

MEDICINA AL DIA

Julio M. Rodríguez

HEMOGLOBINA S, BASES PARA SU TERAPIA

Extraído de *The New England Journal of Medicine*
Vol. 299, pág. 752-763, 804-811, 863-870, 1978.

Hace 30 años Linus Pauling llamó "enfermedad molecular" el trastorno que ocurría en los pacientes con anemia falciforme. Un gran progreso se ha hecho desde entonces en los conocimientos sobre la estructura y funcionamiento de esta hemoglobina anormal y en las condiciones en las que se agrega cuando está deoxigenada para formar un gel. Sin embargo, las relaciones exactas entre su gelación, la deformidad de los glóbulos rojos y la fisiopatología de la anemia falciforme son aún pobremente entendidas.

Junto con esta nueva información sobre la estructura y funcionamiento de la Hb S se han introducido nuevas formas de terapia de la anemia falciforme. Comenzando en la década de los 60 con la úrea y las sales de cianato, nuevos medicamentos se proponen cada año, sin embargo, todavía ningún medicamento ha demostrado ser lo suficientemente eficaz y libre de efectos secundarios indeseables como para ser recomendado su uso en estos pacientes. Aún así estos trabajos han servido para clarificar en algo la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y a definir las propiedades del medicamento necesario para una terapia exitosa. Existe hoy día optimismo en el sentido de que será posible en futuro cercano producir un fármaco que evite la deformidad de los glóbulos rojos.

En este trabajo asumimos que la formación intracelular del gel de Hb S deoxigenada es el proceso patológico primario en la anemia falciforme. En esta perspectiva veremos la bioquímica de la Hb S con énfasis en la formación de su gel insoluble y resumiremos los conocimientos actuales sobre el glóbulo rojo deformado y su interacción con la microvasculatura. Con esta información consideraremos los diversos agentes antideformantes que se han estudiado intensamente en los últimos años y veremos los nuevos métodos para la evaluación de estas drogas.

La anemia falciforme una enfermedad potencialmente letal con manifestaciones clínicas múltiples resulta de la expresión homocigota de un gene anormal para las cadenas beta de la globina. Sus principales manifestaciones clínicas son una anemia hemolítica crónica y crisis vasoclusivas que causan dolor severo así como daño generalizado orgánico. Además hay efectos sistémicos de la enfermedad como son una susceptibilidad aumentada a las infecciones y retardo en el desarrollo y el crecimiento. Aunque hay un espectro amplio en cuanto a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, el tiempo de vida de los pacientes, la frecuencia de las crisis, el grado de anemia y extensión del daño visceral, los factores que contribuyen a esta variedad no han sido aún bien elucidados. Lo único que aparentemente guarda relación con las manifestaciones de los pacientes con Hb S es la presencia de hemoglobina adulta normal o de hemoglobina fetal. Las personas portadoras del rasgo falcémico que tienen tanto Hb S como A no tienen virtualmente aumento en su morbilidad o mortalidad. El efecto protector de la Hb F es sin embargo más variable y el valor pronóstico de los niveles de Hb fetal en un determinado paciente es desafortunadamente limitado.

Al final de la década del 40 Neel demostró que la anemia falciforme se transmitía como un gene recesivo autosómico. Las ventajas del estado heterocigótico AS sobre el homocigótico SS son obvias sin embargo las ventajas del estado AS sobre el normal AA son menos aparentes. Raper en 1949 fue el primero en sugerir que el estado AS podría conferir "protección contra parásitos". Hay mucha evidencia para apoyar este concepto particularmente en el caso de plasmodio falciparum pero el mecanismo no está claro y la protección contra la malaria está lejos de ser absoluta.

En 1949 Pauling y sus asociados demostraron que había una diferencia electroforética entre la Hb S y la Hb A y correctamente atribuyeron este fenómeno a un cambio en la carga eléctrica de las cadenas beta de globina. En 1956 Ingram usando por primera vez la técnica de digestión de aminoácidos (fingerprint) demostró que el cambio era debido a la sustitución del aminoácido normal para la posi-

De: Anemia Falciforme, bases moleculares y celulares de enfoques terapéuticos por Jurrien Dean MD y Alan N. Schechter MD del laboratorio de biología química del Instituto Nacional de Artritis, Metabolismo y enfermedades digestivas del Instituto Nacional de Salud de los E.U.A. en Bethesda Maryland.

