

23  
2 eje



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

"FRECUENCIA Y COMPORTAMIENTO  
ELECTROFORETICO DE HEMOGLOBINA NORMAL  
EN PACIENTES CON ANEMIA"

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
**MARIA DEL PILAR HERNANDEZ PICHARDO**

ASESORES: OFB. RAMON CENDEJAS RAMIREZ  
OFB. MARIA ESTHER REVUELTA MIRANDA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

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

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

FRECUENCIA Y COMPORTAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE HEMOGLOBINA  
NORMAL EN PACIENTES CON ANEMIA

que presenta LA pasante: MARIA DEL PILAR HERNANDEZ PICHARDO  
con número de cuenta: 7664239-7 para obtener el TITULO de:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 06 de JULIO de 1994

PRESIDENTE Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez  
VOCAL Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa  
SECRETARIO Q.F.B. María Esther Revuelta Miranda  
PRIMER SUPLENTE Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega  
SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz

*[Firmas manuscritas]*

*Hoy te doy gracias, señor  
por la luz y por el día,  
por mis ratos de dolor  
y por toda mi alegría*

*Por los padres que me diste,  
por mis hermanos, por mi esposo  
y también por mi pequeña,  
por lo que de mí ser hiciste.*

*Por mis sueños logrados  
por los que muchos me aman  
por los que nada me quieren,  
por los que feliz me aclaman,*

*por los que a veces me hieren.  
por la dicha, por la paz,  
por la unidad y el amor,  
por todo cuanto me das.*

*Hoy te doy gracias SEÑOR.*

**DEDICATORIAS**

A mis padres queridos PACHITA y LALO,  
que me han dado, refugio en su corazón,  
tiempo y comprensión, todo su amor lo  
llevo en mi ser al escribir cada línea  
y palabra, para dedicarle todo mi  
trabajo y esfuerzo.

Y les agradezco haberme dado la mejor  
herencia que es: una EDUCACION.

A mis hermanos:

EULALIO

ALBERTO

GERMAN

MARIA DEL CARMEN

Por brindarme su apoyo, confianza y animarme  
a terminar mi carrera.

A mi esposo:

El Químico CARLOS, gracias te doy por el amor  
y cariño que siempre me has profesado, por creer  
en mí y siempre estar a mi lado por darme la  
oportunidad de realizar un sueño que hoy y  
siempre compartire contigo.

*Dedico esta tesis a mi pequeña MONTSEERRAT FRANCIS.*

*Parece increíble que aún ahora en este mundo lleno de odio todavía exista algo que pueda maravillarnos y es precisamente el milagro de la vida, de una vida nueva y llena de sorpresas como lo ha sido la tuya. Aún a tu corta edad, cada día tienes algo nuevo que enseñarnos y que a cada paso que das, a cada sonrisa llena de amor, a cada rabieta tuya, el mundo parece iluminado por un coro gigantesco de ángeles.*

*Eso eres para mí, un ángel que Dios ha dado, a mi vida, para llenarla de amor y de dicha, para alumbrar mis días y mi vejes con una luz que viene de tu ser como un caudal de intensos rayos de sol.*

*Sólo pido que pueda con sabiduría y amor guiar tus pasos para verte convertida en una mujer de bien, para que sirvas a tus semejantes con esa ilusión de hacer esta vida y este mundo un lugar mejor, donde puedas vivir en armonía y felicidad.*

*Tu madre que te ama con toda la intensidad de su ser.*

*A mi sobrinita VIRIDIANA HERNANDEZ*

*Le pido a Dios te de sabiduría para valorar mucho a tu padre Lalo, sabiduría para aprender a valorar el triunfo; sabiduría para aprender de la derrota. Que te de valor para defender, aún a costa de tu propia vida, tus ideas y pensamientos: Que te de valor para ganarle a las adversidades. Que no caigas y si caes te sepas levantar. Que no comas, que te alimentes, y ante todo, que llegues a la meta que deseas.*

*Tu Tía*

## AGRADECIMIENTOS

A la QFB María Esther Revuelta Miranda con admiración y respeto al reconocerle como un ejemplo de calidad humana le agradezco profundamente su valiosa ayuda y orientación para la elaboración de esta tesis.

Al QFB Ramón Cedejas Ramírez por su guía, apoyo, confianza y ayuda incondicional ofrecida con su indudable capacidad de maestro para la realización de esta tesis.

A la QFB Idalia Avila Miyasawa, al QFB Antonio Sánchez Ortega, a la QFB Martha Patricia Zuñiga por sus observaciones e interés durante la revisión de esta tesis, se los agradezco.

Mi agradecimiento a mi tío el Biól. Isidro Méndez Larios, le doy las gracias por haberme facilitado su tiempo y ayuda en pasar los datos en la computadora.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Centro Médico La Raza y Clínica No 29 por su invaluable ayuda.

Les agradezco a cada una de todas las personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de esta tesis, por la generosa ayuda a ellos y amigos que me alentaron para llevar a cabo esta tesis.

## INDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION .....	2
II. GENERALIDADES	
II.1. Sangre .....	4
II.2. Funciones de la Sangre .....	5
II.3. Masa Globular	
II.3.a Eritrocitos, Hematíes o Globulos Rojos ....	6
III. HEMOGLOBINA	
III.1. Definición .....	7
III.2. Estructura Química de la Hemoglobina .....	8
III.3. Tipos de Hemoglobinas	
III.3.a Hemoglobinas Normales .....	12
III.3.b Hemoglobinas Anormales .....	17
III.4. Hemoglobinas Anormales	
III.4.a En México .....	22
III.4.b Mundialmente .....	43
III.5. Metodos de Identificación .....	50
IV. OBJETIVO GENERAL.....	55
IV.a. OBJETIVOS PARTICULARES.....	56
V. METODOLOGIA	
V.1. Material Biológico .....	57
V.2. Procedimiento .....	57
VI. RESULTADOS .....	62
VII. DISCUSION .....	77
VIII. CONCLUSIONES .....	82
IX. BIBLIOGRAFIA .....	83

INDICE DE FIGURAS, TABLAS, FOTOGRAFIA Y GRAFICAS

FIGURA 1. Porcentaje que constituye el grupo Hem.....	9
FIGURA 2. Molécula de "Heme" oxigenada y representación de su fuerte unión con la histidina.....	11
FIGURA 3. Mapa de la distribución de las Hb's anormales en México.....	33
FIGURA 4. Comparación electroforética (pH 8.8) de la Hb México y la Hb A.....	41
FIGURA 5. Comparación electroforética a pH 8.2 de la Hb Chiapas y otras .....	44
FIGURA 6. Frecuencia relativa aproximada de las variantes de la Hemoglobina.....	49
FIGURA 7. Corrimiento electroforético teórico de Hb's en agar-noble a un pH 8.6.....	63
TABLA 1. Clasificación de las Talasemias .....	19
TABLA 2. Clasificación de las Hb's anormales.....	23
TABLA 3. Variantes de la Hb en poblaciones indias de México.....	31
TABLA 4. Frecuencia de heterocigotos de la Hb S y otras anormalidades hemoglobínicas "Estudios en la costa este".....	34
TABLA 5. Frecuencia de Hb's en México "Estudios en la costa oeste".....	35
TABLA 6. Estudios de las hemoglobinopatías realizadas en los estados de Puebla y Guadalajara .....	36
TABLA 7. Hb's anormales encontradas en siete centros de de salud en el estado de Jalisco.....	37

TABLA 8. Lista de Hb's y Talasemias encontradas en México.....	39
TABLA 9. Desplazamientos teóricos electroforéticos de diferentes Hb's.....	54
FOTOGRAFIA. Corrimiento electroforético de las muestras estudiadas en agar-noble a pH=8.6.....	64
GRAFICA a. Histograma (promedio de Ht de las muestras estudiadas en hombres).....	65
GRAFICA b. Histograma (promedio de Ht de las muestras estudiadas en mujeres).....	66
GRAFICA c. Histograma (promedio de Hb de muestras estudiadas en hombres).....	67
GRAFICA d. Histograma (promedio de Hb de muestras estudiadas en mujeres).....	68
GRAFICA e. Histograma (promedio de CCMH en las muestras estudiadas en hombres).....	69
GRAFICA f. Histograma (promedio de CCMH en las muestras estudiadas en mujeres).....	70
GRAFICA g. Histograma (promedio de serie blanca en las muestras estudiadas en hombres).....	71
GRAFICA h. Histograma (promedio de serie blanca en las muestras estudiadas en mujeres).....	72
GRAFICA DE CONTROL. Intervalo de confianza de la muestra de pacientes, 59 hombres (Hb).....	73
GRAFICA DE CONTROL. Intervalo de confianza de la muestra de pacientes, 122 mujeres (Hb).....	74

GRAFICA DE CONTROL. Intervalo de confianza de la muestra  
de pacientes, 59 hombres (Ht)..... 75

GRAFICA DE CONTROL. Intervalo de confianza de la muestra  
de pacientes, 122 mujeres (Ht)..... 76

## RESUMEN

Con objeto de determinar el comportamiento de Hemoglobinas normales se utilizaron 181 muestras obtenidas de pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de las cuales corresponden 122 a mujeres y 59 a hombres. De estas, 17 presentaron diagnóstico de anemia, de las cuales 4 fueron hombres y 13 mujeres.

En las pruebas realizadas en el laboratorio para determinar la anemia en las muestras, se tomaron en cuenta los parámetros de: Hemoglobina (Hb) 13.9 g/100 ml en hombres y 12.65 g/100 ml en mujeres. Hematocrito (Ht) 45.8 ml/100 en hombres y 40.05 ml/100 en mujeres. También se evaluó, la Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH) 31.75% en hombres y 32% en mujeres. Y por último la Serie Blanca 7176 mm<sup>3</sup> en hombres y 7322 mm<sup>3</sup> en mujeres. Estos parámetros sirvieron de base para las muestras de pacientes que en un momento dado se sometieron a la electroforesis de zona. De las muestras se utilizó el suero, que se aplicó en diferentes soportes (papel, acetato de celulosa, agar-agar y agar-noble). Se obtuvo como resultado preliminar, en el caso del presente estudio, que es el agar-noble el mejor soporte, ya que después del desarrollo electroforético da un mejor resultado y un desplazamiento hacia el cátodo.

De acuerdo con la información obtenida en el presente estudio se puede establecer que las Hb's más frecuentes son la Hb A<sub>2</sub> y Hb S. Se encontró también, que de las 181 muestras el 9.3% resultaron con diagnóstico de anemia, de las cuales el 7.1% correspondió a las pacientes mujeres y el 2.2% es para las obtenidas de hombres.

## I. INTRODUCCION

Este trabajo surge, a raíz de el interés que tenemos, en cuanto a detectar en la población que habita el area metropolitana de la Ciudad de México, alguna ó algunas Hemoglobinas Anormales. Se sabe que la Hemoglobina es una proteína presente en eritrocitos de la sangre. Que tiene estructura cuaternaria, por lo que la conforman 4 unidades protómericas globulares, llamadas Globinas. La función de está proteína radica fundamentalmente en el transporte gaseoso en sangre ( $O_2$  y  $CO_2$ ). Para distribuirlos al organismo ( $O_2$ ) ó excretarlos del mismo ( $CO_2$ ). Por esta función es una proteína de suma importancia.

Históricamente se han encontrado Hemoglobinas diferentes en la especie humana, ubicandose la diferencia en los tipos de globinas que las estructuran. Estas unidades globulares varían en la secuencia de uno o varios aminoácidos, originando cambios en las propiedades fisicoquímicas de la molécula, repercutiendo en las Biológicas (Ej. forma del eritrocito, viabilidad, capacidad de hemólisis, afinidad por  $O_2$ , etc.)

Las globinas al variar al menos en un aminoácido, nos permiten relacionar que para que un aminoácido difiera en una proteína es porque tiene una alteración molécula ó genética el gen (DNA) que codifica para ella. Recordando que de el DNA se copia el RNA y que esta molécula porta los codones (tripletes de ribonucleótidos) que son clave para definir la secuencia de aminoácidos de las proteínas.

Esto nos lleva a considerar que las variantes moleculares de

hemoglobina tienen relación con los genes específicos que tiene cada individuo según su raza. Es decir, por ejemplo:

- a) La raza negra posee HbS.
- b) En los grupos étnicos Mexicanos se han detectado la Hb México y Hb Chiapas.

En la población de la ciudad de México, habitan Mestizos (híbridos provenientes de apareamientos entre raza nativa y anglosajona), individuos de grupos étnicos del país que migraron a la ciudad y extranjeros

Considerando la diversidad genética en la población de la zona metropolitana y contemplando las variedades de hemoglobinas reportadas, características de raza y asociadas con patologías como la anemia, surge este trabajo para asociar: tipo de hemoglobina, pruebas hematológicas, estado de salud de hombres y mujeres del Distrito Federal. Así como la relación de los cuadros de anemia con posibles variantes electroforéticas de Hemoglobina.

## GENERALIDADES

### II.1. SANGRE

La sangre es un líquido circulante de composición compleja, su viscosidad es de 4 1/2 a 5 1/2 veces más que el agua, su densidad varía entre 1.041 y 1.067, tiene un olor peculiar, sabor salado, temperatura alrededor de 38°C y pH de 7.38 a 7.4 (32, 34).

La sangre esta constituida por un paquete líquido (Plasma). El plasma es un líquido complejo de color ambarino claro, esta compuesto de varios elementos, ya que actúa como fuente de nutrimentos y al mismo tiempo como medio para eliminar productos de desecho derivados de su metabolismo.

El plasma contiene 90% de agua, proteínas plasmáticas; generalmente se distinguen tres proteínas: Fibrinogeno, Seroglobulina y Seroalbúmina. Pero existen otros más, la protrombina y la seroalbúmina se forman en el hígado.

Las proteínas mantienen la presión osmótica de los coloides del plasma, dan a la sangre su caracter viscoso y ayudan a la regulación del equilibrio ácido-base.

También lo constituyen sustancias nutritivas como: aminoácidos, glucosa y grasas neutras, como sales que provienen de los alimentos y de las reacciones químicas que se efectúan en el organismo, el cloruro de sodio es el que se encuentra en mayor concentración, sustancias orgánicas como: urea, ácido úrico, la creatinina, las bases púricas y muchas otras sustancias provenientes de las células son excretadas por eliminación.

Se encuentra en el plasma gases disueltos: oxígeno, nitrógeno y bióxido de carbono, así como otros solutos.

## II.2. FUNCIONES DE LA SANGRE

La sangre es el medio de transporte del organismo, lleva oxígeno de los pulmones a los tejidos, sustancias nutritivas absorbidas por el intestino, transporta hormonas y secreciones internas, llevando productos de desecho del metabolismo a los órganos excretores, ayuda a mantener normal la temperatura corporal, y el equilibrio ácido-base de los tejidos, constituye un mecanismo de defensa contra la invasión de microorganismos nocivos. (32,34)

## II.3. MASA GLOBULAR

La forman tres clases de sistemas: el de plaquetas o trombocitario, el leucocitario o de los glóbulos blancos y el eritrocitario o de los hematíes.

Los más numerosos son los llamados "Hematíes" que no integran la masa principal del paquete globular de la sangre o valor hematocrito (45%), siendo células anucleadas.

Los leucocitos son células "verdaderas" encontradas en la sangre, ya que poseen todas las estructuras propias de la célula viva (membrana, protoplasma y núcleo), de la sangre. Las plaquetas o trombocitos que son los elementos más pequeños considerados fragmentos citoplasmáticos.

### 11.3.a. ERITROCITOS, HEMATIES O GLOBULOS ROJOS

Tienen forma de disco biconcavos anucleados, con un diámetro de  $7.5 \times 10^{-3}$  mm. Tienen una superficie media de  $1.28 \times 10^{-4}$  mm<sup>2</sup> la diferencia en su espesor explica que al teñirse con May-Grünward, Giemsa, los hematies adquieren un color rosado más intenso en los bordes que en la parte central.

Los eritrocitos están formados por un armazón elástico, delgada e incolora llamada estroma, en la cual se deposita la Hemoglobina.

El número normal de hematies se considera comprendido entre  $4.5-5 \times 10^{12}/l$  en el varón y de  $4-4.5 \times 10^{12}/l$  en la mujer.

#### 1) Función de los Eritrocitos

- Transportan oxígeno a los tejidos y bióxido de carbono proveniente de los tejidos.
- Ayuda a mantener el equilibrio ácido-básico normal (pH), la viscosidad, densidad, etc.
- En los capilares de los pulmones la hemoglobina se carga totalmente con oxígeno formando oxihemoglobina en el glóbulo rojo.
- Los eritrocitos transportan la oxihemoglobina a los capilares de los tejidos donde se libera el oxígeno, la oxihemoglobina se convierte en hemoglobina reducida. (32,34)

Este grupo celular contiene abundante hemoglobina, siendo la proteína que nos interesa en particular.

Estas células anucleadas, son ricas en una proteína, denominada Hemoglobina.

### III. HEMOGLOBINA (Hb)

#### III.1. DEFINICION

La hemoglobina es una proteína conjugada formada por cuatro grupos proteicos ó globin, a cada una de las cuales se une un grupo prostético Heme (Hem ó Hemo).

Esta proteína se encuentra en su mayor parte en los hematies y es la responsable del color rojo de la sangre.

Posee un peso molecular de aproximadamente 64000-58000 Daltons.

