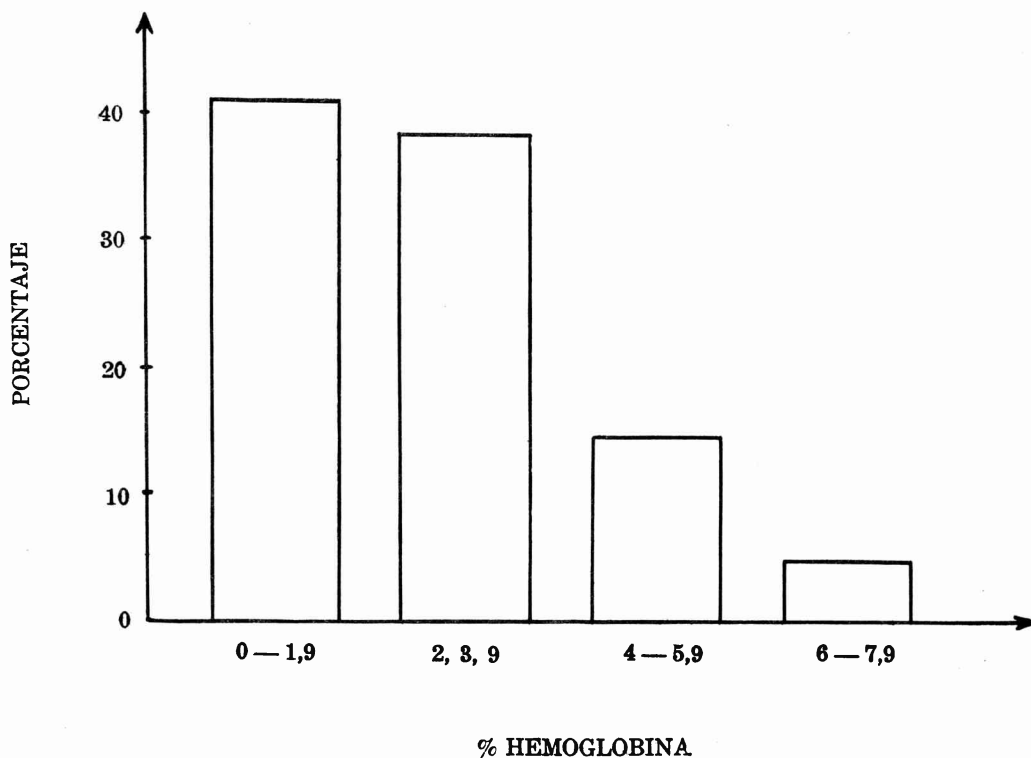


Hemoglobina Fetal en Sangre de Niños de 21 días

Hasta 2 Años de Edad

% Hb F.	Raza Blanca		Raza Mestiza		Raza Indígena		Totales	
	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
0 — 1,9	8	42.	13	52.	1	10.	22	41.
2 — 3,9	10	53.	5	20.	6	60.	21	39.
4 — 5,9	—	—.	5	20.	3	30.	8	15.
6 — 7,9	1	5.	2	8.	—	—	3	5.
Totales	19	100.0	25	100.0	10	100.0	54	100.0

GRAFICO Nº 2



CONCLUSIONES

- 1º En las muestras de raza blanca obtenidas de cordón, se observa un mayor número de casos en las concentraciones de 0 a 19% de hemoglobina fetal.
- 2º En las muestras de cordón pertenecientes a la raza mestiza, el número mayor de muestras corresponde igualmente a concentraciones de 0 a 19% de hemoglobina fetal.
- 3º En las muestras de cordón de raza indígena, el mayor número de muestras corresponde también a concentraciones de 0 a 19% de hemoglobina fetal.
- 4º En las muestras de sangre venosa obtenida de niños de raza blanca, de 21 días a 2 años de edad, el mayor número correspondió a concentraciones de 2 a 3,9% de hemoglobina fetal.
- 5º En las muestras de sangre venosa obtenida de niños de raza mestiza, comprendidos en las mismas edades que el anterior grupo, el mayor número correspondió a concentraciones de 0 a 1,9% de hemoglobina fetal.
- 6º En las muestras de sangre venosa obtenidas de niños de raza indígena, el mayor número correspondió a muestras comprendidas entre 2 y 3,9% de hemoglobina fetal.

BIBLIOGRAFIA

- BENESCH, R. E., BENESCH, R. Y MACDUEF G. Subunit Echange an Ligand binding Proc. Nat. Acad. Science New York, 1965, 54 535.
- BRAUN, V. HILSE, K. BEST J. S. FLAMM, U. et BRAUNITZER, G. Constancy and variability in the primary structure of Hemoglobine. Bull. Soc. Chim Biol. 1967, 49.949.
- GADJOS, A. LE REPORT ENTRE STRUCTURE ET FONCTION DE L'HEMOGLOBINE LA PRESSE MEDICALE, 1968, 38, 1817.
- HILL R. L. and KONISBERG, W. The structure of Human Hemoglobin IV The chymotryptic Digestion of the Chain of Human Hemoglobin J. Biol Chem, 1962, 237,3151.
- INGRAM, VM. Control Mechanisms in hemoblobin synthesis. Medicine Baltimore 1964, 43, 759.
- ITANO H. A. The human hemoglobins: their properties and genetic controls. Advanc. Protein Chem., 1957, 12, 216.
- Monod J. WYMAN J. CHANCEAUX J. P. on the nature of allosteric transition; a plausible model J. mol. Biol. 1965, 12, 88.
- PERUTZ, M. F. QUELQUES ACTIONS MOLECULAIRES DE LA REGULATION EN BIOLOGIE ENDEAVOUR 1967, 26, 3.
- SCHROEDER, W. A. The aminoacid Sequence of the chain of human fetal hemoglobin BIOCHEMISTRY, 1963, 2, 992.
- WYMAN, J. Allosteric linkage. J. Amer. Chem. Soc. 1967, 89, 2202.