Este trabajo fue publicado en tres partes.

ción 6 de cada una de las cadenas beta que es el ácido glutámico por el aminoácido valina, lo cual producía una pérdida de dos cargas negativas por cada molécula de hemoglobina.

POLIMEROS DE LA HEMOGLOBINA S. ESTUDIOS ESTRUCTURALES

Cuando la Hb S es deoxigenada *in vitro* bajo condiciones casi fisiológicas se torna relativamente insoluble comparada con la Hb A y se agrega en largos polimeros (en este trabajo los términos polimerización, agregación o gelación son usados de manera sinónimas) los cuales se alinean en gels paracrystalinos llamados tactoides, cristales líquidos o fase nemática, los cuales han sido examinados con microscopía polarizante, difracción de fibras por rayos X y microscopía electrónica; estudios sugieren que en el polímero los tetrameros de Hemoglobina están dispuestos alrededor de un eje vertical que visto desde un extremo parecen anillos o espirales de Hb apilados uno sobre otro. Estas estructuras como tubos de 20 a 22 nm. en diámetro han sido descritas como teniendo centros huecos o llenos y con 6,8 ó 14 capas. Las diferencias en las observaciones pueden resultar de las técnicas experimentales usadas y en la interpretación de las imágenes de alta separación del microscopio electrónico. Alternativamente estas diferencias pueden representar un verdadero polimorfismo del agregado influenciado por factores como la velocidad de la polimerización y la presencia de sustancias ligadas a la hemoglobina. Estos estudios también han demostrado la existencia de puntos de contacto entre los tetrameros vecinos que son necesarios para mantener el polímero. Este puede ser considerado como una fase sólida que está en equilibrio químico con la solución concentrada monomérica de Hb S que le rodea. Estas dos fases pueden ser separadas por ultracentrifugación y los efectos de variables fisiológicas pueden ser descritas con precisión.

Estas variables pueden ser agrupadas en cuatro categorías:

Concentración de oxígeno, concentración de Hb S, temperatura y efecto de la hemoglobina normal. Veamos cada una de estas variables.

CONCENTRACION DE OXIGENO

El oxígeno es la sustancia más importante que afecta la formación del polímero de Hb S. Sola hemoglobina deoxigenada puede formar gel. Ninguno de los estados ligados de la Hemoglobina S esto es la oxyhemoglobina, la methemoglobina, la carbomonoxyhemoglobina, etc., pueden normalmente agregarse.

Puede postularse que la Hb S deoxigenada se polimeriza porque su conformación permite un número suficiente de contactos o ligazón intertetramérica para suplir la suficiente energía necesaria para estabilizar la estructura del polímero. Esta interpretación está de acuerdo con el modelo alostérico que ha sido usado generalmente para explicar la unión co-operativa del oxígeno a la hemoglobina. El principio que se asume en este modelo es que solo dos formas

de hemoglobina existen desde el punto de vista conformacional: a) — un estado tenso o T y un estado relajado o R que corresponden respectivamente al estado deoxigenado y el estado de ligazón de las estructuras cuaternarias de la Hb. Estos dos estados están en equilibrio uno con otro y a medida que una solución de hemoglobina es deoxigenada el equilibrio se inclina hacia el estado deoxi o T. Cualquier cosa que establece el estado deoxi en relación con el estado oxi como lo es la formación del polímero de Hb S disminuirá la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Esto se ha comprobado en el laboratorio.

Los efectos del Ph y del 2-3 difosfoglicerato (2-3 DPG) sobre la gelación son también mediados por este mecanismo. Así bajando el Ph de 8.5 a 6.5 se disminuye la afinidad de la Hb por el efecto Bohr lo cual aumenta la cantidad de Hb deoxigenada a cualquier tensión de oxígeno y por tanto promueve la gelación de Hb S. Igualmente al aumentar la cantidad de 2-3 DPG se estabiliza la estructura deoxigenada y se promueve la polimerización.

LA CONCENTRACION DE Hb S

Polimerización es muy dependiente de la concentración de deoxyhemoglobina S y si a una temperatura fija elevamos su concentración eventualmente llegaremos a un equilibrio de solubilidad y si lo sobrepasamos la hemoglobina saldrá a la solución y formará un gel.