La hemoglobina es la primera proteína que se ha obtenido en estado cristalino, variando su forma de cristalización en las variedades adulta y fetal. (18,52)

Las diferentes cadenas globinicas de la hemoglobina se denominan según el alfabeto griego ( $\alpha, \beta, \delta, \epsilon, \zeta$ ). cada hemoglobina posee 4 cadenas polipeptidicas iguales dos a dos. En el hombre las hemoglobinas que se encuentran normalmente son la HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) que comprende (95-97%) del total; la HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) que normalmente es inferior al 3% y una fracción menor HbF ( $\alpha_2\zeta_2$ ), es muy abundante durante la vida fetal, desaparece casi completamente en el transcurso de los primeros 6 meses-02 vida post parto.

Desde el punto de vista estructural la hemoglobina adopta una configuración helicoidal se distinguen la estructura primaria o

secuencia con que se hallan los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. La cadena  $\alpha$  esta formada por 141 aminoácidos y la  $\beta$  por 146 aminoácidos.

La estructura secundaria es la disposición helicoidal de las cadenas.

La estructura terciaria se refiere al aspecto tridimensional de la cadena polipéptica junto con el repliegue o bolsa, donde se dispone el Hem.

La estructura cuaternaria es el conjunto de cadenas unidas entre sí.

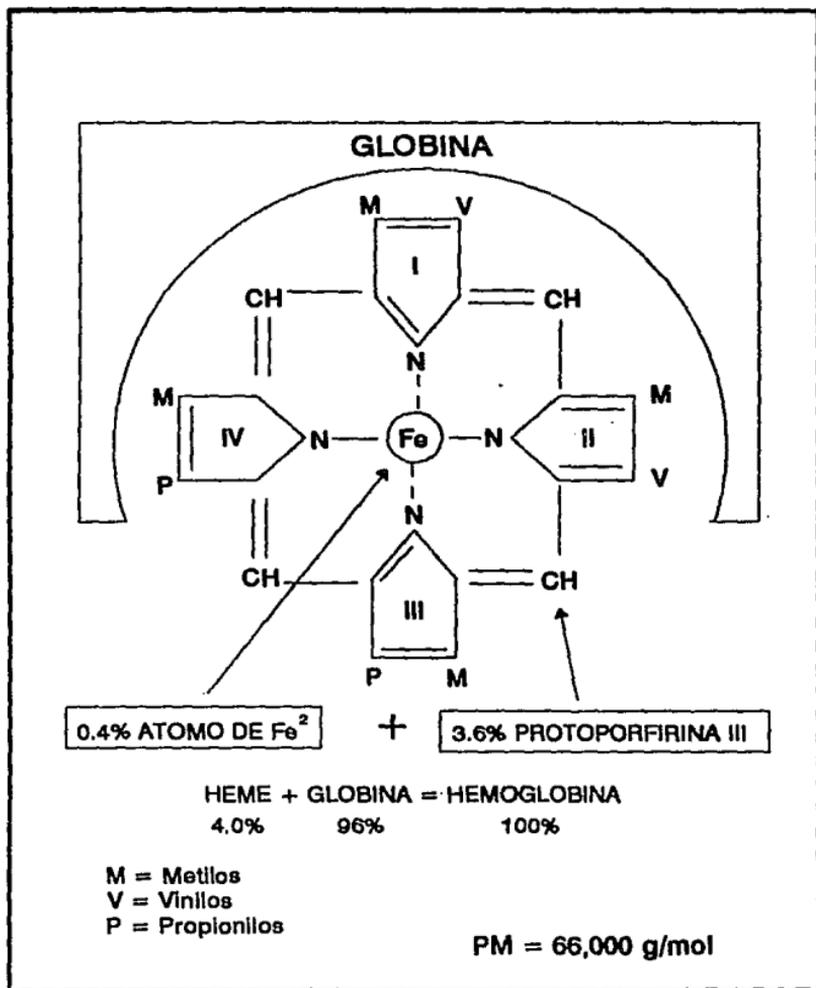
Las diferentes hemoglobinas encontradas se sabe que en cada cadena de globina los aminoácidos se suceden en tramos helicoides distinguiendose varios grupos de eslabones (A, B, C, D, E, F, G, H) que se diferencian por el número de sus aminoácidos, sucesión de ellos, y sobre todo, por los aminoácidos terminales de los mismos, dando las características de comportamiento y función diferentes.

### III.2. Estructura química de la Hemoglobina.

La hemoglobina es una proteína heterogenea formada por un grupo prostético pigmentado denominado Hem y una proteína simple llamada Globina, ésta última constituye el 98% de la molécula hemoglobínica, mientras que el grupo heme sólo un 4%.

De este último porcentaje constituido por el grupo heme 0.4% corresponde a la parte férrica del heme y 3.8% a la protoporfirina III (18) según se observa en la figura 1.

Las globinas están formadas exclusivamente por cadenas de



**FIGURA 1. PORCENTAJE QUE CONSTITUYE  
EL GRUPO HEME (18)**

aminoácidos que se disponen en forma de cinta replegada en el espacio, presentan varios segmentos, unos lineales y otros helicoidales.

El grupo globina al replegarse forma dos zonas, una llamada interna y la otra externa. Sin embargo, al reunirse las cuatro moléculas forman una cavidad intermedia dividida en dos sub-cavidades.

Puede comprenderse que está cavidad de la molécula de hemoglobina está rodeada por la parte externa de cada una de las cuatro moléculas de globina. (18)

Cada molécula de globina se encuentra unida a un grupo heme unido por enlaces de histidina y por otro sistema de unión más débiles.

En la relación con el desarrollo del ser humano, existen algunos grupos de hemoglobinas que dependen de diferencias en las globinas. la parte prostética de la hemoglobina recibe varios nombres: Hem, Hemo y Protoheme, este tipo de nombres varia según los autores. (18, 40, 52)

En nuestro estudio cuando nos referimos al grupo prostético se denominara grupo "Heme". En este grupo se ve que existen cuatro grupos pirrólicos unidos lateralmente por enlaces meteno (=CH-), y en el centro unidos al átomo de Fe, según se observa en la figura 2.

Tenemos en cuenta los dobles enlaces que existen en esta molécula, de las cuáles hay once. Los lugares de los enlaces simples y de los dobles enlaces se pueden cambiar lo que explica ciertas propiedades ópticas y de fluorescencia de este compuesto.

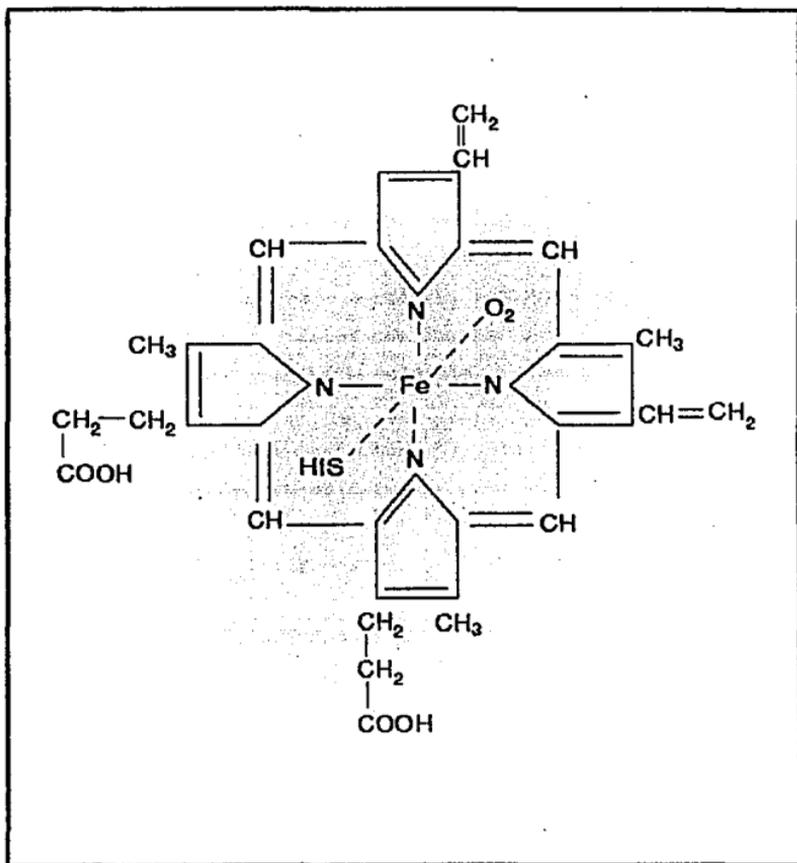


FIGURA 2. MOLECULA DE "HEME" OXIGENADA Y REPRESENTACION DE SU FUERTE UNION CON LA HISTIDINA. (18)

(18)

De los radicales que existen en la periferia del compuesto, podemos observar cuatro grupos metilo (-CH<sub>3</sub>), dos vinilos (-CH=CH<sub>2</sub>) y dos propiónicos. Por tratarse de una protoporfirina del tipo IX los dos grupos propiónicos están de lado.

Esto es de gran importancia debido a que estos radicales son disociables por su grupo carboxilo (-COOH) y por lo tanto pueden establecer fuertes atracciones con los aminoácidos que rodean la cavidad donde se emplaza la molécula de heme dentro de la molécula de globina.

Los grupos heme descansan en grietas que se encuentran en la superficie de las sub-unidades de globina. (52)

### III.3. Tipos de Hemoglobinas

#### III.3.a. Hemoglobinas Normales

##### 1. HEMOGLOBINAS EMBRIONARIAS:

La línea de células eritroides primitivas derivadas del saco vitelino produce tres ó más hemoglobinas embrionarias, las cuales pueden ser reconocidas por sus diferentes propiedades electroforéticas y cromatográficas. (52)

Las Hemoglobinas Embrionarias se producen únicamente en embriones humanos en el periodo comprendido entre el primero y segundo mes después de la fecha de comienzo del embarazo. Este tipo de hemoglobina son las siguientes:

HEMOGLOBINA GOWER I	( $\beta_1$ )
HEMOGLOBINA GOWER II	( $\alpha_2\beta_2$ ) La más común.
HEMOGLOBINA PORTIANO	( $\beta_2\beta_2$ )

La presencia ha sido demostrada sobre extendidos preparados con material de embriones de esa edad bajo pH ácido de 2.8-2.9 (32).

Las Hemoglobinas Embrionarias se componen de cuatro sub-unidades de globina, promediando cada una de ellas 17000 Daltons; de estas cuatro sub-unidades dos son alfa o análogas a alfa y las otras dos son análogas a beta.

Las cadenas de globina epsilon en el humano son cadenas semejantes a beta, pero con propiedades fisiologicas diferentes.

Se ha comprobado que son más numerosas las semejanzas estructurales entre los genes embrionicos similares a beta ( $\beta$ ) y el gen  $\beta$  adulto de la misma especie que entre genes embrionicos semejantes a  $\beta$  de diferentes especies indicando así que los genes de globinas embrionicas muy recientemente de los genes de la cadena beta para desarrollarse de modo independiente a partir de ese momento. Se verifica así una antitesis para los genes embrionicos semejantes a alfa, que muestran diferencias estructurales respecto a los genes de globina alfa. (52)

Se han observado veinticuatro diferencias de las cadenas epsilon al compararse con las cadenas beta, y dieciocho al compararse con las cadenas gama.

Existen porciones de la estructura primaria en los lugares 31-40, 60-66, 83-87 y 145-146, que se conservan en las cadenas

epsilon, tal como ocurre en las cadenas beta, delta y gama (51,52).

Una propiedad que se presenta tanto en las Hemoglobinas Embrionicas como en la Hemoglobina Fetal es que éstas presentan una alta afinidad al oxígeno. Por lo tanto, las hemoglobinas embrionicas se asemejan a la hemoglobina fetal, por su capacidad de saturarse con el oxígeno; esta característica facilita la descarga de oxígeno a través de la barrera placentaria (actividad en presión alta de CO<sub>2</sub>).

#### ii. HEMOGLOBINAS FETALES:

Este tipo de hemoglobina es llamada así ya que es la que predomina durante la vida fetal.

La HbF (Hemoglobina Fetal) tiene cuatro grupos Heme y cuatro cadenas polipeptídicas, dos alfa idénticas y dos tipo gama formadas de 141 y 146 aminoácidos respectivamente.

Las cadenas alfa son idénticas a los de la HbA, pero sus dos cadenas gama difieren en su estructura de las cadenas beta.

La hemoglobina fetal se simboliza de la siguiente forma: HbF ( $\alpha_2\beta_2$ ) (52). La producción de la cadena beta comienza a la altura de las primeras doce semanas del embarazo.

Después del parto el recién nacido produce cantidades menores de HbF, aproximadamente de 50 a 60% del total de la hemoglobina; contrariamente a lo que produce alrededor del sexto mes del embarazo que es de un 80% del total de Hemoglobina.

A los seis meses de vida, la HbF persiste en 1% del total de la Hb.

En adultos normales la HbF se encuentra en proporciones

menores al 0.5% del total de la Hb. (32)

#### HEMOGLOBINA BART.

Otra hemoglobina en la vida fetal de la cual se conoce poco es la Hb Bart cuya formula es ( $\gamma_4$ ).

Su origen es el mismo que la HbH (que es un tetrámero  $\beta_4$ ) por fallo de formación de las cadenas.

Por electroforesis el pH 8.9 la Hb Bart emigra más que la HbA, y la HbJ y menos que la HbI y la HbH, y a pH 6.5 es lenta y se sitúa cerca de la línea de origen, entre la HbI (más lenta), y la Hb Norfolk y la HbA. La desnaturalización alcalina de la Hb Bart es intermedia entre la HbA y la HbF.

La Hb Bart no posee función respiratoria, no muestra interacción Heme-Heme ni efecto Bohr. Pueden encontrarse pequeñas cantidades de Hb Bart (máximo de 2%) en recién nacidos aparentemente sanos si la proporción es mayor del 4% se trata de portadores del gen talasemia (18,40).

De esta Hemoglobina también pueden aparecer cantidades discretas en la infancia en proporción de 5-15%, en la sangre del cordón umbilical. Esta Hb suele desaparecer a los seis meses.

En estos casos los niños presentan anemia ligera con células en diana, hipocromia y a veces presencia de corpúsculos de Heinz. Se han efectuado técnicas especializadas para detectar a estos portadores, las técnicas más indicadas para esta finalidad son la electroforesis en gel de agar, la prueba de la fragilidad osmótica y la búsqueda de la formación de los corpúsculos de Heinz.(33)

## 111. HEMOGLOBINAS ADULTAS:

La hemoglobina del adulto normal es designada como Hemoglobina A (HbA), aunque ésta Hb no es la única en la vida adulta, si es la que se encuentra en mayor proporción (95 a 98%).

La HbA ó HbA<sub>1</sub> posee cuatro grupos Heme, dos cadenas tipo alfa y dos cadenas tipo beta. Además de la HbA, los individuos también producen pequeñas cantidades de hemoglobinas denominadas:

HbA<sub>2</sub> y HbF

HbA<sub>1</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ )

HbF ( $\alpha_2\beta_2$ )

HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ )

Recientemente se ha podido demostrar que la HbA<sub>1</sub>, existe en diversas fórmulas moleculares:

HbA<sub>1a</sub> , HbA<sub>1b</sub> , HbA<sub>1c</sub>

Esta separación en fracciones de la HbA<sub>1</sub>, ha sido de gran interés, ya que se ha relacionado la fracción HbA<sub>1c</sub>, con la diabetes. (51)

Estas tres fracciones de hemoglobinas se denominan hemoglobinas rápidas, por el hecho que emergen antes que la HbA<sub>1</sub> en una columna de intercambio catiónico. Los pacientes que poseen la enfermedad de la diabetes muestran niveles de HbA<sub>1c</sub> elevados que oscilan entre 7.2 a 10.6% del total de la Hb.

Las tres fracciones de la HbA<sub>1</sub> son llamadas también hemoglobinas rápidas, glicosiladas ó glicohemoglobinas. (33)

Lo interesante entonces es que a mayor concentración de glucosa en sangre, mayor formación de HbA<sub>1c</sub> lo que explica su aumento en pacientes diabéticos.

Las cadenas betas de la HbA<sub>1</sub> y de la HbA<sub>1c</sub> tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero el aminoácido valina de la terminal de la HbA<sub>1c</sub> va unida a un grupo carbonilo de un aldehído o de una cetona que forma parte de una hexona, la que se cree es una molécula de glucosa, por ello se considera a la HbA<sub>1c</sub> como una Hb glucosada.

Por otro lado la HbA<sub>2</sub> está formada por cuatro grupos heme, dos cadenas tipo alfa y dos cadenas tipo delta.

Las cadenas delta difieren de las beta en sólo ocho de sus 146 aa.

La síntesis de la cadena delta comienza en los finales del embarazo, aumenta en el primer año de vida y al finalizar este año; el niño ya alcanza los niveles que mantiene el adulto y que es de 1.5 a 3.5% del total de la hemoglobina. (33)

### III.3.b. Hemoglobinas Anormales (Hemoglobinopatías)

Las Hemoglobinopatías son todos los síndromes clínicos en los que existe como base una alteración estructural molecular de la Hb, ó bien un cambio en su metabolismo. Dentro de esta definición no entran aquellos casos donde sólo existe una deficiencia

cuantitativa de la Hb, ésto es en anemias de tipo ferropénicas por pérdida de sangre, parasitarias y talasemias ver tabla 1. (18)

Existen algunos sistemas de nomenclatura para diferenciar a las hemoglobinas anormales. El primero que se usó hace algunos años fue el siguiente:

A medida que se iban descubriendo algunas variedades de la hemoglobina se les iba imponiendo una letra por orden alfabético de acuerdo a su movilidad electroforética.

