

CLAUDIO CAÑIZARES PROAÑO*

**LAS HEMOGLOBINAS
HUMANAS
LA HEMOGLOBINA
UNAM.**

**I. METODOS
DE LABORATORIO**

LAS ALTERACIONES caracterizadas por la presencia de una hemoglobina anormal han adquirido importancia en los últimos años. Conocer este tipo de problemas ya no es sólo incumbencia del especialista, sino también del médico general. Los que practican la clínica no hematológica desconocen en mucho este tipo de problemas médicos. Las alteraciones de la estructura química de la hemoglobina están ligadas frecuentemente con la anemia o la cianosis.

En México se han descrito hasta la fecha dos hemoglobinopatías. La primera, estudiada por *Lisker* y colaboradores, en el Instituto de Enfermedades de la Nutrición, consiste en una hemoglobinopatía debida a la presencia de una hemoglobina anormal llamada México. Esta hemoglobina presenta una movilidad mayor que la normal (hemoglobina A) en la electroforesis. Fue encontrada por medio de un estudio de población en una familia indígena del estado de Puebla. Su presencia no causaba síntoma alguno²⁶.

La segunda fue encontrada por nosotros y la llamamos hemoglobina UNAM. Fue estudiada en una familia mestiza mexicana. Esta hemoglobina tiene una movilidad menor que la normal (hemoglobina A) en la electroforesis. La presencia de la hemoglobinopatía UNAM. ha sido causa de que algunos de los miembros de la familia afectada presenten crisis de anemia hemolítica⁴.

* Investigador. Instituto de Estudios Médicos y Biológicos.
Hematólogo. Sanatorio de la Secretaría de Hacienda y Crédito Público.

CARACTERÍSTICAS NORMALES

La hemoglobina está formada por dos hemimoléculas exactamente iguales entre sí. Cada una de las hemimoléculas tiene una parte proteínica o globina y una parte porfirínica o hem. La parte globínica es la que puede cambiar, dando lo que se llama una hemoglobina anormal.

La parte proteica o globina de la hemimolécula está formada por dos cadenas diferentes de aminoácidos. A cada una de estas cadenas va unido un núcleo porfirínico o hem.

Cada núcleo porfirínico se forma a base de cuatro núcleos pirróticos y lleva un átomo de hierro, el cual tiene libres dos valencias que sirven para unirse con la parte proteica por un lado y con el oxígeno por el otro.

Resumiendo, podemos decir que la molécula de la hemoglobina tiene cuatro cadenas proteicas y cuatro núcleos porfirínicos repartidos en dos hemimoléculas idénticas entre sí.