En las condiciones normales de experimentación en el laboratorio (0.15M fosfato de Potasio, Ph 7.15 a 20°C) el equilibrio de solubilidad de la Hb S es de 20.8g. o/o. Como la concentración corpuscular medio de hemoglobina de los glóbulos rojos normalmente es superior a 30 g. o/o cuando ocurre deoxigenación la Hb S intracelular formará un gel. Ciertamente la gelación ocurre *in vivo* con solo una deoxigenación parcial de la Hb S.

TEMPERATURA

La gelación de la Hb S tiene un coeficiente negativo de temperatura. El gel que se forma cuando una solución deoxigenada de Hb S de 26 g.o/o está a una temperatura de 37°C se derretirá a 4°C y formará una solución homogénea de tetrameros de hemoglobina. Aunque de poca aplicación *in vivo* esta circunstancia es aprovechada en el laboratorio para numerosos estudios en la gelación enfriando y calentando la Hb S.

EFFECTO DE LAS HEMOGLOBINAS NORMALES

El efecto inhibitor sobre la gelación obtenido al mezclar Hb S con Hb A o F ha sido conocido por más de 25 años.

Al mezclar dos hemoglobinas las cadenas beta de la Hb A y las ganma de Hb F pueden estar presentes como tetrameros intactos de Hb A o F o como híbridos del tipo Alfa 2 Beta S, Beta A, o Alfa 2, Beta S Ganma. Ya sean intactos o híbridos estos tetrameros se polimerizan con mucho más dificultad que la Hb S y por tanto inhiben la gelación por un efecto dilucional cuando la concentración

total de la Hb permanece constante. Este fenómeno es la base del efecto protector de la heterozigocidad y de los niveles altos de Hb F.

En el laboratorio pequeños cambios en la concentración de Hb, la temperatura o el Ph influyen de gran manera a la velocidad en que la Hb S se polimeriza, así si la concentración de Hb S se reduce de 35 a 34 g.o/o nada más y la hemoglobina se deoxigena, el tiempo requerido para que se forme el gel se prolonga al doble y esto puede tener implicaciones terapéuticas como veremos más adelante.

LOS GLOBULOS ROJOS

La hemoglobina está normalmente contenida en una solución 5mM dentro de los eritrocitos y constituye el 97.5 o/o del peso de la proteína plasmática de la célula. El otro 2.5 o/o está constituido por sistemas protéicos dedicados a mantener y regular la función de la Hb así como a mantener la integridad de la membrana del glóbulo.

Si uno toma glóbulos rojos de un paciente SS y en el laboratorio le saca la hemoglobina y entonces la reemplaza por Hb A al deoxigenar el glóbulo no se produce gelación. Si a un glóbulo rojo de una persona normal se le saca la Hb y se le sustituye por Hb S el glóbulo se deformará al ser deoxigenado.

Así que definitivamente el defecto que deforma la célula está en la hemoglobina y no en la membrana que la rodea. Ahora bien la membrana juega algún papel en el proceso y puede alterarse con la deformación y entonces influir en la gelación.

Las estructuras que se forman in vitro con Hb S deoxigenada también se observan in vivo. El tiempo in vivo que normalmente se toma un glóbulo rojo deoxigenado para iniciar su polimerización es de dos segundos. También se ha comprobado que in vivo el tiempo necesario para la oxigenación de un glóbulo rojo deformado por la Hb S que contiene es mayor que el tiempo que toma un glóbulo rojo normal.

La formación del gel también produce cambios funcionales en la membrana del glóbulo rojo y se ve que el potasio sale del glóbulo y entra el sodio así como el Calcio en gran cantidad. Habitualmente la célula no se deshidrata porque la pérdida de K está compensada por la entrada de Na y agua pero si se deforman los glóbulos en el laboratorio repetidas veces la deformidad se hace irreversible y la célula se deshidrata al perderse más K que Na pueda entrar y esto contribuye a un aumento de la concentración intraglobular de Hb y agravamiento de la deformidad.