Cuando se encontraban más de una con una misma movilidad, se le designaba con un sufijo indicando la localidad geográfica donde se hizo el descubrimiento. Así pues existen varias clases de hemoglobinas como son: Hemoglobinas S, C, D, E, G, H, I, J, M. (49) En este tipo de nomenclatura se ha reservado la designación de la letra A para referirnos a la Hb adulta de mayor cantidad, La letra F fue designada para referirnos a la HbF.

La letra B del alfabeto no puede ser usada por convención en todas las hemoglobinas. Este sistema fué utilizado hasta el año 1956.

Otro sistema para designar a las hemoglobinas anormales era que el investigador o descubridor de la variante le asignaba un nombre común a capricho del mismo.

Otro sistema de las variantes de la Hb es aquel en el cual la variante es designada de acuerdo al sitio y la naturaleza del aminoácido sustituido en la cadena globínica.

Otro sistema más es el que designa a la variante de acuerdo a la posición helicoidal sustituida. (21, 40, 49)

- 1)  $\alpha$ -TALASEMIA  
ESTADOS HOMOCIGOTOS (MUERTE FETAL)  
ESTADOS HETEROCIGOTOS  
HEMOGLOBINOPATIAS H  
PORTADORES (CASOS LEVES)
  
- 2)  $\beta$ -TALASEMIA  
 $\beta$ -TALASEMIA MAYOR (ENFERMEDAD DE COOLEY)  
 $\beta$ -TALASEMIA MENOR (ENFERMEDAD DE RIETTI-GREPPI-NICHELI)
  
- 3)  $\delta$ -TALASEMIA
  
- 4)  $\gamma$ -TALASEMIA (POSIBILIDAD)
  
- 5) ESTADOS SIMILARES A LA TALASEMIA  
HEMOGLOBINA LEPORE  
PERSISTENCIA HEREDITARIA DE LA HbF
  
- 6) ESTADOS ASOCIADOS

TABLA 1. CLASIFICACION DE LAS TALASEMIAS (18).

### 1) LA HEMOGLOBINA S:

Es una molécula diferente de la HbA; es poco soluble y en seguida forma cristales llamados tactoides, y los glóbulos rojos que la contienen en cantidad superior al 20% de la hemoglobina total son deformados en forma de hoz ó semiluna.

El estudio electroforético de la HbS y HbA a un pH 8.96 emigran en sentidos distintos; debido al diferente punto isoeléctrico de estas hemoglobinas.

Punto isoeléctrico HbA 6.87

Punto isoeléctrico HbS 7.09

Una característica muy importante de la HbS (Heterocigótica) es que éste grupo tiene más defensas contra el paludismo que los individuos no portadores de esta alteración y forma, lo que se conoce como una superclase solamente de importancia en las zonas endémicas de paludismo. (19)

### ii) LA HEMOGLOBINA C:

Posee una migración más lenta que la HbS y de solubilidad normal. A pesar que la anomalía de esta Hb es en la posición seis de la cadena beta igual que la HbS el aminoácido cambiado en la HbC es glutámico por lisina. Por lo cual la formación de cristales tactoides no existen ni por lo tanto la falciformación. (19)

## iii) LA HEMOGLOBINA D:

Es más soluble que la HbS y no presenta falciformación, posee una electroforesis muy parecida a la que proporciona la HbS sobre un pH alcalino, pudiéndolo separar de ésta a un pH neutro o ácido sobre electroforesis en agar. (19)

## iv) LA HEMOGLOBINA E:

El desplazamiento electroforético a un pH alcalino es mucho menor que la HbA, por lo que se diferencia bien de ella y en cambio es muy próxima al de la HbA<sub>2</sub>. (19)

## v) LA HEMOGLOBINA G:

Esta hemoglobina presenta un diagrama electroforético parecido al de la HbF, con la diferencia de que ésta hemoglobina anormal no es alcaloresistente. (19)

A continuación se mencionan otras hemoglobinas anormales particulares. Ver tabla 2 (18)

Explicación del cuadro de hemoglobinas anormales. De izquierda a derecha significan:

- 1) Número global de la cadena, en donde ha habido la substitución.
- 2) Segmento, y numeración del segmento.
- 3) Aminoácido que normalmente existe en aquel eslabón.
- 4) Aminoácido que lo substituye en tal caso.

- 5) Nombre asignado a la hemoglobina.
- 6) Clasificación (grupos de Perutz y Lehmann).
- 7) Datos de interés.

Abreviaturas usadas.

- C. de Heinz = Corpúsculos metahemoglobinémicos de Heinz  
 Hb = Hemoglobina  
 heme = Grupo heme  
 Heterocig = Hetcg. = Heterocigoto  
 I = Inv. = invariable  
 Igual mov. A = Im A = Movilidad electroforética igual a HbA  
 Int. = Inest. = Hemoglobina inestable  
 L. = Lenta = Por electroforesis más lenta que HbA  
 Metahem = Metahemoglobinemia  
 No. comb. O<sub>2</sub> = Hemoglobina que no se combina con el O<sub>2</sub>  
 R. = Ráp = Rápida = Hemoglobina de movilidad electroforética más rápida que la HbA  
 Sint. = Síntomas clínicos  
 V. = Var = Residuo variable en distintas Hb  
 Vn. = Residuo variable, no polar  
 Vp. = V. polar = Residuo variable polar

### III.4. Hemoglobinas Anormales

#### III.4.a. EN MEXICO.

La identificación de personas portadoras de hemoglobinas anormales ó con trastornos de su síntesis se inicio en México en el

CADENAS ALFA (α)

23

5	A3	Ala	Asp	J-Toronto	4	VARIABLE RAPIDA
12	A10	Ala	Asp	J-Paris	4	VARIABLE RAPIDA
15	A13	Gly	Asp	J-Oxford	4	VARIABLE RAPIDA
16	A14	Lys	Glu	I	4	VARIABLE RAPIDA
22	B3	Gly	Asp	J-Medellín	4	VARIABLE RAPIDA
23	B4	Glu	Gln	Memphis	4	VARIABLE RAPIDA
23	B4	Glu	Val	Audhall	4	VARIABLE RAPIDA
24	B11	Glu	Gln	G-Chinesa	2	ASINTOMATICA IRREGULAR
30	B11	Glu	Gln	G-Honolulu		
43	CD1	Phe	Val	Torino	1	TRASTORNO CD. ANEMIA. C. DE HELMZ. Int. Inv.
47	CD5	Asp	Gly	L-Ferrara	4	EXTERNA SINTOMAS LIGEROS. LENTA. Inv.
47	CD5	Asp	His	Sinai-Sealy	4	EXTERNA NO SINTOMAS LENTA. Inv.
50	CD8	His	Asp	J-Cerdana	4	EXTERNA NO SINTOMAS Inv.
51	CD9	Gly	Arg	Ruas	4	EXTERNA NO SINTOMAS LENTA. Inv.
54	E3	Gln	Arg	Shimonoseki	4	EXTERNA NO SINTOMAS LENTA
54	E3	Gln	Glu	México	4	EXTERNA NO SIGNOS HETEROCIGOTO. Up. LENTA
57	E6	Gly	Asp	Norfolk	4	EXTERNA NO SIGNOS HETEROCIGOTO. V. RAPIDA
57	E6	Gly	Arg	Persia Gulf		ZONA EXTERNA
58	E7	His	Tyr	M-Boston	1	CIAZOSIS. METABENGL. NO. Comb. O <sub>2</sub> . Inv
68	E17	Asn	Lys	G-Philadelphia	4	EXTERNA NO SIGNOS HETEROCIGOTO. V. LENTA
68	E17	Asn	Asp	Ube II	4	EXTERNA NO SIGNOS HETEROCIGOTO. V. Ráp.
78	EF7	Asn	Lys	Stanleyville II	4	EXTERNA NO SIGNOS HETEROCIGOTO. V.
84	F5	Ser	Arg	Etobicoke	3	NO SINTOMAS CLINICOS. LABIL. Inv.
85	F6	Asp	Asn	G-Norfolk	4	EXTERNA NO SINTOMAS HETEROCIG. Up.

TABLA 2. CLASIFICACION DE LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES (18).

<CONTINUA>

87	FB	His	Tyr	N-Iwate	1	CIANOSIS. METAHEMOGLOB. NO COMB. O <sub>2</sub> . Inv.
90	FG2	Lys	Asn	J-Broussais	4	EXTERNO. NO SINTOMAS HETEROCIGOTO. Inv.
92	FG4	Arg	Gln	J-Capetown	2	LEGERA HIPERGLOBURIA. ALTA AFINIDAD O <sub>2</sub> . I
92	FG4	Arg	Lou	Chesapeake	2	POLICITEMIA. ALTA AFINIDAD O <sub>2</sub> . Inv.
102	G9	Ser	Arg	Manitoba	3	ESOSOS SINTOMAS. DIFICIL SEPARAR. Inv.
112	G19	His	Gln	Dakar	4	EXTERNO. NO SINTOMAS HETEROCIGOTO. Inv.
114	GH2	Pro	Arg	Chiapas	2	ASINTOMATICO. Hb CASI NORMAL
115	GH3	Ala	Asp	J-Tongeriki	4	EXTERNO. NO Sint. HETEROCIGOTO. V. Ráp.
116	GH4	Glu	Lys	O-Indonesia	4	EXTERNO. NO Sint. HETEROCIGOTO. V. Ráp.
136	H19	Lau	Pro	Bibba	1	ANEMIA CUERPOS HEDIZ. ALTERA NEME. I.
141	H24	Arg		Koelliker		ES UN CAMBIO DE Hb NORMAL
	TX	Asp	His	G-Baltimore		LENTA

TABLA 2. CLASIFICACION DE LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES  
(18).

<CONTINUA>

CADENAS BETA <B>						
2	HA2	Hla	Tyr	Tokuchi	3	POCOS SINTOMAS. CAMBIO segs. NA. LENTA. Var.
6	A3	Glu	Val	S	4	FALCIFORMACION. MUY FRECUENTE. LENTA. Var.
6	A3	Glu	Val	C-Harlem	4	FALCIFORMACION. OTRO CAMBIO. LENTA. Var.
6	A3	Glu	Lys	C	4	CELULAS RIGIDAS. LENTA. Var.
6	A3	Glu	Val	C-Georgetown	47	FALCIFORMACION. LENTA
7	A4	Glu	Gly	G-San José	4	LENTA. Up.
7	A4	Glu	Lys	Sriraj	4	LENTA. VARIABLE
9	A6	Ser	Gys	Porto Alegre	4	POLIMERIZACION <<IN VITRO>>. VARIABLE
14	A11	Leu	Arg	Sogn	3	NO SINTOMAS. Un.
16	A13	Gly	Asp	J. Baltimore	4	RAPIDA. VARIABLE
16	A13	Gly	Arg	D. Bushmann	4	LENTA. VARIABLE
22	B4	Glu	Ala	G. Coughatta	4	LENTA. VARIABLE
22	B4	Glu	Lys	E. Saskatoon	4	VARIABLE
23	B5	Val		Freiburg	3	CIANOSIS. ALTA AFINIDAD O <sub>2</sub> . LENTA. I.
25	B7	Gly	Arg	G. Taiwan-Tai		VARIABLE, NO POLAR
26	B8	Glu	Lys	E	2	ANEMIA LIGERA HOMOC. BAJA AFIN. O <sub>2</sub> . LENTA. Inv
28	B10	Leu	Pro	Genova	3	INESTABLE. ANEMIA HEMOLITICA. IGUAL NOV. A.
30	B12	Arg	Ser	Tacoma	2	NO SINTOMAS. AFINIDAD O <sub>2</sub> ALTA. Inv.
35	C1	Tyr	Phe	Philly	2	ANEMIA HEMOLITICA LIGERA. INVARIABLE
42	CD1	Phe	Ser	Hammersmith	1	ANEMIA. CIANOSIS. INESTABLE. NOV. IGUAL A. Inv.
43	CD2	Glu	Ala	G-Galveston	4	LENTA. Var.
46	CD5	Gly	Glu	K-Ibadan	4	RAPIDA. INVARIABLE
47	CD6	Asp	Asn	G-Copenhague	4	LENTA. Var. POLAR
56	D7	Gly	Asp	J-Bangkok	4	RAPIDA. VARIABLE.

TABLA 2. CLASIFICACION DE LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES  
(18).

<CONTINUA>

CADENAS BETA (β) Continuación

26

58	E2	Pro	Arg	Dhofar	4	VARIABLE NO POLAR
61	E5	Lys	Asn	Hikari	4	RAPIDA. INVARIABLE
61	E5	Lys	Glu	N-Seattle	4	RAPIDA. INVARIABLE
63	E7	His	Tyr	N-Saskatoon	1	CIANOSIS. METAHEN. NO COMBINA O <sub>2</sub> . Inv.
63	E7	His	Arg	Zurich	1	SENSIB. SULFANILAS. HEMOLISIS. INESTABLE. LENTA. Inv
67	E11	Val	Ala	Sydney	1	ANEMIA HEMOL. CUERPOS HEINZ. INESTABLE. Inv.
67	E11	Val	Asp	Bristol	1	CUERPOS DE HEINZ
67	E11	Val	Glu	N-Milwaukee	1	CIANOSIS. METAHEN. NO COMBINA O <sub>2</sub> . Inv.
69	E13	Gly	Asp	J-Cambridge	4	RAPIDA. Var
70 ó 76	E14	Ala	Glu	Seattle	4	RESIDUO NO SEGURO. INESTABLE. RAPIDA
73	E17	Asp	Asn	C-Harlem	4	FALCIFORMACION POR OTRO CAMBIO. Var. LENTA
73	E17	Asp	Asn	Karle-Gu		PUEDE SER ORIGEN HbC-HARLEM
74	E18	Asp	Lys	Stanleyville II		ZONA SUPERFICIAL. NO ELICOIDAL
76	E20	Ala	Glu	Seattle		ANEMIA. INESTABLE
77	EF1	His	Asp	J-Iran	4	RAPIDA. Up
79	EF3	Asp	Asn	J-Accra	4	LENTA. INVARIABLE
87	F3	Thr	Lys	D-Ibadan	4	LENTA. VARIABLE
88	F4	Leu	Pro	Santa Ana	1	ANEMIA HEMOLITICA. C. HEINZ. Inv.
88	F4	Leu	Arg	Boras	1	INVARIABLE
90	F6	Glu	Lys	Aganogi	4	LENTA. INVARIABLE
91	F7	Leu	Pro	Sabino		INESTABLE
92	F8	His	Tyr	N-Hyde Park	1	CIANOSIS. METAHEN. IGUAL NOV. HbA. Inv.
93 - 97	F9-FC4	(S)		Gun Hill	3	ANEMIA HEMOLITICA. INESTABLE. LENTA
94	FG1	Asp	Asn	Oakridge	4	

TABLA 2. CLASIFICACION DE LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES  
(18).

<CONTINUA>

CADENAS BETA (β) Continuación

27

95	FQ2	Lys	Glu	N	4	VARIABLE
95	FQ2	Lys	Glu	N-Baltimore	4	RAPIDA
98	FQ5	Val	Met	Köln	1	ANEMIA HEMOLITICA. INESTABLE. LENTA
99	G1	Asp	Asn	Kompoz	2	ALTA AFINIDAD O <sub>2</sub> . POLICITEMIA. LENTA. Inv.
99	G1	Asp	His	Yakima	2	ALTA AFINIDAD O <sub>2</sub> . POLICITEMIA. LENTA. Inv.
102	G4	Asn	Thr	Kansas	1,2	CIANOSIS. BAJA AFINIDAD O <sub>2</sub> . INESTABLE. Inv. Inv.
113	G15	Val	Glu	New York	2	NO CLINICA. RAPIDA. Inv.
120	GH3	Lys	Glu	Hijiyama	4	RAPIDA. V. POLAR
121	GH	Glu	Gln	D-Punjab	4	VARIABLE. LENTA
121	GH	Glu	Lys	D-Arabia	4	VARIABLE. LENTA
126	HH	Val	Glu	Hoku	4	
130	HB	Tyr	Asp	Wien	3	ANEMIA HEMOLITICA. Var. NO POLAR. Inest.
132	H10	Lys	Gln	K-Hoolwich	2	NO Sint. CLINICOS NI ALTERACIONES. Inv. RAPIDA
136	H14	Gly	Asp	Hope	3	NO CLINICA. ALCALIRRESISTENTE. AFIN O <sub>2</sub> ALTA. Ráp.
143	H21	His	Asp	Kenwood		RAPIDA
145	HC-2					
	H23	Tyr	His	Rainier	3	POLICITEMIA. AFINIDAD O <sub>2</sub> ALTA. ALCALIRRESISTENTE. Inv.
69 & 74	E13	Gly	Asp			
	6 18					
	T1			R(Durham I)		

TABLA 2. CLASIFICACION DE LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES (18).

<CONTINUA>

CADENAS GAMA (7) Continuación						
5	A2	Glu	Lys	F-Texas I	4	VARIABLE, LENTA
6	A3	Glu	Lys	F-Texas II	4	VARIABLE, LENTA
12	A9	Thr	Lys	F-Alexandra	4	VARIABLE, LENTA
61	E5	Lys	Glu	HbF-Jamaica		VARIABLE. OTRO CAMBIO 136-Ala
117	G19	His	Arg	HbF-Malta		
121	GM	Glu	Lys	F-Hull	4	VARIABLE. LENTA
?		Glu	Ala	F-Houston	4	VARIABLE. LENTA

CADENAS DELTA (4) Continuación						
2	W2	His	Arg	A <sub>2</sub> Sphakia	4	VARIABLE. LENTA
16	A13	Gly	Arg	A <sub>2</sub>	4	VARIABLE. LENTA
22	B4	Ala	Glu	A <sub>2</sub> Flatbush	4	VARIABLE. RAPIDA
136	H14	Gly	Asp	A <sub>2</sub> Badlinga	4	

**TABLA 2. CLASIFICACION DE LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES (18).**

año de 1950. El primer sujeto estudiado fué en el hospital infantil de México, situado en la Colonia Doctores en el Distrito Federal, se trataba de un paciente que presentaba anemia drepanocítica (Hemoglobina S) (19).