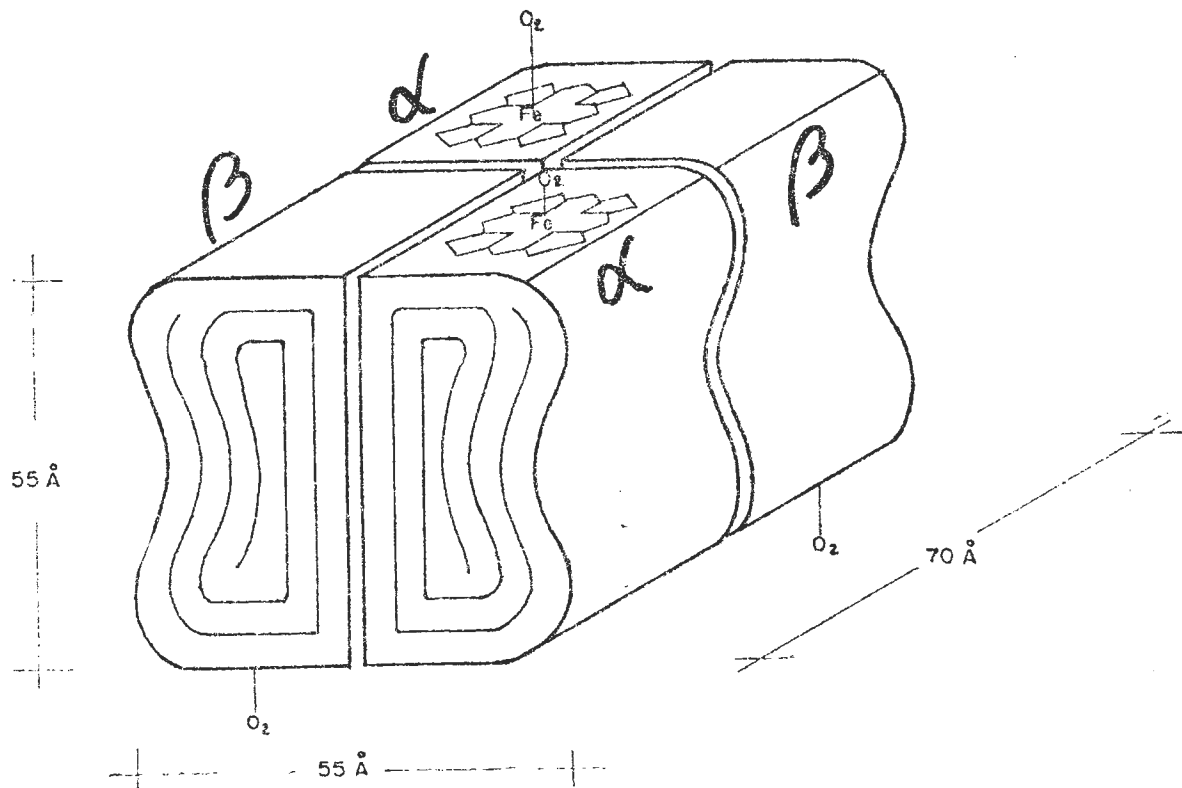


Figura 1

Esquema tridimensional de la estructura de la hemoglobina humana.

En cualquier persona sana existen normalmente tres tipos de hemoglobinas diferentes entre sí, por tener diferentes partes globínicas. Estas hemoglobinas son llamadas A, F y A₂.

La hemoglobina A es la principal de todas y constituye después del nacimiento el 97 por ciento del total. No existe durante la vida fetal.

La hemoglobina F representa después del nacimiento el 2 por ciento, aunque durante la vida fetal es la única presente.

La hemoglobina A₂ existe únicamente después del nacimiento y constituye el 1 por ciento del total.

Cada una de estas hemoglobinas se presenta normalmente en el ser humano en las proporciones citadas. Hemos dicho que se diferencian entre sí por tener distintas partes globínicas; por tanto, tienen diferentes tipos de cadenas proteicas.

La hemoglobina A tiene dos cadenas α y dos cadenas β .

La hemoglobina F tiene dos cadenas α y dos cadenas γ .

La hemoglobina A₂ tiene dos cadenas α y dos cadenas δ .

Las cadenas proteicas están formadas por aminoácidos arreglados en una secuencia lineal. La secuencia de aminoácidos es distinta para cada una de las diferentes cadenas.

El hecho de que estas tres hemoglobinas normales sean de diferente estructura proteica hace que tengan también distinto comportamiento bioquímico, especialmente en lo relacionado con sus características electroforéticas y cromatográficas.

CARACTERÍSTICAS ANORMALES

Existen personas que presentan hemoglobinas en las cuales cierto aminoácido de alguna de las cadenas ha sido cambiado por otro que normalmente no debe estar en ese lugar. En estos casos la estructura química de la hemoglobina cambiará y será diferente al ser comparada con las normales. A estas personas se las describe como poseedoras de una hemoglobina anormal.

El cambio puede ser aún más radical y la persona puede presentar determinada hemoglobina que carezca de toda una cadena, teniendo entonces cuatro cadenas idénticas. Estas personas tendrán hemoglobinas con cuatro cadenas α , β , γ ó δ ⁷, ²⁴, ²⁸, ³⁷. La hemoglobina con estas características tendrá también comportamiento bioquímico diferente al normal.

Finalmente existe un tercer grupo de personas en las cuales no existe una hemoglobina anormal. En estos casos, lo que ha pasado es que el porcentaje de las diferentes hemoglobinas normales está alterado, debido a un aumento notable de las hemoglobinas F o A₂.

PRUEBAS QUE SE USAN EN EL ESTUDIO DE LAS HEMOGLOBINAS

Veamos ahora en forma sucinta los métodos que se usan para determinar las características bioquímicas que puede tener una hemoglobina^{2, 3, 6, 12, 18, 20, 21, 23, 25}. Se usan principalmente los siguientes:

1. *Electroforesis*. El más usado (método de rutina) es la electroforesis en papel del hemolizado de glóbulos rojos.

2. *Cromatografía*. De estos métodos el más usado y útil es la cromatografía en una resina de intercambio iónico (amberlita IRC 50) del hemolizado de glóbulos rojos.

3. *Pruebas químicas especiales*. De estas pruebas las más importantes son: la resistencia del hemolizado a la acción de los álcalis y la prueba de la solubilidad de la ferrohémoglobina hecha con el hemolizado de glóbulos rojos.