In vivo se ha observado que la sangre de pacientes SS contiene eritrocitos deformados permanentemente o de manera irreversible (ISC) en una proporción que varía de un 5 a un 10 o/o pero que fluctúa dentro de límites muy estrechos en un paciente determinado. No hay establecida hasta ahora una correlación clínica entre el porcentaje de ISC y la frecuencia de crisis dolorosas pero hay cierta correlación con la severidad de la hemólisis.

Estos glóbulos no recuperan su forma normal aunque en el laboratorio se les oxigene, y se les disuelva el gel de

Hb S y aunque se les saque esta hemoglobina, por lo que la membrana está alterada en estas células de manera permanente aunque estas alteraciones aún no han podido ser identificadas.

Estos ISC tienen implicaciones reológicas ya que su presencia aumenta la viscosidad de la masa de rojos por ser células rígidas, esto junto con un elevado nivel de gammaglobulinas produce un aumento en la viscosidad de la sangre completamente oxigenada de pacientes SS, este aumento de la viscosidad es mayor si la sangre está parcialmente deoxigenada.

Sin embargo este cambio en viscosidad es críticamente dependiente del hematócrito y a valores del hematócrito de 25 o/o o menos, virtualmente no hay cambios detectables en la viscosidad en la deoxigenación.

En años recientes muchos de los datos obtenidos sobre la velocidad en la formación del gel y la deformidad de los eritrocitos han sido resumidos en una hipótesis kinética para explicar la relación entre gelación, deformación y la oclusión de la microvasculatura. Esta hipótesis es la siguiente:

El tiempo de tránsito por los capilares es el factor crucial determinante en que un glóbulo deformado quede atrapado allí. Si estas células deformadas están todavía en los capilares o en las venulas pequeñas cuando los concomitantes reológicos de la deformidad esto es aumento de la viscosidad y rigidez ocurren, el glóbulo rojo quedará atrapado y causará infarto del tejido que le rodea y que es irrigado por esos capilares. Un factor determinante importante para la producción de la deformidad en los vasos sería el tiempo necesario para los cambios reológicos ocurrir comparados con el tiempo de tránsito de los glóbulos rojos por regiones anatómicas de tensiones bajas de oxígeno como son los lechos capilares sistémicos. Factores como el Ph, concentraciones aumentadas de hemoglobina intracelular, niveles bajos de Hb F y la presencia de ISC reducirán el tiempo necesario para que la deformidad de los glóbulos rojos ocurra y aumentaran las posibilidades de un atrapamiento. Sin embargo ordinariamente la mayoría de los eritrocitos de pacientes SS parecen sobrevivir los ciclos circulatorios. Así que también hay que considerar mecanismos homeostáticos como son fístulas arteriovenosas que pueden ocurrir y disminuir el estasis intravascular y por tanto evitar la deformidad de los eritrocitos.

La hipótesis kinética es importante para tratar de producir un modelo experimental en el laboratorio que pueda usarse para estudiar cuantitativamente la patogénesis de las crisis y los daños viscerales y orgánicos y también un sitio donde probar los nuevos medicamentos que pueden retardar el tiempo de gelación de manera que los eritrocitos puedan pasar a través de los capilares y reoxigenarse en los pulmones antes de que la gelación intraglobular de la Hb S ocurra y los glóbulos se deformen.

ENFOQUES TERAPEUTICOS

A pesar del gran progreso en la comprensión de la patogénesis molecular de la anemia falciforme, una terapia específica e inocua para el paciente no ha sido aún encon-

trada para prevenir o aminorar las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En el presente el tratamiento efectivo está restringido al tratamiento sintomático de las crisis dolorosas y aplásticas, tratamientos de infecciones y terapias dirigidas hacia órganos específicos afectados. Los principales medios de tratamientos en las crisis dolorosas son analgésicos, buena hidratación y antibióticos según juicio del médico. Transfusiones de sangre son reservadas usualmente para el tratamiento de crisis aplásticas, crisis de sequestración y profilaxis antes de operaciones y partos. Recientemente las transfusiones han sido sugeridas para el tratamiento de crisis severas, algunos embarazos y prevención de accidentes cerebrovasculares.

La búsqueda de un agente químico específico que compense por el defecto fundamental de la anemia falciforme es sin embargo la meta de la investigación actual en este campo.