El Dr. Guillermo Ruiz Reyes y colaboradores efectuaron las primeras encuestas para descubrir este tipo de trastornos genéticos en diferentes grupos de poblaciones. Además se difundieron las técnicas básicas para identificarlas, que son electroforesis en gel de agar a pH 8.8, recuentos eritrocíticos, la estimación de la hemoglobina, recuento de reticulocitos y fragilidad osmótica.

Así pues con estas técnicas y con la ayuda de otros investigadores, se comprobó un aumento importante de casos descubiertos. La información que se tiene de la distribución de las hemoglobinas anormales en México, provienen de dos fuentes de información. (19,45)

1) Estudios realizados en poblaciones indígenas, poblaciones híbridas en una comunidad de origen italiano y en una población hospitalaria.

2) Estudios de pacientes con problema de anemia hemolítica, quienes han presentado este tipo de anormalidades.

1) En la República Mexicana, la población indígena habla diferentes lenguas ó dialectos, las cuales han sido agrupadas para su estudio en cinco grupos diferentes: Tarasco, Macro-Mixteco, Macro-Maya, Macro-Nahua y Macro-Yuma. En base a esta clasificación de indígenas Mexicanos, se efectuaron estudios en diferentes comunidades indígenas, que hablan únicamente su dialecto (indias puras). Se

analizaron aproximadamente a 2000 personas de diferentes grupos étnicos que pertenecian a 18 grupos lingüísticos, los resultados se resumen en la tabla 3.

Durante el curso de la investigación de hemoglobinas anormales en la población mexicana se encontró que tres individuos tenian HbA-S, o sea heterocigotos para la HbS. (33)

Tambien se encontraron a dos personas quienes mostraron un comportamiento de desplazamiento rápido de sus hemoglobinas, de acuerdo a la nomenclatura se le ha denominado Hemoglobina México.

Estas dos personas que poseian esta anomalía son hermanos (40 y 55 años) que pertenecen al grupo lingüístico Nahuatl en un pueblo localizado al sureste de Puebla.

En otra persona del grupo Macro-Mixteco, que habla el mazateco en Oaxaca tuvo la misma anomalía (Hb México).

En otro indigena, del grupo Chol, se encontró una variedad no descrita de la hemoglobina, a lo que se le denominó Hb Chiapas. Cuyo defecto es en la cadena alfa al igual que la Hb México.

De acuerdo a las muestras estudiadas, se puede observar que las hemoglobinas anormales no se presenta en individuos de raza provenientes de étnias mexicanas puras.

En diversos estudios realizados en poblaciones indígenas híbridos de diversas partes de la República principalmente de las costas del golfo de México y el Océano Pacifico.

De acuerdo a la historia un gran número de esclavos del Africa fueron traídos a México, durante la dominación española y la mayor proporción fue de origen Dantu. (18)

La imigración de negros africanos a México se realizaba

GRUPO LINGUISTICO	LENGUA	ESTADO	TOTAL	Hb ANORMALES	
				A-S	OTRAS
MACRO - NAHUA	NAHUA	PUEBLA	172	0	2 (A - MEX.)
	NAHUA	VERACRUZ	184	0	0
	CDRA	MAYARIT	101	1	0
	TARAHUMARA	CHIHUAHUA	99	0	0
	YAQUI	SOMORA	96	0	0
TABASCO	TABASCO	MICHUACAN	133	0	0
MACRO - MIXTECO	MIXTECO	OAXACA	154	0	0
	HAZATECO	OAXACA	138	0	1 (A - MEX.)
	ZAPOTECO	OAXACA	111	0	0
	CHINATECO	OAXACA	21	0	0
	POPOLOCO	OAXACA	17	0	0
MACRO - YANA	HURASTECO	S.L.P.	312	0	0
	YAYA	YUCATAN	260	0	0
	TZELTAL-TZATZIL	CHIAPAS	163	0	0
	CHOL	CHIAPAS	152	0	1 (A - CHIAPAS)
	CHONTAL	TABASCO	99	2	0
	TOTONACA	VERACRUZ	86	0	0
	NIXE	OAXACA	32	0	0

TABLA 3. VARIANTES DE LA HEMOGLOBINA EN POBLACIONES INDIAS DE MEXICO (19).

directamente a través del Puerto de Veracruz, sin embargo una minoría lo hizo por el Puerto de Acapulco.

Se llevarán a cabo diversos estudios en ambas costas (Este y Oeste) y se demostró una incidencia variable de heterocigotos de la HbS y otras anomalías hemoglobínicas como se observa en la figura 3 (45) y en las tablas 4 y 5.

Al mismo tiempo fueron hechos estudios en dos hospitales, uno en la ciudad de Puebla y el otro en la ciudad de Guadalajara (33) en donde se analizarán adultos y a recién nacidos.

Los resultados se resumen en la Tabla 6.

En el estado de Jalisco, por otra parte del centro médico de occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social de Guadalajara, se llevarán a cabo estudios en diversos centros de salud analizando a 1661 personas de las cuales los resultados se resumen en la Tabla 7.

Con lo que respecta al estudio hecho a una comunidad de origen Italiano, se conoce que en Puebla existe una región denominada Chipilo, la cual fué fundada en 1882 por 250 personas, están agrupadas aproximadamente en 50 familias, procedentes de diversos lugares de Italia como son: Veneto, Lombardía y Piamonte. Para el año de 1965, esta población ya tenía cerca de 3000 habitantes, este aumento demográfico se debía exclusivamente a uniones entre las familias originales y sus descendientes.

Se estudiarán 150 individuos al azar, de los cuales a dos se les encontró un aumento de la fracción A<sub>2</sub> de la hemoglobina (33), asociada a anemia hipocrónica moderada y parámetros normales de hierro sérico.



FIGURA 3. MAPA DE LA DISTRIBUCION DE LAS Hbs ANORMALES EN MEXICO (19)

LA NUMERACION DE ESTE MAPA CORRESPONDE A LAS COMUNIDADES ETHNICAS ESTUDIADAS, INDICANDO SU LOCALIZACION EN EL TERRITORIO DE LA REPUBLICA MEXICANA.

LA TABLA 2 MUESTRA LOS LOCALIZADOS HACIA EL GOLFO DE MEXICO.

LA TABLA 3 MUESTRA LOS LOCALIZADOS HACIA EL OCEANO PACIFICO.

COMUNIDAD EN LA COSTA ESTE	NUMERO DE CASOS	AS %	SS %	OTRAS
1. TANTANUA	109	12 (11.0%)	0	I (AC)
2. SALADERO	119	51 (4.2%)	0	0
3. VERACRUZ	147	2 (1.4%)	0	I (A-LENTA)
4. PARAISO	160	11 (6.9%)	0	I (A-RAPIDA)
5. EL CARMEN	109	3 (2.8%)	0	0
6. HUEYAPAN DE DOMPO	200	18 (9.0%)	0	0
7. COSAMALDAPAN	200	7 (3.5%)	0.5	1 ( $\beta$ -TAL)
8. TLACOTALPAN	200	5 (2.5%)	0	0
9. ACULA	200	3 (1.5%)	0	0
10. CHICALTALQUIS	200	4 (2.0%)	0	0
11. YANCA				
12. CUITLAMBAC	400	2 (0.5%)	0	2 ( $\beta$ -TAL)
13. ONEALCO				I (AC)

**TABLA 4. FRECUENCIA DE HETEROCIGOTOS DE LA HbS,  
 Y OTRAS ANORMALIDADES HEMOGLOBINICAS  
 "ESTUDIOS EN LA COSTA ESTE" (45).**

COMUNIDAD EN LA COSTA OESTE	NUMERO DE CASOS	AS %	SS %	OTRAS
1. POCHUTLA	749	3 (0.4%)	0	0
2. S. PEDRO NIXTEPEC	335	9 (2.9%)	0	0
3. CUAJIMICUILAPA	592	66 (11.1%)	0	0
4. OMETEPEC	408	17 (4.1%)	0	0
5. XOXIHTLAWHUA	41	0 (0.0%)	0	0
6. SAN MARCOS	143	16 (11.2%)	0	0
7. ACHPULCO	119	13 (10.1%)	0	0
8. LA SABANA	200	5 (2.5%)	0	5(HPFH) 1(S-HPFH)

**TABLA 5. FRECUENCIA DE HEMOGLOBINAS EN MEXICO  
"ESTUDIOS EN LA COSTA OESTE" (45).**

**NOTA: HPFH. PERSISTENCIA HEREDITARIA DE LA HEMOGLOBINA FETAL.**

No. MUESTRAS		TOTAL	BTAL	AS	AC	OTRAS
<b>PUEBLA</b>						
ADULTOS	3006	0	6	3	1	2HA-Max.
%		0	0.15	0.077	0.025	0.051
RECEN NACIDOS	500	0	0	0	0	
%		0	0	0	0	0
<b>GUADALAJARA</b>						
ADULTOS	3668	0	3	13	0	3-HA-RIMON 1-HA-BALTINOR 3 NO CARACTERIZADAS
%		0	0.08	0.35	0	0.19
RECEN NACIDOS	4600	0	6	1	0	2HA-TARRANT
%		0	0.13	0.02	0	0.04

TABLA 6. ESTUDIOS DE LAS HEMOGLOBINOPATIAS REALIZADAS EN LOS ESTADOS DE PUEBLA Y GUADALAJARA (45)

POBLADO	No. MUESTRAS	α-TAL	β-TAL	AS	AC	OTRAS	%
TONALA	1096	0	0	5	4	ZETA-CHITAPYS THA-FAMIN- LUBBOCK	1.09
AMEGA, COCULA, MAGDALENA, OCOTLAN YAHUALILIN	500	1	0	2	1	0	0.8
HUICHOL	65	0	0	0	0	0	0

TABLA 7. HEMOGLOBINAS ANORMALES ENCONTRADAS  
EN SIETE CENTROS DE SALUD EN EL  
ESTADO DE JALISCO. (45)

En ambos casos se estableció el diagnóstico de Beta-Talasemia. La frecuencia en que se observó en esta región de Chipilo es similar a la encontrada en Italia de donde procedían los ancestros de esta comunidad (19).

2) Pacientes con Anemia Hemolítica. Con lo que respecta a los casos aislados de pacientes con problemas de anemia hemolítica, en los que se han identificado anomalías en la hemoglobina, se puede decir que con más frecuencia se observa la HbS, particularmente entre habitantes de las Costas del Golfo y Pacífico, como ya se mencionó.

En México se han descrito tres variedades de hemoglobinas de las cuales dos han sido caracterizadas bioquímicamente, las llamadas Hb México y Hb Chiapas, la tercera se ha denominado UNAM, ésta última no está bien caracterizada y algunos investigadores suponen que ésta es idéntica a la Hb Chiapas, por tal motivo esta Hb permanece en la incertidumbre, y casi no se hace mención.

En la Tabla 8 se hace mención de los casos de hemoglobinas anormales encontradas en México principalmente de pacientes con anemia hemolítica. (33)

### 3) Tipos de Hemoglobinas Mexicanas

a. HEMOGLOBINA MEXICO. En 1963 se descubrió por primera vez la hemoglobina anormal en una familia mexicana, motivo por el cual se le denominó Hb México.

Hasta este momento la Hb México era una anomalía exclusiva de la

NOMBRE	NUMERO DE CASOS	ORIGEN ETNICO
<b>HEMOGLOBINAS</b>		
MEXICO ( $\alpha_54$ Glu-Glu)	3	MEXICANO
CHIAPAS ( $\alpha_{114}$ Pro-Arg)	2	MEXICANO
TARRANT ( $\alpha_{126}$ Asp-Asn)	2	MEXICANO
S( $\beta_6$ Glu-Val)	212	MEXICANO, HOLANDES Y AFRICANO
C( $\beta_6$ Glu-Lys)	11	MEXICANO
G-SAN JOSE( $\beta_7$ Glu-Gly)	1	MEXICANO
J-BALTIMORE( $\beta_{16}$ Gly-Asp)	1	MEXICANO
E( $\beta_{119}$ Gly-Asp)	1	MEXICANO
FAMMIM-LIEBROCK( $\beta_{119}$ Gly-Asp)	1	MEXICANO
RIYADH( $\beta_{120}$ Lys-Asn)	3	MEXICANO
D.LOS ANGELES( $\beta_{121}$ Glu-Gln).	1	MEXICANO
<b>TALASEMIAS</b>		
ENFERMEDAD H	3	MEXICANO
$\alpha$ -TALASEMIA	6	MEXICANO
$\beta$ -TALASEMIA HOMOCIGOTA	5	MEXICANO
$\beta$ -TALASEMIA	17	MEXICANO Y LIBANES
$\delta$ -TALASEMIA COMBINADO CON HbS.	2	MEXICANO Y LIBANES
HbS-HpFH	1	MEXICANO
HbE	1	MEXICANO
$\delta\beta$ -TALASEMIA	1	MEXICANO
HpFH	3	MEXICANO

TABLA 8. LISTA DE HEMOGLOBINAS Y TALASEMIAS ENCONTRADAS EN MEXICO (33)

raza india de la meceta central mexicana, sin embargo, otros estudios demostrarán la misma alteración molecular en personas del norte de Africa y Cerdeña. (3)

Durante otras investigaciones que se llevarón a cabo en el Hospital Infantil de Medellin Colombia, se encontró a una mujer de 21 años de edad con la misma alteración molecular que la Hb México. Esta persona era de origen indígena negroide, sin antecedentes patológicos personales y familiares de anemia hemolítica.

Los estudios familiares demostrarón que la línea materna no presentaba la anomalía en ninguna de las personas estudiadas; en cambio, la línea paterna era la que portaba la anomalía genética, ya que se encontró en el padre y en el abuelo de la paciente. Asimismo, la hemoglobina anormal se encontró en dos de los once hermanos de la paciente, los análisis de sangre no mostrarón ninguna alteración de importancia.

La Hb México es una proteína de propiedades electroforéticas anormales, los análisis de Hb revelan que el componente de movimiento rápido presentan las siguientes características:

- 1.- Migran más rápido que la HbA en electroforesis en papel a pH 8.6

Electroforesis en bloque de almidón pH 8.8 y en electroforesis en agar gel pH 8.8 como se observa en la Figura 4.

- 2.- No se separa completamente de la HbA en la electroforesis en papel a pH 6.5 y tiene una velocidad de migración idéntica a la HbA en electroforesis en agar gel a pH 6.0

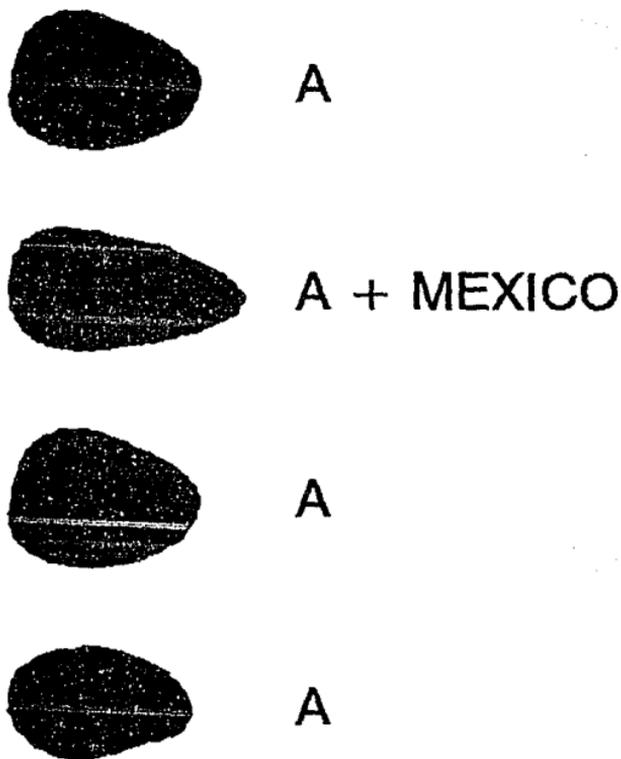


FIGURA 4. COMPARACION ELECTROFORETICA (pH 8.8) DE LA Hb MEXICO Y LA HbA (33).

3.- Las determinaciones cuantitativas usando el bloque de almidón en electroforesis y la columna de cromatografía de IRC-50 amberlita muestran que están constituidas por un 20% de la Hb total en cada caso.

4.- En la electroforesis en papel a pH 8.6 se mueve ligeramente más rápido que la HbJ. (33)

No produce ninguna enfermedad clínica ni trastornos hematológicos, es decir, que se manifiesta como un rasgo Heterocigote asintomático. No se ha descrito en forma hemocigote ni asociada a otra Hb anormal o a talasemia. La anomalía en ésta Hb se presenta en la cadena alfa en la posición 54 en donde el aminoácido Gln ha sido sustituido por el aminoácido Glu. (33)

HEMOGLOBINA CHIAPAS. Esta Hb anormal denominada Hb Chiapas, se encontró en un niño de una escuela interna cerca del Pueblo Salto de Agua en Chiapas, este niño tenía once años de edad y pertenecía al grupo lingüístico Chol, su escuela se encontraba en Tila en el Estado de Chiapas.

La anomalía de esta Hb se presenta en la cadena alfa en la posición 114 en donde el aminoácido prolina ha sido sustituido por el aminoácido arginina. Desde el punto de vista clínico y hematológico, el sujeto y sus padres que presentan la Hb Chiapas son normales.