4. *Prueba de la "huella digital"*. En esta prueba se somete el hemolizado a la acción de una enzima proteolítica como la tripsina y luego con ese hemolizado se hace cromatografía en una dirección y electroforesis en la otra, usando papel; se obtiene un patrón bidimensional de péptidos, al que se denomina "huella digital".

5. *Examen de cadenas y aminoácidos*.

Veamos el comportamiento de las diferentes hemoglobinas normales y anormales en cada una de las pruebas mencionadas:

1. *Electroforesis*. Existen diferentes medios electroforéticos que pueden ser usados: papel, gel de almidón, bloque de almidón, gel de agar y el de acrilamida. La movilidad que presentan las diversas hemoglobinas dependerá principalmente del pH, del amortiguador usado y, en forma secundaria, del medio que se emplee. Ordinariamente se usa la electroforesis a un pH alcalino (8.6). La movilidad de las hemoglobinas en la electroforesis a un pH alcalino es diferente para los diversos tipos existentes. Esta movilidad diferente es un poco mas clara si se usan geles (almidón, agar, acrilamida). A continuación ofrecemos un esquema explicativo del comportamiento de las diversas hemoglobinas descritas.

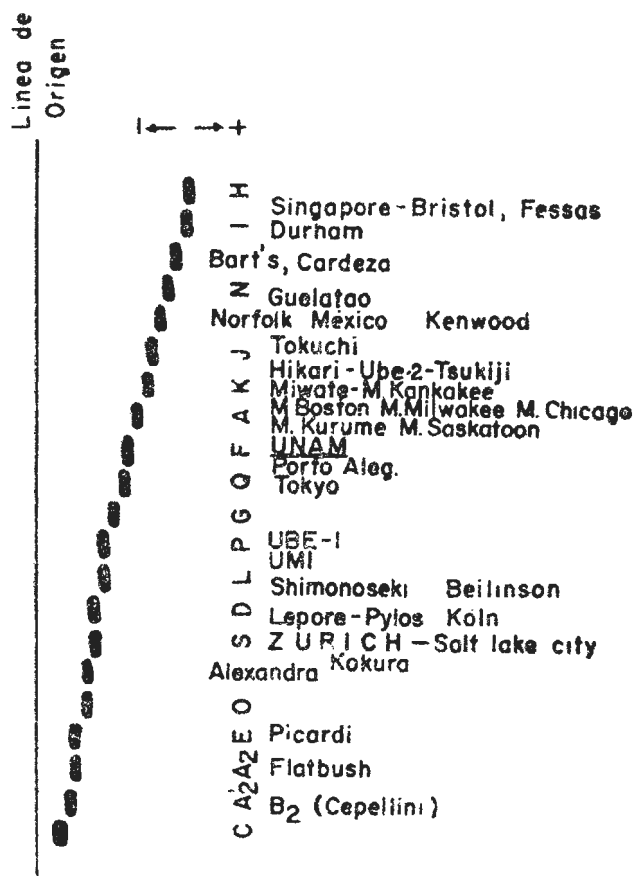


Figura 2

Hemos comprobado que la mejor electroforesis es la del gel de acrilamida; da una separación clara aun de las hemoglobinas F y A₂. En este tipo de estudio vemos que la hemoglobina UNAM, tiene una movilidad semejante a la de la hemoglobina F, es decir ligeramente anódica si se toma como punto de comparación a la hemoglobina A.

2. *Cromatografía.* El método cromatográfico es un segundo paso en este tipo de estudios. En general se puede decir que la cromatografía es un medio muy sensible para obtener la separación de las diferentes hemoglobinas, pero sobre todo es útil para recuperar las fracciones separadas.

Para cromatografía se usan principalmente dos medios: amberlita y metilcelulosa. Se pueden utilizar eluyentes de diversos tipos (fosfatos, citratos) y a diferentes valores de pH (alcalino, ácido). A continuación presentamos el esquema de la separación que se obtiene de las diferentes hemoglobinas en cromatografía.