Desafortunadamente, no se puede obtener toda la información necesaria debido a las dificultades para entender su lenguaje.

Propiedades:

1. Esta Hb anormal se desplaza más lentamente que la HbA, y no se observa: desplazamiento del componente A<sub>2</sub> a un pH alcalino y electroforesis en papel y en gel de almidón como se indica en la Figura 5.
2. A un pH ácido en electroforesis en papel y agar gel se mueve ligeramente adelante de la HbA.

La Hb Chiapas sólo ha sido descubierta en su forma heterocigota con la HbA y al igual que la Hb México se desconocen los síntomas que ocasionaría al estar en estado homocigoto o en forma heterocigota con otra hemoglobina anormal.

### III.4.b. MUNDIALMENTE

La distribución geográfica de las hemoglobinas anormales las cuales se designan por letras del alfabeto las más importantes y comunes son las siguientes: HbC, HbD, HbE, HbG, HbS (51)

De este tipo de hemoglobinas se ha tratado de indicar la localidad geográfica siendo como sigue:

#### 1) DISTRIBUCION DE LA HEMOGLOBINA C

Ha sido encontrada en gente de raza negra Americana, se esperaba que tuviera sus antecesores en África Occidental, pero no se esperaba en la parte Oeste del Africa ni en la parte del Este.

Esta Hb se encontró en un 15% en los habitantes de Ghana y

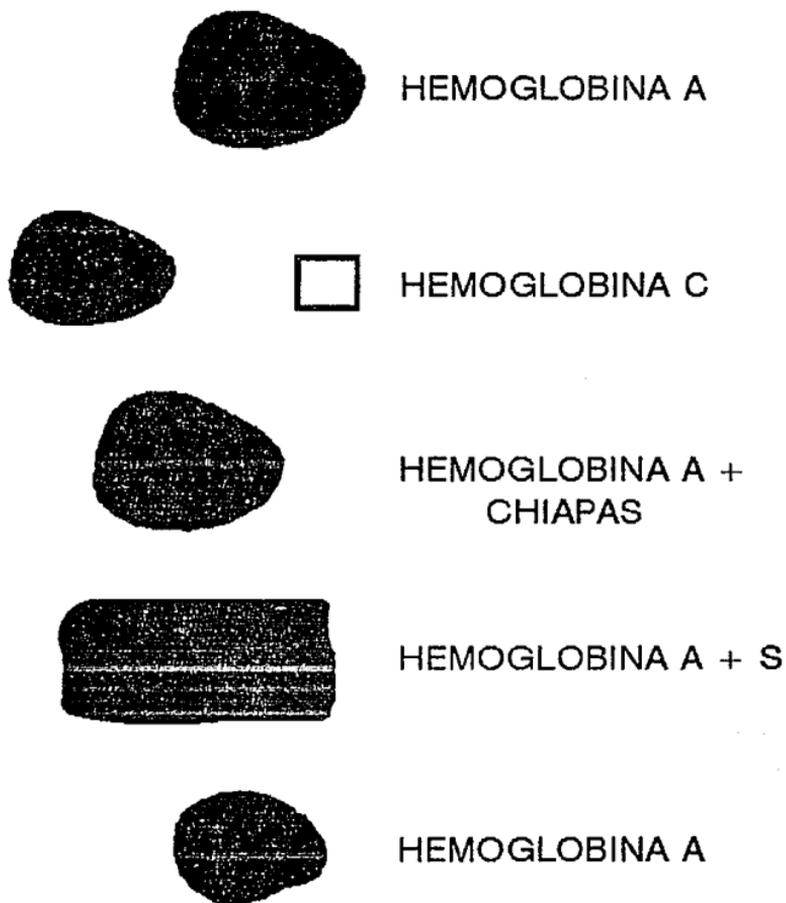


FIGURA 5. COMPARACION ELECTROFORETICA A pH 8.2 DE LA Hb CHIAPAS Y OTRAS (24).

en Volta en el Occidente de Nigeria fué de 3%. La frecuencia de esta HbC disminuye en la Sierra Leone y Liberia, no se localiza en Congo ni en otra parte del Africa Tropical;

ocasionalmente se observó en el Norte de Africa.

Esto es en parte natural, por la relación comercial que existe entre Africa Occidental y el Norte de Africa.

Raramente se ha encontrado en Sicilia Italia.

Los genetistas creen tener la base de un ciclo del origen y diseminación de un "Gen Nuevo". (48)

## 2) DISTRIBUCION DE LA HEMOGLOBINA D

Se trata de un conjunto de hemoglobinas que fuerón globalmente identificadas y nombradas de acuerdo a la localidad geográfica en la que se encontrarán. Al menos existen tres variantes:

HbDBushman En la cadena beta en la posición 16

Gly -----> Arg

HbDpunjab En la cadena beta en la posición 121

Glu -----> Gln

HbDibadan En la cadena beta en la posición 87

Thr -----> Lys

HbDLos Angeles En la cadena beta en la posición  
121

Glu -----> Lys

De estas tres variantes mencionadas, resultado evidente que la HbDLos Angeles era idéntica a la HbDFunjab. (18)

La HbD surgió probablemente en la India Noroccidental donde tiene una frecuencia de aproximadamente el 3%, su aparición en los países Europeos esta primariamente limitada a los que han tenido estrecho contacto con los pobladores de las indias Orientales, como Ingleses, Portugeses y Franceses.

Es quizas lógico llamar a esta variante HbDFunjab ya que es el lugar donde se encontraba con mayor proporción, y no HbDLos Angeles aunque ésta última fuera la que primero se descubrió. Se ha encontrado esta anormalidad entre los negros Americanos y Musulmanes de Argelia. (18, 52)

3) DISTRIBUCION DE LA HEMOGLOBINA E

Esta Hemoglobina descubierta en 1954 se encuentra con una alta frecuencia en Birmania, Tailandia, Camboya y Malasia. Se ha encontrado en bajo porcentaje en las cercanias de Bengala, tambien se encuentra raramente en Indonecia y Nepal.

En la Malaya se observa alto porcentaje en el Norte y bajo

porcentaje en el Sur donde ha sido grande la emigración desde Indonesia. Es importante hacer notar que la HbE se encuentra en Indo-Chinas, pero no en los Chinos modernos y esto se asocia con las antiguas poblaciones mongólicas del Sureste de Asia.

Otro porcentaje elevado de la HbE son aquellas en donde también existe con mayor frecuencia la talasemia alfa y beta, por lo tanto, es corriente la interacción entre estos dos trastornos y la HbE.

#### 4) DISTRIBUCION DE LA HEMOGLOBINA G

Fue encontrada en los negros del Africa Occidental, existen cuatro tipos de HbG que son los siguientes:

HbG<sub>San José</sub> En la cadena beta en la posición 7

Glu -----> Gly

HbG<sub>Galveston</sub> En la cadena beta en la posición 43

Glu -----> Ala

HbG<sub>Goushatia</sub> En la cadena beta en la posición 22

Glu -----> Ala

HbG<sub>Ghinea</sub> En la cadena alfa en la posición 24

Glu -----&gt; Gln

##### 5) DISTRIBUCION DE LA HEMOGLOBINA S

Este tipo de Hb anormal es la que aparece con mayor frecuencia y proporción en diversas partes del mundo entero, por lo que se le ha estudiado más que las hemoglobinas anteriores.

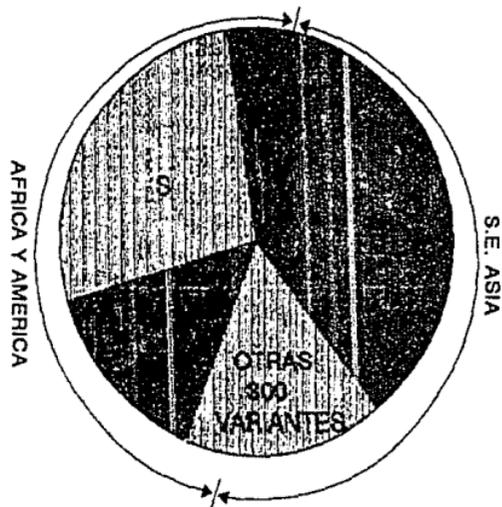
Su mayor frecuencia aparece en el Africa Tropical, con una frecuencia heterocigota de un 20%, aunque en algunas zonas alcanza el 40%. Parece ser que en el sur del Africa no se encuentra esta anomalía, ya que la difución del gen responsable parece que esta limitado por los ríos Zambese y Kunene.

La HbS tiene una frecuencia de 9% aproximadamente en los negros del nuevo mundo; el gen causante de la anomalía se encuentra en menor proporción en el oriente medio, en Grecia y en las tribus aborígenes de la India. (18, 52)

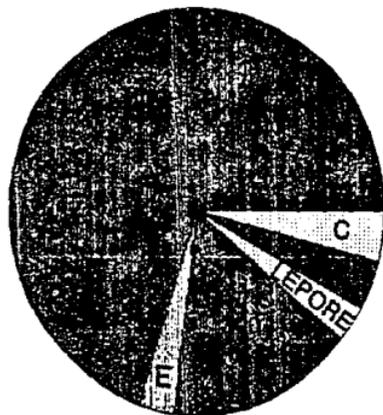
Las distribuciones de las hemoglobinas más comunes se describen en conjunto en la Figura 6.

Frecuencia relativa aproximada de las variantes de las hemoglobinas anormales. (51)

En este trabajo se pretende continuar con los estudios sobre Hemoglobina en México y su distribución en la población nativa.



DISTRIBUCION MUNDIAL



DISTRIBUCION U.S.A.

FIGURA 6  
 FRECUENCIA RELATIVA APROXIMADA DE LAS VARIANTES DE LA HEMOGLOBINA (51)

### III.5. Métodos de Identificación

Existen diversas técnicas que se han usado para separar e identificar las hemoglobinas anormales de las cuales las vías comunes son:

#### CROMATOGRAFIA.

Se ha usado la cromatografía en columna, utilizando la DEAE-celulosa, amberlita IPC-50, la carboximetil celulosa. (1)

#### TECNICAS DE CURVAS DE SOLUBILIDAD DEL O<sub>2</sub>.

En esta técnica se procura poner en contacto una solución de Hb con distintas presiones parciales de oxígeno y observar la curva de transformación de Hb reducida a oxigenada. Como sabemos la curva que presenta la Hb adulta normal es del tipo sigmoidea, esta forma puede cambiar cuando se trata de distintas hemoglobinas, de las cuales algunas muestran desplazamiento de las curvas y otras no. (33)

#### TECNICAS INMUNOLOGICAS.

Se ha utilizado la técnica de difusión sobre gel y la inmunolectroforesis. (22)

#### ESPECTROFOTOMETRIA.

Las curvas de absorción que presentan distintas hemoglobinas pueden dar imágenes diferentes, se ha comprobado también que en la región ultravioleta se puede

precisar más diferencias, por medio de ésta técnica se ha demostrado que la HbF tiene un máximo de absorción a 289.8 milimicras, comparado con HbA que posee una absorción a los 291.0 milimicras. (49)

#### DIFRACCION DE LOS RAYOS X.

Esta técnica utilizada nos ha permitido descubrir y establecer la fórmula espacial de una Hb. (51)

#### MICROSCOPIO ELECTRONICO.

Por medio de éste aparato ha sido posible seguir paso a paso la formación de cristales de Hb de falciformación. (22, 49)

#### TECNICA DE HIBRIDACION.

Esta técnica ha servido para separar y estudiar algunas alteraciones de las cadenas globínicas alfa y beta.

Esta técnica se basa en los procesos de desnaturalización y renaturalización del DNA y el RNA. (51)

#### ELECTROFORESIS.

Por medio de esta técnica ha sido posible reconocer diversos tipos de hemoglobinas ya que este procedimiento esta basado en el corrimiento que presentan las hemoglobinas en un campo eléctrico de acuerdo a las cargas eléctricas que ésta posee. (46)

La electroforesis es una de las técnicas analíticas más

poderosas de las 47 que se dispone en la investigación bioquímica actual.

Su campo de aplicación ha sido inmensamente ampliado, durante los últimos años, debido a la simplificación de los aparatos requeridos para su uso, y más recientemente, por la disponibilidad de medios de soporte purificado que han acortado sensiblemente en tiempo empleado para los análisis.

Los diferentes tipos de hemoglobinas presentan en un campo eléctrico diversos grados de emigración en relación con su forma, tamaño y carga.

La carga neta eléctrica de una hemoglobina depende del pH de la solución de tampón en la que esta disuelta.

La ionicidad del tampón tiene una importancia básica en electroforesis, puesto que las soluciones de baja fuerza iónica permiten velocidades de migración más rápida y un bajo desprendimiento de calor, en la práctica se emplean soluciones de ionicidad comprendida entre 0.025 y 0.075 para el veronal y entre 0.12 y 0.03 para los tampones de "tris", son dos de los más conocidos.

Los tampones que se emplean más a menudo en sistemas discontinuos son los de veronal (Ac. barbitúrico) y de tris borato.

Un sistema continuo es aquel que usa el mismo tampón en la cubeta y en el medio de soporte (Acetato de celulosa, almidón, agar, agar-noble), mientras que en un discontinuo indica que el tampón empleado en la cubeta es distinto del tampón del medio de soporte.

Esta técnica es la seleccionada para realizar la investigación

experimental en este trabajo: Para ello es adecuado señalar lo más reelevante al respecto.

En general el procedimiento consiste en sumergir el medio; tal como agar-noble, en una solución amortiguadora adecuada que suele tener un pH de 8.6. Otros amortiguadores con pH distintos producen una emigración de las hemoglobinas diferentes, se toman muestras pequeñísimas que se colocan en la placa de agar-noble; cuyo extremo se introduce en la solución amortiguadora en la que están colocados los electrodos, se cierra la cámara para prevenir la evaporación y se aplica una corriente con un voltaje apropiado por un tiempo determinado, luego se extrae la placa; se tiñe, se fijan las fracciones y se aclara.

La Tabla 9.

Nos indica la identificación básica de un tipo de hemoglobina desconocida, se efectúa por comparación de las velocidades de migración (distancias recorridas) de los desconocidos en relación a controles de hemoglobina conocidos.

El término <<Hb rápida>> se refiere a aquella hemoglobina que migra anódicamente en relación a la HbA.

Están representadas en esta Tabla.

ELECTROFORESIS pH 8.6					Hb	pH 6.5	SOLUBILIDAD	OTRAS CARACTERISTICAS
+					A	+	NORMAL	—
					F		ALTA	ALCALI RESISTENTE
					S		DISMINUIDA	DREPANOCITOSIS
					C		ALTA	FORMACION INTRECELULAR DE CRISTALES
					D		HbO <sub>2</sub> DISMINUIDA Hb REDUCIDA N.	NO DREPANOCITOSIS
					E		—	—
					G		DISMINUIDA	—
					H		—	CUERPOS DE INCLUSION
					I		NORMAL	—
					J		—	—
					K		DISMINUIDA	—
					A <sup>2</sup>		NORMAL	—
					L <sub>1</sub> B		—	—
					L <sub>2</sub> B		—	—
					L		DISMINUIDA	—
					DUN- HAM		—	—
					GAL- VES- TONE		—	—

TABLA 9. DESPLAZAMIENTOS TEORICOS ELECTROFORETICOS DE DIFERENTES HEMOGLOBINAS (40).

#### IV. OBJETIVO GENERAL

Establecer en una muestra de humanos normales y anémicos del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las variantes electroforéticas de Hemoglobina (Hb) que presentan.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Montaje de la técnica electroforética para la separación de hemoglobinas, seleccionando el mejor soporte: Agar-Agar, Acetato de Celulosa, Papel y Agar-noble, de acuerdo a los recursos del laboratorio de la sección de análisis clínicos y patología; y de Bioquímica y Genética de la FES - CUATITLAN Campo 1.
2. Efectuar las pruebas hematológicas básicas, para clasificar las muestras de los pacientes en dos grupos: Testigo y Anémico.
3. Realizar la electroforesis en las muestras.
4. Detectar la frecuencia de hemoglobinas diferentes a las normales, debido a que la población de la Ciudad de México, desciende de diversas razas, fundamentalmente Hibridizada con Anglosajona, negra y que posee una carga genética diversa, con respecto a los genes que codifican a la hemoglobina en pacientes normales y anémicos.
5. Establecer estadísticamente las frecuencias de Hemoglobina (Hb), Hematocrito (Ht), Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH), para determinar si son pacientes Asintomáticos o presentan síntomas de anemia.

## V. METODOLOGIA

### V.1. Material Biológico

V.1.a. Se obtuvieron muestras (10 ml) de sangre venosa con EDTA de 181 humanos adultos de ambos sexos, que acudieron al Centro Medico la Raza y Clinica No.29 del IMSS con cuadro clinico indefinido.

V.1.b. Las muestras se trasladaron en refrigeración inmediatamente al laboratorio de Analisis Clínicos (FES-CUAUTITLAN) Campo 1.

### V.2. Procedimientos

A la sangre se le realizaron las siguientes pruebas Hematologicas

#### V.2.a. HEMATOCRITO (Ht) (22)

Fundamento: Se basa en la separación de los glóbulos rojos y el plasma cuando se centrifuga la sangre, a una velocidad constante y durante un periodo de tiempo constante. Se mide la separación que se reporta en porcentaje (%).

#### V.2.b. HEMOGLOBINA (Hb) (22)

Fundamento: La Hemoglobina reacciona con el Ferricianuro y forma Metahemoglobina, la cual con el cianuro

de potasio forma la Cianometahemoglobina, las soluciones de este compuesto son relativamente estables, conservadas en el refrigerador, duran hasta 3 años.

V.2.c. CUENTAS DE LEUCOCITOS Y ERITROCITOS (22)

Fundamento: Las muestras se diluyen con líquidos adecuados (Türk y Gowers) y se cuentan en la celda de una cámara (Hematímetro) cuya capacidad se conoce. En los valores normales no hay mucha variación en hombres como en mujeres.

V.2.d. CUENTA DIFERENCIAL (22)

Fundamento: Una extensión delgada de sangre en un porta objetos se tiñe, después se observa con el microscopio y se cuentan las distintas variedades que hay en 100 leucocitos.

V.2.e. CONCENTRACION CORPUSCULAR MEDIA DE HEMOGLOBINA (CCMH) (22)

Fundamento: Es la concentración media de hemoglobina por 100 ml. de hematíes concentrados en porcentaje (%).

V.2.f. HEMATÍES O GLOBULOS ROJOS (22)

Fundamento: La valoración de la hemoglobina y de los hematíes tiene un valor relativo si no se tiene en cuenta la masa de sangre existente en el

cuerpo de un paciente (volemia).

V.2.g. ELECTROFORESIS (46)

Es el desplazamiento de las partículas coloidales en un campo eléctrico.

Cuando se coloca una solución coloidal cuyas micelas llevan una carga eléctrica, en un tubo en "U", cuyas ramas están conectadas por medio de electrodos a los polos de un generador de corriente eléctrica, se comprueba que al pasar la corriente, tiene lugar el desplazamiento mutuo de las micelas, partículas coloidales, y del medio dispersivo que las baña; las micelas son atraídas hacia el electrodo de signo contrario al suyo.

V.2.h. ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINA (46)

Fundamento: La identificación básica de un tipo de hemoglobina desconocido se efectúa por comparación de las velocidades de migración (distancias recorridas) de los desconocidos en relación a controles de hemoglobina conocidos.

Técnica: Se desarrolla por el método de Smithies (44) con algunas modificaciones.

Reactivos: Amortiguador Veronal Sodico pH 8.6 y fuerza ionica 0.075 M (Sol.1)

Colorante: Rojo de Ponceau S al 0.2% (Sol.2)

Decolorante: Acido Acetico Glacial 5% (Sol.3)

Fijador: 10% Glicerina, Acido Acetico Glacial  
5%, Alcohol Isopropilico al 70%  
(Sol.4)

Lavador: Acido Acetico 5%

Equipo: Cámara Electroforetica (Gelman, Instruments  
Company, Cámara horizontal)

Semiaplicador de 50 microlitros

Fuente de Poder (Gelman, Instruments Company,  
Modelo 38206)

Placa de Vidrio

**Procedimiento:**

1. Se preparan las placas de agar-noble 1g por 100 ml de amortiguador.  
Se calienta el amortiguador para disolver el agar-noble, hasta que se tenga una solución clara, se enfria a una temperatura de 45°C, se vierte en las placas de vidrio previamente desengrasadas, se marca la zona de aplicación de muestra.
2. Colocar las placas en la cámara electroforetica por lo menos 10 min., con ayuda de dos tiras de papel filtro para tener contacto con el amortiguador de veronal sodico.
3. Se aplican las muestras hemolizadas, primero la de un Testigo junto a ella la de los pacientes, la finalidad de correr la muestra problema (paciente). Junto con un Testigo, radica en

comparar que tan lenta corre electroforéticamente la fracción de Hemoglobina.

4. Se ponen las condiciones de trabajo de la cámara electroforética con la ayuda de la fuente de poder a un voltaje de 250 Volts y un amperaje de 25 - 35 microamper por un tiempo de 4 horas.
5. Terminada la operación se deja enfriar la cámara y se retiran las placas; después se colorea por 5 min. con rojo de Ponceau.
6. Las placas se sumergen en un fijador (Sol.4) y después se decoloran, en varios baños de ácido acético glacial al 5%.
7. Una vez terminada la decoloración las placas se sumergen en agua destilada durante 30 segundos y se coloca en otra placa de vidrio eliminando las burbujas de aire, y se llevan a una estufa hasta que el agar seque y que deje observar las bandas o manchas de posibles Hemoglobinas.

Los resultados se presentan a continuación.

## RESULTADOS

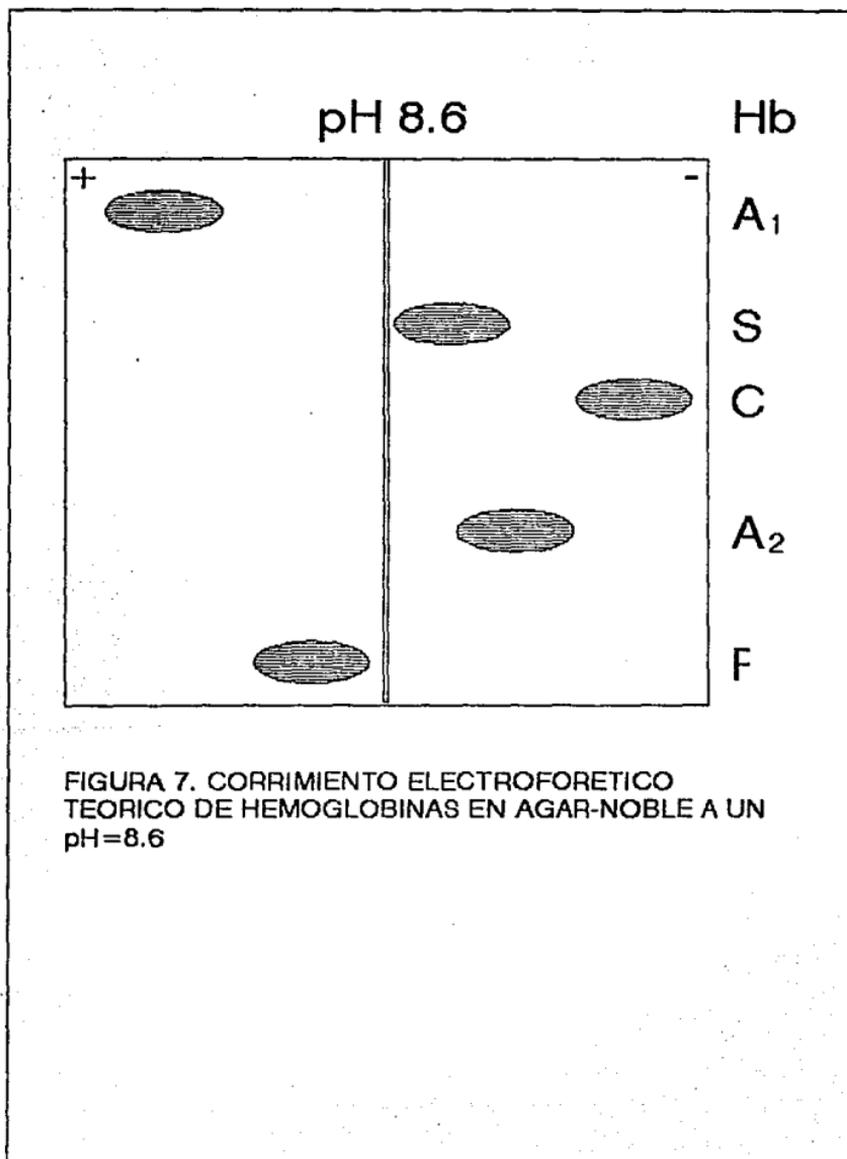
De los 181 pacientes estudiados durante 6 meses, 17 presentaron signos y síntomas de ANEMIA al ingresar al Hospital.

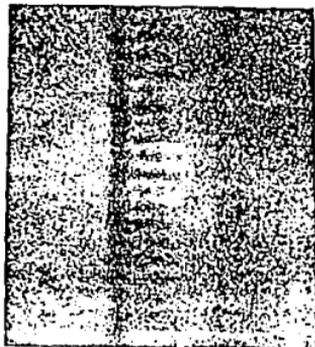
De estos:

4 son Hombres

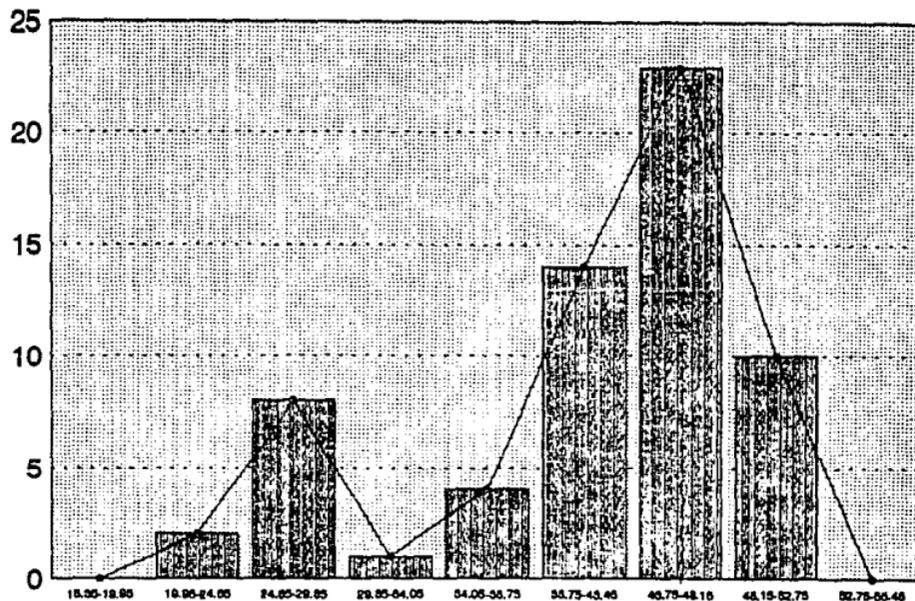
13 son Mujeres

PRUEBAS HEMATOLOGICAS					
	HEMOGLOBINA (g/100ml DE SANGRE)	HEMATOCRITO %	CCMH %	SERIE BLANCA (No. DE LEUCOCITOS 1.0 mm <sup>3</sup> DE SANGRE)	DESPLAZAMIENTO ELECTROFORETICO
HOMBRES	6.5	21	32	2300	CATODO (-)
	6.3	20	31	3100	CATODO (-)
	8.5	27	32	2600	CATODO (-)
	14.7	43	34	9000	CATODO (-)
MUJERES	12.5	41	30	8500	CATODO (-)
	8.5	31	28	6700	CATODO (-)
	12.9	40	32	5900	CATODO (-)
	12.2	38	32	5600	CATODO (-)
	14.6	45	33	11200	CATODO (-)
	8.9	32	28	5000	CATODO (-)
	12.4	37	33	10400	CATODO (-)
	7.1	24	30	5600	CATODO (-)
	13.7	42	33	8200	CATODO (-)
	7.6	25	31	15400	CATODO (-)
	11.4	33	34	5200	CATODO (-)
	4.6	14	-	7000	CATODO (-)
	11.0	36	31	8200	CATODO (-)



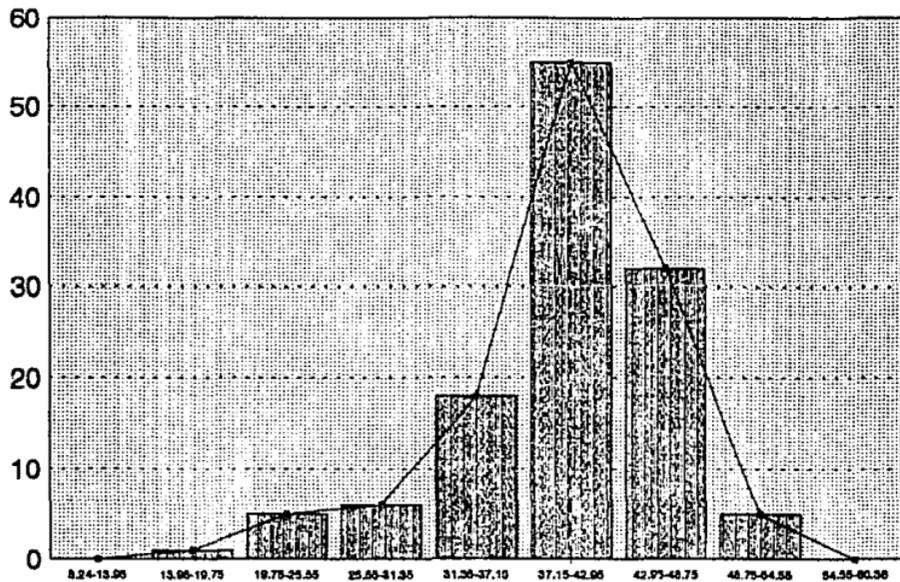


**CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS MUESTRAS  
ESTUDIADAS EN AGAR-NOBLE A  $\text{pH}=8.6$**



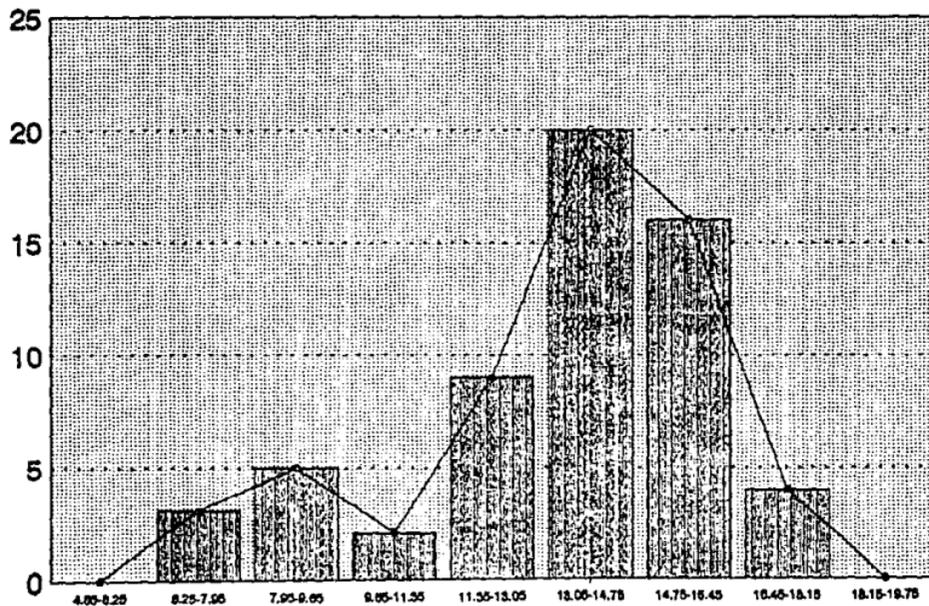
Ht ml/100

GRAFICA (a)  
 HISTOGRAMA (PROMEDIO DE Ht EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS EN HOMBRES).



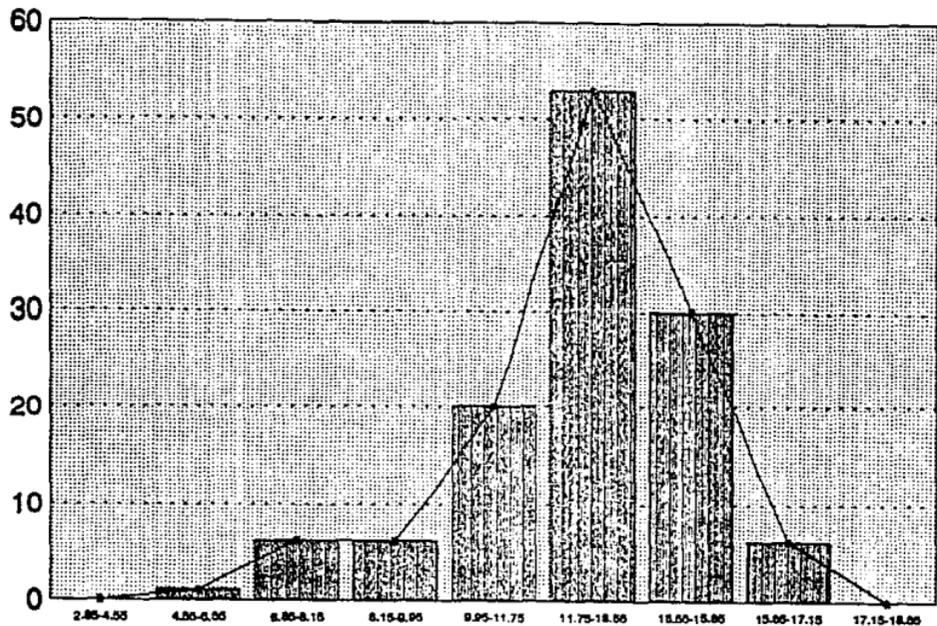
Ht ml/100

GRAFICA (b)  
 HISTOGRAMA (PROMEDIO DE Ht EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS EN MUJERES)



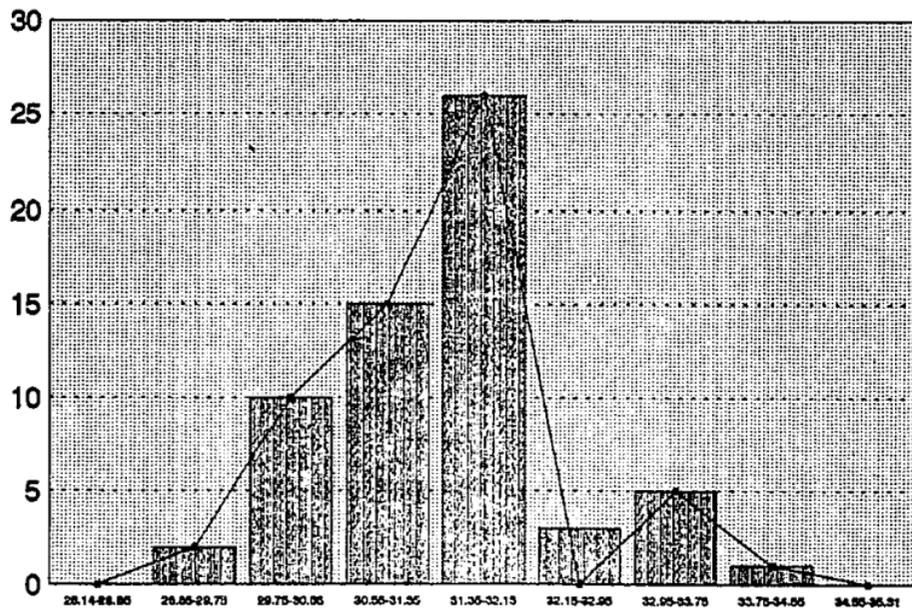
Hb g/100 ml DE SANGRE

GRAFICA (c)  
HISTOGRAMA (PROMEDIO DE Hb EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS EN HOMBRES)