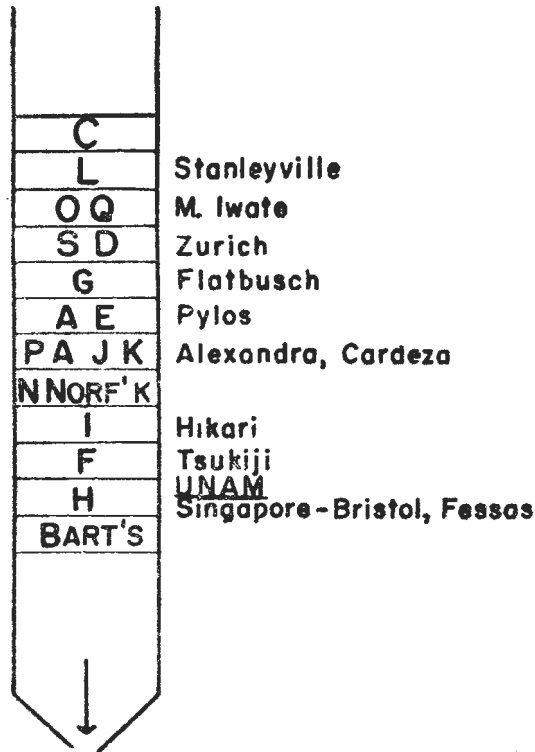


Figura 3

En el estudio cromatográfico la hemoglobina UNAM, sigue teniendo un comportamiento semejante a la hemoglobina F, siendo de movilidad rápida si es comparada con la hemoglobina A.

3. *Pruebas químicas especiales.* Hemos dicho que se usan básicamente dos: resistencia a los álcalis y solubilidad de la ferrohemoglobina: La primera sirve para diferenciar las hemoglobinas de tipo fetal, principalmente la F, de las otras; ya que las hemoglobinas fetales son resistentes a la acción de los álcalis, mientras que el resto no lo son. En este caso ya se establece la diferencia entre hemoglobina F y UNAM, ya que esta última no es resistente a la acción de los álcalis.

La segunda sirve para diferenciar las hemoglobinas S y C de las otras. Estas hemoglobinas tienen componentes ferrohemoglobínicos que son poco solubles, mientras que el resto de hemoglobinas los tienen muy solubles.

4. *Método de la "huella digital".* Por medio de este método estudiamos el comportamiento bidimensional (electroforesis y cromatografía) que tienen los péptidos de cada una de las diferentes hemoglobinas. Los patrones de péptidos que se obtienen por medio de este método

usando papel son diferentes, en general, para las diversas hemoglobinas; así se ha llegado a precisar que aunque una hemoglobina tenga la misma movilidad electroforética y cromatográfica que otra, puede presentar diferente patrón de péptidos y ser por tanto diferente. A continuación damos una lista de hemoglobinas con comportamiento electroforético y cromatográfico de grupo semejante, pero con "huella digital" diferente:

- Hemoglobinas del grupo C: C₁, *Georgetown*.
- Hemoglobinas del grupo D: D₁, *Punjab, Cyprus, Portugal, Chicago*.
- Hemoglobinas del grupo G: *Philadelphia, Ibadan, Azuakoli, Bristol, Chinese, Honolulu, Hongkong, Accra, San José*.
- Hemoglobinas del grupo J: *India, Malaya, Trinidad, Ireland*.
- Hemoglobinas del grupo K: *Madras, Calcuta*.
- Hemoglobinas del grupo O: *Indonesia, Tel Hashomen*

En lo que se relaciona al método de la "huella digital", hemos usado un procedimiento modificado como es el de la cromatografía bidimensional en papel. Hemos encontrado que la hemoglobina UNAM, presenta un patrón de péptidos diferente al de la hemoglobina A.

5. *Método para estudiar cadenas y aminoácidos alterados*. Se basa en procedimientos bioquímicos complicados. Este tipo de estudio los estamos llevando a cabo con respecto a la hemoglobina UNAM, para determinar en cuál de las cadenas está la alteración y cuál es el aminoácido cambiado.

ALTERACIONES QUE PRODUCE LA PRESENCIA DE UNA HEMOGLOBINA ANORMAL

Una hemoglobinopatía puede encontrarse sin presentar síntoma alguno. La mayoría de las hemoglobinas anormales han sido encontradas por estudio de población y han estado presentes en personas enteramente sanas. En éstas la hemoglobinopatía no causó ninguna alteración^{1, 5, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 19, 22, 27, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 38}.

Existen otras hemoglobinopatías en las cuales la presencia de una alteración globínica de la molécula afecta en tal forma la bioquímica celular que produce mayor fragilidad de los eritrocitos, causando anemia por hemólisis exagerada. En algunas personas, como aquellas con hemoglobinopatías S, C y F, los síntomas anémicos pueden ser tan importantes que la persona puede morir por una crisis de desglobulinización.