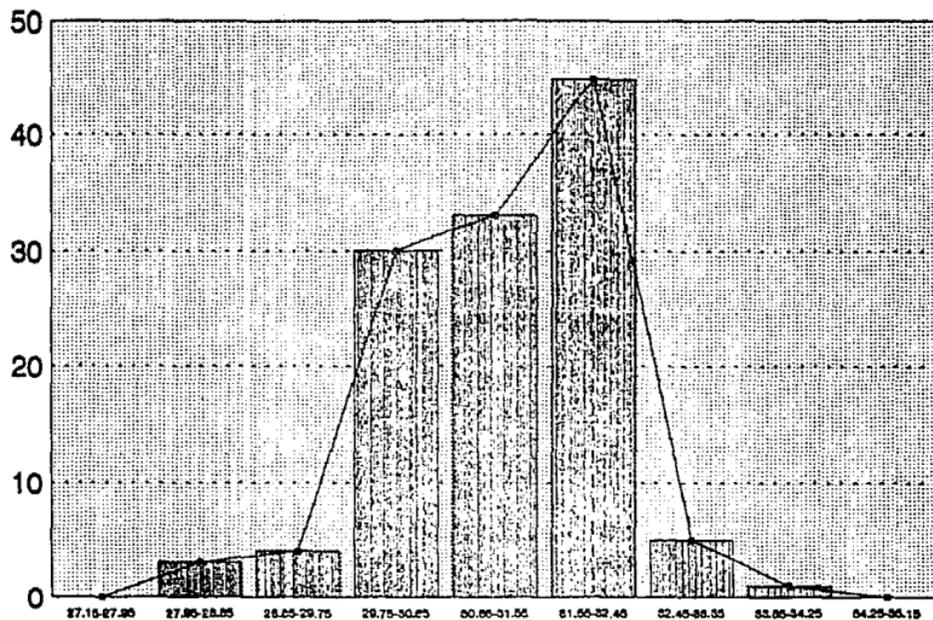
Hb g/100 ml DE SANGRE

GRAFICA (d)  
HISTOGRAMA (PROMEDIO DE Hb EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS EN MUJERES)



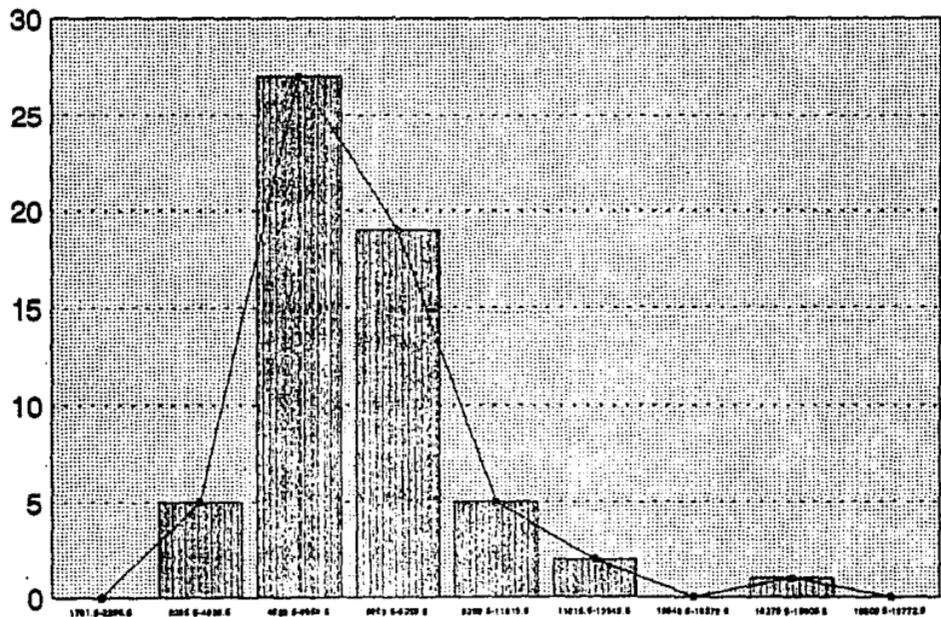
CCMH %

GRAFICA (e)  
 HISTOGRAMA (PROMEDIO DE CCMH EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS EN HOMBRES)



CCMH %

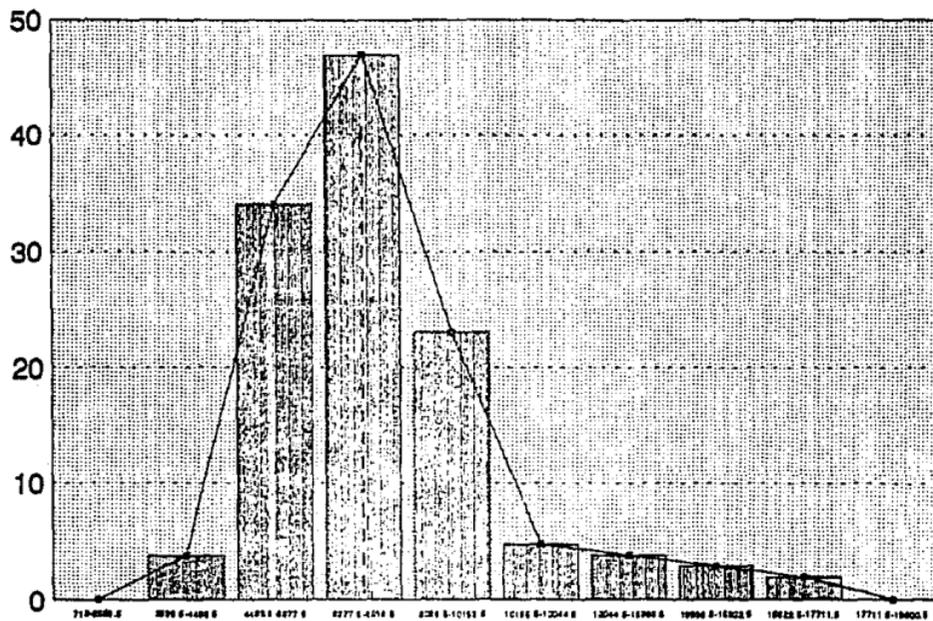
GRAFICA (f)  
 HISTOGRAMA (PROMEDIO DE CCMH EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS EN MUJERES)



No. DE LEUCOCITOS/ml DE SANGRE

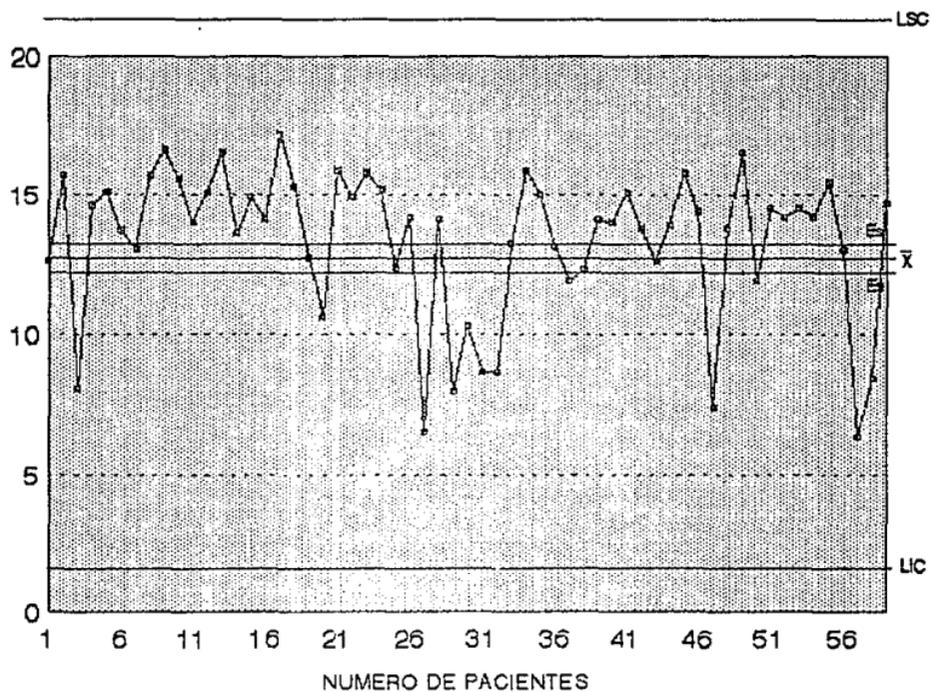
GRAFICA (g)

HISTOGRAMA (PROMEDIO DE SERIE BLANCA EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS EN HOMBRES)

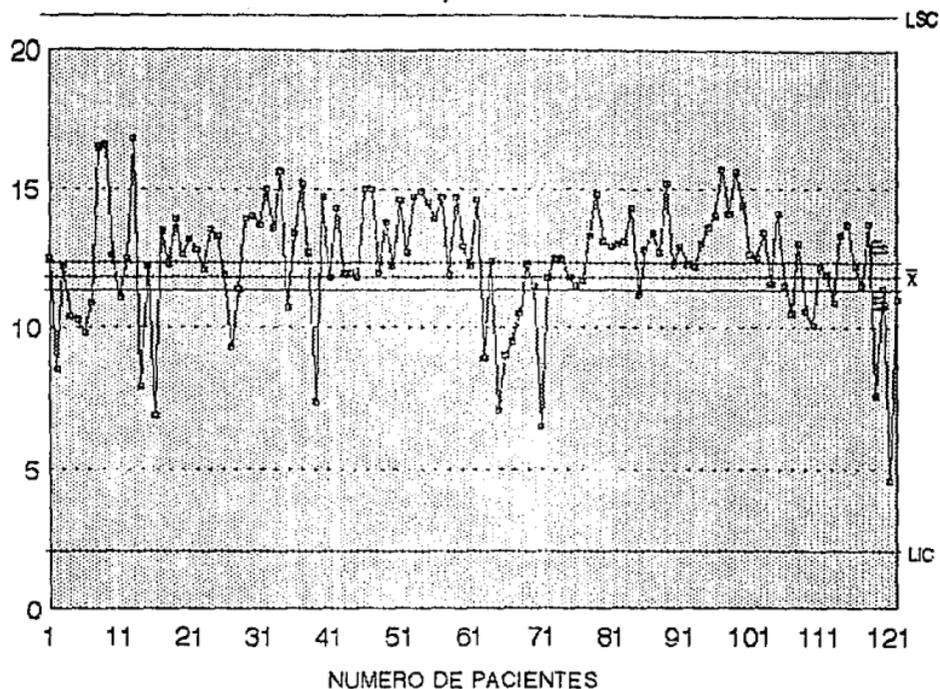


No. DE LEUCOCITOS/mi DE SANGRE

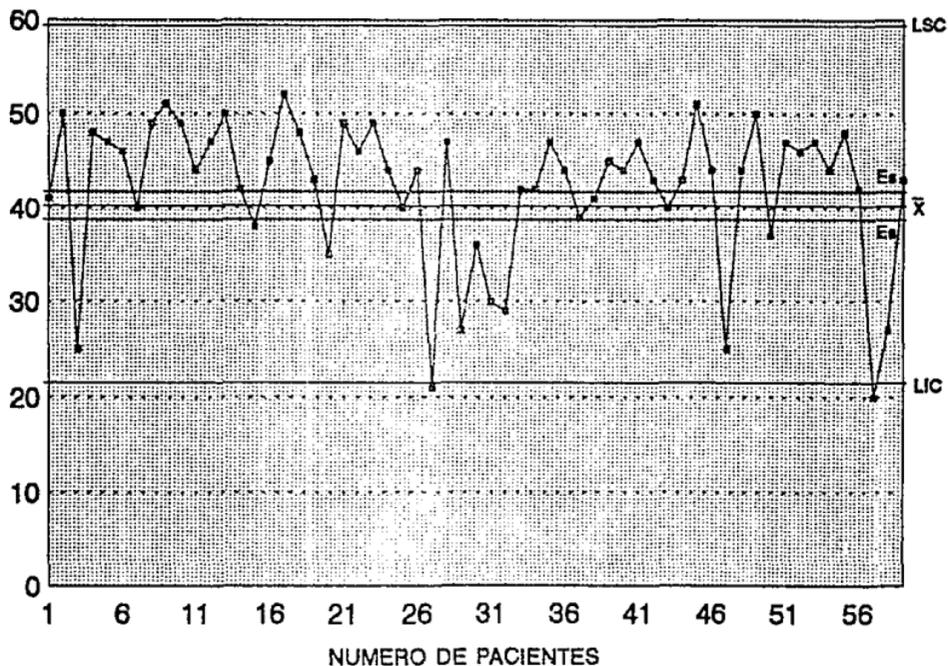
GRAFICA (h)  
 HISTOGRAMA (PROMEDIO DE SERIE BLANCA EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS EN MUJERES)



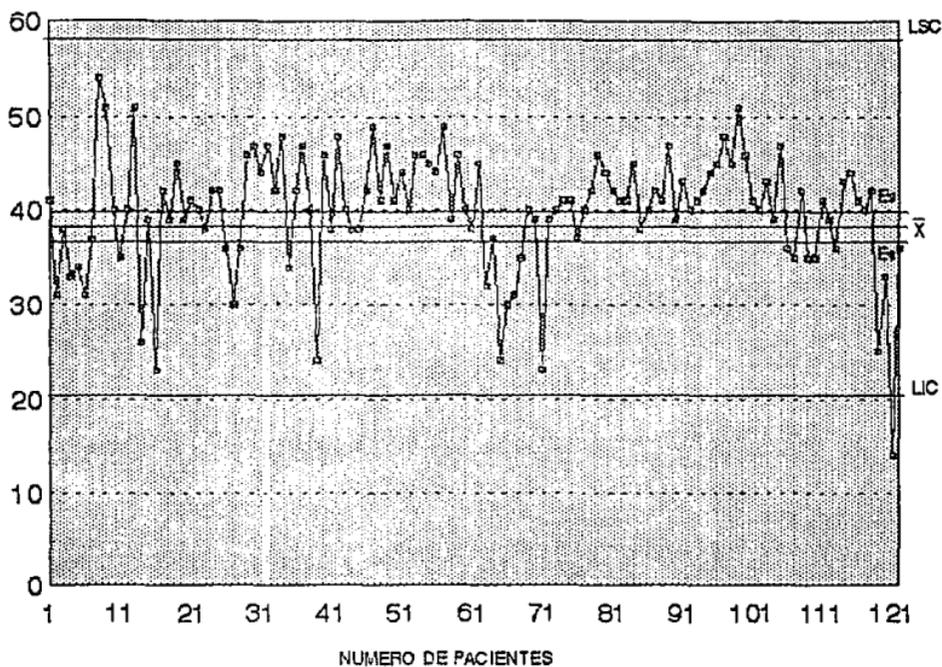
GRAFICA DE CONTROL  
INTERVALO DE CONFIANZA DE LA MUESTRA DE PACIENTES, 59 HOMBRES (Hb g/100 ml)



GRAFICA DE CONTROL  
INTERVALO DE CONFIANZA DE LA MUESTRA DE PACIENTES, 122 MUJERES (Hb g/100 ml)



GRAFICA DE CONTROL  
 INTERVALO DE CONFIANZA DE LA MUESTRA DE PACIENTES, 59 HOMBRES (Ht ml/100)



GRAFICA DE CONTROL  
INTERVALO DE CONFIANZA DE LA MUESTRA DE PACIENTES, 122 MUJERES (Ht ml/100)

## DISCUSION

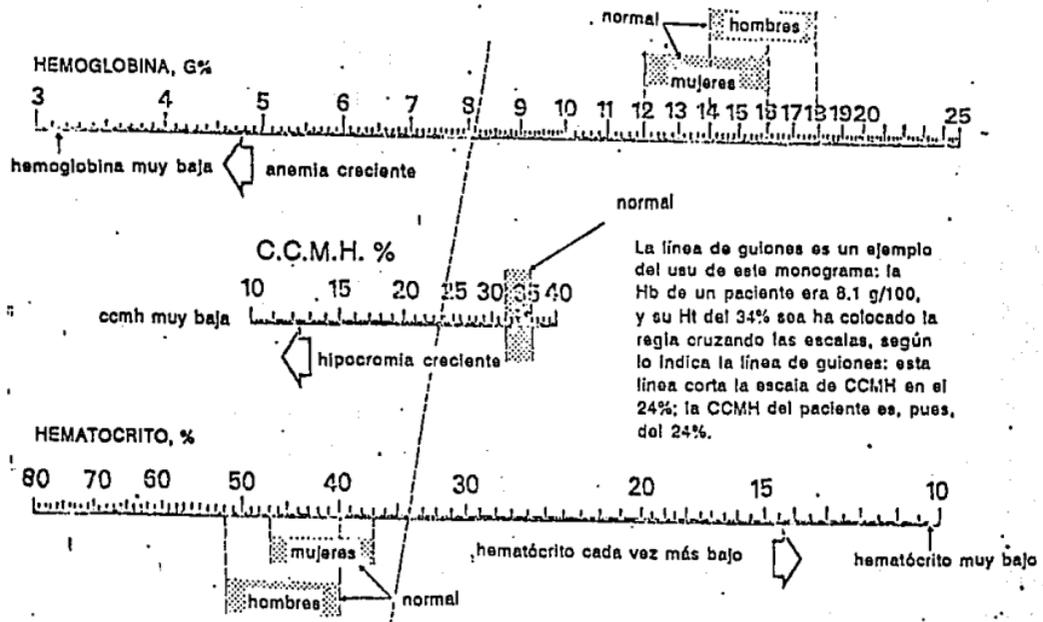
En base a los resultados obtenidos en este trabajo, consideramos que de 181 pacientes muestreados en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de los cuales 59 son Hombres y 122 Mujeres; presentaron manifestaciones anémicas 17, considerando 4 hombres y 13 mujeres; señalamos que el 6.77% de hombres analizados presentaban Anemia y el 10.65% de mujeres tenían este cuadro.

Como podemos apreciar la incidencia de anemia en mujeres es mayor que en hombres en un 3.28%, es importante señalar que se muestreo a aquellos pacientes que llegaban a la clínica aleatoriamente con el cuadro clínico de anemia (el periodo de tiempo fue de 6 meses).

Consideramos hipotético que la presencia de hemoglobinas anormales desde el punto de vista molecular, particularmente detectadas por electroforesis de zona, en un soporte de agar-noble a pH 8.6 en un buffer de tris barbital.

Las muestras fueron utilizadas además para realizarles un estudio hematológico discreto constituido por hematocrito (Ht), hemoglobina (Hb), concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) que nos proporciona un diagnóstico de anemia, como se observa en el monograma.

En las gráficas (a) y (b) podemos apreciar que el valor promedio de hematocrito (Ht) en hombres corresponde a 45.8%, en mujeres correspondió a 40.05%. Como era de esperarse y con base a la información reportada con respecto a hematocrito en hombres y



MONOGRAMA PARA CCMH

mujeres se encuentran en un rango normal.

Presentándose un rango de variación de hematocrito (Ht) en hombres normales de 47 a 55 ml/100 y en anémicos de 41.52 a 42.33 ml/100. Para mujeres apreciamos un rango de variación que va de 42 a 48 ml/100 y en anémicas de 39.42 a 40.53 ml/100.

Para conocer el parámetro de concentración de hemoglobina (Hb), podemos decir que de las gráficas (c) y (d), en mujeres se tiene un promedio de 12.65 g/100 ml y en hombres de 13.9 g/100 ml, igualmente establecemos que estos resultados caen en el rango teórico; sin embargo se considera adecuado señalar que en pacientes anémicos se registro para hombres 13.22 a 13.51 g/100 ml y en mujeres anémicas 12.30 a 12.68 g/100 ml, de tal manera que este parámetro hematológico evidencia que dichos sujetos padezcan la anemia señalada.

En cuanto a la concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) en las gráficas (e) y (f) obtuvimos un valor promedio de 31.75% en hombres y 32% en mujeres, apreciándose éstos resultados los cuales estan dentro del rango normal.

Con respecto a los leucocitos presentes por ml de sangre apreciamos que las gráficas (g) y (h) en hombres 7176 cél/mm<sup>3</sup> y en mujeres 7322 cél/mm<sup>3</sup>, indicadores ubicados dentro del rango normal (el rango normal en hombres y mujeres es de 5000 a 10,000 cél/mm<sup>3</sup>).

Y en cuanto a la serie roja y eritrocitos de los parámetros que trabajamos, apreciamos significativamente importante que el hematocrito (Ht) tenia disminución con respecto a normales. Partiendo de esto esperamos registrar alguna alteración con respecto a las hemoglobinas desde un punto electroforético, ya sea

la presencia de alguna hemoglobina anormal causante de la patología (Hemoglobinopatía). Los resultados electroforéticos muestran que para todas las muestras sin distinción de sexo o estado de salud, la hemoglobina (Hb) migra al cátodo (-) en condiciones de 250 volts, intensidad de corriente de 25 - 35 microamper por un tiempo de 4 horas, un pH de 8.6 y el buffer veronal sódico de las 181 muestras, 17 eran de pacientes anémicos (4 hombres y 13 mujeres) considerándose "anormal" el hecho, se desplazaban dejando un "barrido", que no correspondía a una variante molecular, sino algún efecto provocado por la anemia.

Evidentemente con los resultados mostrados, podemos decir que:

a) los estudios alternos de hematocrito (Ht), hemoglobina (Hb), concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) y conteo leucocitario mostrarán la variación normal en pacientes aparentemente sanos según el sexo, evidenciándose, hematocrito (Ht) y hemoglobina (Hb) como buenos marcadores en el diagnóstico de Anemia.

b) en relación al lote trabajado se manifiesta que hablar de Anemia no implica una variación molecular de la hemoglobina (Hb) pero si de su concentración y del hematocrito (Ht).

c) las hemoglobinas anormales se presentaron en pacientes con el cuadro clínico de Anemia en 9%. Siendo 7% de mujeres y 2.2% de hombres total de muestras y que por lo tanto una hemoglobinopatía puede ser la causa de esta enfermedad.

El presente trabajo nos lleva a considerar para el futuro, que deben tomarse en cuenta lotes mayores de estudio por la baja prevalencia de hemoglobinas anormales en la población en general,

que probablemente es mucho mayor en población anémica ya que la condición genética puede influir.

## CONCLUSIONES

Se encontró que para el corrimiento electroforético el soporte más adecuado fué el Agar Noble por su resolución al mejor corrimiento de Hemoglobinas en condiciones óptimas, desplazándose 1cm a 250 volts a pH 8.6.

Se corroboró que Hematocrito (Ht), Hemoglobina (Hb) y Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH) son pruebas hematológicas específicas para diagnóstico de Anemia y que de acuerdo a ellas el lote de humanos trabajados pudo clasificarse en Anémicos y Normales.

La incidencia de hemoglobinas anormales en la población clínica de la zona metropolitana estudiada fué baja; evidenciándose que son portadores de Hemoglobina Normal la mayor parte y aún cuando la procedencia y los antecedentes genéticos fuerón variables.

En pacientes anémicos, la causa o factor determinante de este cuadro clínico, no fue la Hemoglobina (Hb) desde el punto de vista de variante molecular, debido a que no presentó separación de hemoglobinas anormales.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Adachi K. Surface hydrophobicity of hemoglobins A, F and S determined by gel filtration column chromatography in high phosphate buffer. *Biochim Biophys Acta* 912: 139: 1987.
2. Adachi K. Kim J. Travitz R. Harano T. Asakura T. "Effect of aminoacid at the  $\alpha$  position on surface hydrophobicity, stability, solubility and the kinetics of polymerization of hemoglobin". *J. Biol. Chem.* 262: 12920. 1987.
3. Alberto Echavaria R.; Consuelo Molina V., Gloria Zuñiga C.: Hemoglobina México en una familia Colombiana. *Sangre*, 18: 277, 1973.
4. Alloisio-N; Michelon-D; Bannier-E, Revol-A; Beyzard-Y; Delaunay-J. Alterations of red cell membrane proteins and hemoglobin under natural and experimental oxidant stress. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1982., Vol. 691, No.2, pp.300-308.
5. Anionwu-EN; Patel-N; Kanji-G; Renges-H; Brozovic-M. Counselling for prenatal diagnosis of sickle cell disease and beta thalassaemia major: A four year experience. *J. Med. Genet.* 1988. Vol.25, No.11, pp.769-772.
6. Aviles Ramos Jose Marcelino, 1983. Hemoglobinas Anormales. Tesis de Licenciatura de Q.F.B., V.11.

7. Bank-A. DNA and RNA Defects in beta super (+) and beta super (o) Thalassemias. Rep. Biol. Med., 1980., Vol.40; pp.343-354.
8. Basset P. Beuzard. Y. Garel M. C. Rosa. "Isoelectric focusing of human hemoglobin its application to screening, characterization of 70 variants and to the study of modified fractions of normal hemoglobin. Blood 51; 971. 1978.
9. Benesch R. E, Edalji R. Kwong S. "Solubilization of hemoglobin S by other hemoglobins" Proc. Natl. Sci. USA:77; 5130, 1980.
10. Brent-L; Rayfield-LS; Modell-B. beta talassemia: An immunologic the rapy?. Transplant. Proc., 1982., Vol.14, No.3, pp.538-540.
11. Cañizares-Proaño, C. y Varela Torres, C. : Hemoglobina UNAM. Una nueva hemoglobina anormal. I. Estudio de identificación. Bol. Inst. Est. Biol. Méx. 23: 75, 1985.
12. Clemente Celedonio Meza Coria. "Estudios de laboratorio en pacientes con anemia de células falciformes. Año: 1985. V.194.
13. Cohen-AR; Trotzky-MS; Pincus-D. Reassessment of the Microcytic Anemia of Lead Poisoning. Pediatrics., 1981., Vol.67, No.6, pp. 904-906.
14. Diccionario Enciclopédico Quillet, Tomo tercero, Editorial Cumbre, S. A, México, D. F.

15. dePablos-clegg-JB. HbF-Granada or sub (alpha 2) G sub (gamma 2) 22(B4) Asp arrow right Val: A new human fetal hemoglobin variant. Hemoglobin. 1988. Vol.12, No.4, pp.405-407.
16. Driscoll-MC; Lerner-N; Anyane Yeboa-K; Maidman-J; Warburton-D; Schaefer-Rego-K; Hsu-R; Ince-C; Malin-J; etal. Prenatal diagnosis of sickle hemoglobinopathies: The experience of the Columbia University Comprehensive Center for Sickle Cell Disease. AM. J. Hum. Genet. 1987. Vol.40, No.6, pp.548-558.
17. Drivas-G; Kafezas-J; Kalos-A; Theodoropoulos-G; Theodoropoulos-G; Melissinos-K. RES phagocytosis in beta- thalassemia and sickle cell anemia. Acta Haematol., 1983., Vol.69, No.3, pp.213-214.
18. Federico Ciscar Rios. Pedro Farreras Valente.: Diagnostico Hematologico. Laboratorio y Clínica. Editorial Jim, Tercera Edición, Barcelona, 1972.
19. Guillermo Ruiz Reyes.: Hemoglobinas Anormales y Talasemia en México; Sangre.18: 333, 1973.
20. Girad F. Kister J. Bohn. B. Poyart C; Functional properties of hemoglobin in human red cells. Respir physiol 68; 277, 1987.
21. H. Lehman, Hunstman, Man"s.: Hemoglobins including the hemoglobinopathies and their investigation; Editorial North

- Hollands Publishing Company-Amsterdam, 1968.
22. Instituto Mexicano del Seguro Social. Subdirección General Médica, Manual de Procedimientos. Laboratorio Clínico. México, 1974.
  23. International hemoglobin information center. Hemoglobin 12; 207. 1988.
  24. Jones, R.; Brimhall, B., y Lisker, R.: Chemical characterization of hemoglobin México and hemoglobin Chiapas. Biochem. Biophys. Acta 154: 468, 1968.
  25. Kanamaru-A; Hara-H; Nagai-K. Hemopoietic stem cells and their regulatory factors in aplastic anemia. Acta Haematol. Jap., 1981., Vol.44, No.7, pp.1332-1340.
  26. Knowles-W; Marchesi-SL; Marchesi-VT. Spectrin: Structure, function, and abnormalities. Semin. Hematol., 1983., Vol.20, No.3, pp.159-174.
  27. Kojima-S; Matsuyama-K; Ishii-E. High serum iron in human parvovirus-induced aplastic crisis in iron deficiency anemia. Acta Haematol. 1988. Vol.80, No.3. pp.171-172.
  28. Krauss-JS; Hahn-DA, Harper-D; Shell-S; Baisden\_CR. The affinity glyceted hemoglobin in a family with hereditary spherocytosis

and in other non-hemoglobinopathic hemolytic anemias. Ann. Clin. Lab. Sci. 1987. Vol.17, No.5, pp.331-338.

29. Lisker, R.: Estudios sobre algunas características hematológicas hereditarias en la población Mexicana. II. Hemoglobinas Anormales en 7 grupos indígenas y algunos mestizos. Gaceta Médica de México. 93: 289, 1983.
30. Lisker, R.; Loria, A., y Ruiz Reyes, G.: Frecuencia de Hemoglobinas Anormales en México. Proc. IX Congr. Int. Soc. Hemat. 1982.
31. Mazo-E; Fernandez-J; Roncha-E; Zubizarreta-A. Red Cell Membrane Proteins in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Autoimmune Hemolytic Anemias, Megaloblastic Anemia and Aplastic Anemia. Bordeaux Med., 1981., Vol.14, No.15, pp.983-988.
32. Ochoa Rojo: Hematología Basica, Editada por la Asociación de Bioquímica Clínica, Julio, 1982.
33. Olivia Lopez Santos, 1986. Estudio diferencial de las Hemoglobinopatias. Tesis de Licenciatura de QFB, Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán", Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
34. P. Farreras Rozman, Medicina Interna Tomo II, Editorial Marin, S. A., 1978. México.

35. Perutz MF, Michison JM: State of haemoglobin in sickle cell anaemia. *Nature*. 166; 677. 1950.
36. Petz-LD. Autoimmune hemolytic anemia. *Hum. Pathol.*, 1983., Vol.14, No.3, pp.251-255.
37. Ruiz Reyes, G; Ibarra Oropeza, S; y Suárez Puerto, A.: Talasemia. Observaciones en una familia. *Medicina (México)*, 42: 145, 1962.
38. Ruiz Reyes, G; Ramírez Zorrilla, M. J; Díaz Carrasco, R. M; García, B, e Ibarra Oropeza, S.: Investigación de hemoglobinas anormales y elevación de Hemoglobina Az e isoenzimas de anhidrasa carbónica eritrocítica en Población Hospitalaria de Puebla. *Gaceta Medica de México*, Vol.105, No.2 Febrero, pp.167-171: 1973.
39. Ruiz-Reyes-G; Ruiz-Arenas-R; Lepe-Zuñiga-JL; Ruiz-Arguelles-A; De-Ruiz-NL; Marin-Lopez-A. Laser Nephelometry Quantitation of Fibrinogen Related Antigens. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1981., Vol.76, No.3, pp.284-288.
40. Samuel I. Rapaport.: *Introducción a la Hematología*. Editorial Salvat. Primera Edición, Barcelona 1981.
41. Sathapatayavongs-B; Leelachaikul-P; Prachaktam-R; Atichartakarn-V; SriphoJanart-S; Trairatvorakul-P;

- Jirasiritham-S; Nontasut-S; Eurvilaichit-C, Flegel-T. Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. *J. Infect. Dis.* 1989. Vol.159, No.2, pp.274-280.
42. Schneider RG, Barwick RC: Electrophoretic mobilities of mutant hemoglobins and mutant globin chains, in CRC Hand book series in clinical laboratory Science. Section I; Hematology Vol.IV, CRC, 1986.
43. Shapiro-Harrison-Walton: Manejo Clínico de los gases sanguíneos. Editorial Médica-Panamericana Tercera Edición, México 1984.
44. Smithies, O.: An improved procedure of electrophoresis: Further variation in the serum proteins of normal individuals. *Bioch. j.* 61: 829 - 841, 1959.
45. Special Feature. Hemoglobin in variants in México. *Hemoglobin* 7 (6) 602, 1983.
46. St. Nerenberg, M. D. Ph. D.: Electroforesis, Manual práctico de laboratorio. Editorial Jims, 1968.
47. Terasawa-T; Porter-PN; Ogawa-M. Composition of gamma-Chains in the Hemolysates of an Umbilical Cord Blood and Erythropoietic Burts from Carriers for Hemoglobin-F Malta-I (G gamma 117, His arrow right Arg). *Blood.*, 1981., Vol.57, No.6, pp.1111-1116.

48. Tood-D.: *Thalassemia. Pathology.*, 1984., Vol.16, No.1, pp.5-15.
49. Tood-Sanford.: *Diagnóstico clínico por el laboratorio.* Salvat Editores, S. A., Sexta Edición, Barcelona (España), 1979.
50. Van-Houte-DPF; Van-Den-Ende-A; Statius-Van-Eps-LW; Giordano-FC; Bernini-LF. *Haemoglobin G Georgia in a Turkish family in the Netherlands.* *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 1986., Vol.130, No.8, pp.360-363.
51. Virgie Fairbanks.: *Hemoglobinopathies an Thalasemias. Laboratory Methods and Clinical.* Prianc. Decker a division of theme-stratton in New York, 1984.
52. William J. Williams.: *Hematología Tomo I y II.*, Editorial Salvat, Segunda Edición, 1983.
53. Wolf-MW; Roelcke-D. *Incomplete warm hemolysins. II. Corresponding antigens an pathogenetic mechanisms in autoimmune hemolytic anemias induced by incomplete warm hemolysins.* *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1989. Vol.51, No.1, pp.68-76.
54. Zaráin García, A.; Díaz Carrasco, R. M.; Pereira, O.; y Ruiz Reyes, G.: *Hemoglobina S-Talasemia Beta. Estudio de un caso.* *Medicina. México* 51: 567, 1971.

55. Zeng-Yitao; Huang-ShuZhen; Ren-ZhaoRui; Li-HouJun.

Identification of HbD-Punjab gene: Application of abnormal hemoglobins. Am. J. Hum. Genet. 1989. Vol.44, No.6, pp.886-889.