En otras personas la alteración celular bioquímica causada por la hemoglobina anormal es de tal naturaleza que puede determinar que la hemoglobina forme un compuesto estable, causando cianosis. Este es el caso de las metahemoglobinemias congénitas. Hay que insistir en este punto; no todas las cianosis en la primera infancia son causadas por una cardiopatía. Algunas de ellas pueden deberse a una hemoglobinopatía del tipo de la metahemoglobinemia^{13, 16, 29, 34}.

En el caso de la hemoglobina UNAM, las personas afectadas presentaban anemia hemolítica.

CONCLUSIÓN

Por lo antes expuesto creo que nos podemos dar cuenta de que las hemoglobinopatías ocupan un lugar importante en la clínica y representan un capítulo de trascendencia en la investigación. México ha contribuido en forma importante a este tipo de estudios.

En este trabajo se presentan además algunas de las características bioquímicas de la hemoglobina UNAM.

RESUMEN

Se presentan en forma muy sucinta las principales bases en el estudio de las hemoglobinopatías y sus relaciones con la clínica, describiendo el comportamiento bioquímico de la hemoglobina UNAM.

SUMMARY

Different laboratory techniques are used in the identification of human hemoglobins. We describe each one of them, specially in relation to UNAM, hemoglobin. This new abnormal hemoglobin has an electrophoretic and chromatographic behavior similar to the one of hemoglobin F, but different from it in the alkaline denaturation test.

We point out the importance of the acrylamid gel electrophoresis because we believe it is the best electrophoretic procedure for the identification of hemoglobins. It even gives a good separation of hemoglobins F and A, which is difficult to obtain with other electrophoretic methods. It also clearly identifies hemoglobin A₂.

REFERENCIAS

1. Atwater J., Baglioni C. and Tocantins, L. M.: A variety of human hemoglobin with "fast" component, but unaltered tryptic digest "finger print". Proceedings of the IX Congress of the International Society of Hematology, III, 115-119, México, (1964).
2. Beaven, G. H. and Gratzer, W. B.: A critical review of human haemoglobin variations. Part. I. J. Clin. Path. 12: 1-24, (1959).
3. Beaven, G. H. and Gratzer, W. B.: A critical review of human hemoglobin variations. Part. II, J. Clin. Path. 12: 101-115, (1959).
4. Cañizares-Proaño, C.: Hemoglobina UNAM. Una nueva hemoglobina anormal. I. Estudio de identificación. Bol. Inst. Estud. Méd. Biol. Méx. 23: 75-87, (1965).
5. Dacie, J. V.: *The haemolytic anemias. Part. I.* J. A. Churchill, London págs. 1-339, 1963.
6. Dacie, J. V. and Lewis, S. M.: *Practical haematology.* J. A. Churchill, London. págs. 1. 1963.
7. Dance, H. and Huehns, E. R.: A hemoglobin containing only d chains. Biochem. Biophys. Res. Comm. 7: 444-447, (1962).
8. Dherte P., Vandepitte J., Ager, J. A. M. and Lehman, H.: Stanleyville I and II, two new variations of adult haemoglobin. Brit. Med. J. 11: 282-284, (1959).
9. Edington, G. M. and Lehman, H.: Haemoglobin G. Lancet 2: 173-174, (1954).
10. Fessas P., Stamatoyannopoulos, G. and Karaklis, A.: Hemoglobin Pylos. Study of a hemoglobinopathy resembling thalassemia in heterozygous, homozygous and double heterozygous state. Blood 19: 1-22, (1962).
11. Gerald, P. S. and Diamond, L. K.: A new hereditary hemoglobinopathy (the Lepore trait) and its interaction with thalassemia trait. Blood, 13: 835-844, (1958).
12. Gerald, P. S.: The electrophoretic and spectroscopic characterization of hemoglobin M. Blood 13: 936-949, (1958).
13. Gerald, P. S. and George, Ph.: Second spectroscopically abnormal methemoglobins associated with hereditary cyanosis. Science 129: 393-394, (1959).
14. Gerald, P. S. and Efron, M. L.: Chemical studies of several varieties of hemoglobin M. Proc. Nat. Acad. Sci. 47: 1758-1767, (1961).
15. Hanada, M. and Rucknagel, D. L.: The characterization of hemoglobin Shimonoseki. Blood, 24: 624-635, (1964).

16. Heller, P., Weinstein, H. G., Yakulis, V. J.; and Rosenthal, I. M.: Hemoglobin M-Kankakee, a new variant of hemoglobin M. *Proceedings of the IX Congress of the International Society of Hematology*. México, 1964, III, pág. 21-27.
17. Hitzing, W. E., Frick, P. G., Betke, K. and Huisman, T. H. J.: Hämoglobin Zürich. *Helv. Paediat. Acta*, 15: 499-554, (1960).
18. Huisman, T. H. J. and Prins, H. K.: Chromatographic estimation of four different human hemoglobins. *J. Lab. Clin. Med.* 46: 255-262, (1955).
19. Ingram, V. M.: *The hemoglobins in genetics and evolution*, Columbia University Press. New York, (1963), págs. 1-165.
20. Ingram, V. M.: Abnormal human haemoglobins. I. Comparison of normal human sickle cell haemoglobins by "finger printing". *Biochim Biophys. Acta* 28: 539-545, (1958).
21. Ingram, V. M.: Abnormal human haemoglobins. II. The chymotryptic digestion of the trypsin resistant "core" of haemoglobins A and S. *Biochim. Biophys. Acta*, 28: 546-549, (1958).
22. Lee, R. C. and Huisman, H. J.: A variant of hemoglobin A₂ found in a negro family. *Blood*, 24: 495-501, (1964).
23. Lehman, H. y Ager, J. A.: The laboratory detection of abnormal haemoglobins. *The Association of Clinical Pathologists*. (London). Broadsheet No. 33 (new series) May, (1961).
24. Lehman, H. and Betke, K.: *Haemoglobin Colloquium*. Wien 31.8. (1961), Stuttgart.
25. Lehman, H.: *Patología de la síntesis globínica*. Triángulo, 5 No. 8, (1963).
26. Lisker, R., Loria A. y Ruiz-Reyes, G.: Frecuencia de hemoglobinas anormales en México. *Proceedings of the IX Congress of the International Society of Hematology*, México, 1964, III, págs. 45-50.
27. Lonxis, J. H. P., Huisman, T. H. J., Cander-Schaaf, P. C. and Prins, H. K.: Aminoacid composition of hemoglobin E. *Nature (London)* 177:627-628, (1956).
28. Prins, H. K. and Huisman, T. H. J.: Chromatographic behavior of hemoglobin, E.: *Nature (London)* 177: 840-841, (1956).
29. Pisciotta, A. V., Ebbe, Sh. N. and Hinz, J. E.: Clinical and laboratory features of two variants of methemoglobin, M. disease. *J. Lab. Clin. Med.*, 54: 73-87, (1959).
30. Ranney, H. M., Jacobs, A. S., Bradley, T. B. and Cordova, F. A.: A new variant of hemoglobin A₂ and its segregation in a family with hemoglobin S. *Nature (London)* 197: 164-166, (1963).
31. Raper, A. B., Ager, J. A. M. and Lehman, H.: Haemoglobin "Singapore-Bristol", a fast haemoglobin found in infants. *Brit. Med. J. i.*: 1537-1539, (1960).
32. Rucknagel, D. L., Tondo, C. V. and Salzano, F. M.: Hemoglobin Porto-Alegre, a possible polymer of normal hemoglobin. *Proceedings of the IX Congress of The International Society of Hematology*. México, (1964), III, págs. 29-35.
33. Schneider, R. G. and Haggard, M. E.: Haemoglobin P (the Galveston type). *Nature* 182: 322-323, (1958).

34. Shibata, S., Miyajit., Iuchi, I. and Ueda, S.: A comparative study of hemoglobin M-Iwate and hemoglobin M-Kurume by means of electrophoresis chromatography and analysis of peptide chains. *Acta Haemat. Jap.* 24: 70-78, (1961).
35. Shibata, S. and Iuchi, I.: *Hemoglobin Hikari*, a fast moving hemoglobin demonstrated in two families of japanese people. Proceedings of the IX Congress of the International Society of Hematology. México, (1964), III, Págs. 65-70.
36. Schwartz, H. and Spaet, J. H.: *Hemoglobin G. Fif the abnormal hemoglobin.* *Clin. Research Proc.* 3: 51, (1955).
37. Vella, F., Wells, R. H. C., Ager, J. A. M. and Lehman, H.: A haemoglobinopathy involving haemoglobin H and a new (Q) haemoglobin. *Brit. Med. J.*, 1: 752-755, (1958).
38. Yamaoka, K., Kawakura K., Hanada, M., Seita, M., Hitsumoto, S. and Coya, I.: *Studies on abnormal hemoglobins.* *Jap. J. Human Genet.*, 5: 99-111, (1960).