PRIMEROS INTENTOS DE TERAPIA ESPECIFICA

La experiencia con Urea y los Cianatos

La introducción de la urea para el tratamiento de las crisis falcémicas fue uno de los primeros ejemplos de la investigación molecular produciendo una manera racional de intervenir en la enfermedad. En 1966 Murayama propuso que las interacciones hidrofóbicas eran las responsables de la polimerización de la Hb S y entonces se inició la experimentación con agentes llamados caotrópicos esto es que rompen macromoléculas sean de ácido nucleicos o protéicas, encontrándose que la urea en una solución de 1.0 M disminuía el número de células que se deformaban in vitro al ser deoxigenadas y se decidió usar en humanos una solución intravenosa de urea en fructuosa al 10 o/o. Inicialmente se recibieron reportes favorables pero un estudio cooperativo de varios centros, prospectivo y con controles demostró que no había diferencia, básicamente porque los niveles in vivo para producir efectos beneficiosos en humanos eran tóxicos al producir gran diuresis y deshidratación.

En 1971 se sugirió que cianatos los cuales se forman de la urea en solución eran el principio activo en ella. Se demostró que la carbamoylación de la Hb por cianato de potasio aumentaba su afinidad por el oxígeno y por ese mecanismo prevenía su gelación y deformación. Se hicieron estudios preliminares en animales para detectar posible toxicidad los que no arrojaron ningún efecto indeseable notorio. En 1975 se hizo la prueba con humanos en estudio con 17 pacientes con controles y a pesar de obtenerse los niveles deseados de cianato en la sangre no hubo mejoría en ellos y en cambio aparecieron signos de toxicidad como neuropatías periféricas afortunadamente reversibles, pero también cataratas subcapsulares con lo cual terminó el uso de este medicamento.

Estas dos experiencias sin embargo fueron útiles para determinar las necesidades que deben establecerse para probar medicamentos y que la investigación debe dirigirse a buscar fármacos que básicamente afecten la hemoglobina respetando los otros tejidos. También se comprobó la variabilidad de las manifestaciones clínicas de la enferme-

dad en cuanto a su severidad y pronóstico de vida y que por tanto es absolutamente necesario que al probar nuevas drogas deben usarse protocolos prospectivos con controles apropiados, evitar las ideas preconcebidas y someter los resultados a pruebas estadísticas antes de llegar a ninguna conclusión.

Por otra parte los investigadores han logrado perfeccionar una serie de pruebas de laboratorio donde las posibilidades de los distintos compuestos químicos son estudiadas antes de pasar a las pruebas de toxicidad en animales. Estas pruebas son:

a) — Efecto sobre la gelación, la cual es evaluada mediante la llamada prueba de directa de la solubilidad.

b) — Pruebas sobre la deformidad; esta área necesita de métodos más exactos pues todavía la manera principal de apreciar los efectos de un medicamento en esta fase se basan en la cuantificación del porcentaje de células que aparecen deformadas después de algún tiempo de deoxigenación, mirándolas por el microscopio.

c) — Efecto sobre la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno; se han iniciado métodos para evaluar esta función aunque aún son muy crudos, actualmente se usa la relación recíproca entre la unión del oxígeno y gelación.

d) — Interacción de los eritrocitos con la microvasculatura; las primeras pruebas en este sentido han sido la observación por la microcinematografía de los capilares de ratas perfundidos con eritrocitos deformados y medir la sobrevivencia de eritrocitos humanos inyectados en varios roedores.

Para facilitar la aplicación de estas técnicas la rama de Anemia Falciforme del Instituto Nacional del Corazón, Pulmones y Sangre de los E.U.A. está instalando un laboratorio y un comité de consultantes que dicte las reglas de su funcionamiento. Esto es un paso muy importante ya que muy pocos laboratorios poseen las facilidades para estos estudios.

La comprensión de la heterogenicidad de las manifestaciones clínicas de la anemia falciforme ha resultado en el establecimiento de un estudio cooperativo a nivel nacional en los E.U.A. dirigido por el Instituto Nacional del Corazón, Pulmones y Sangre, para proveer uniformidad en la evaluación clínica de pacientes, así como un marco de referencia para comprender el curso clínico de la enfermedad. Este estudio continuará por 5 años o más e incluirá más de 2,000 pacientes en 16 centros médicos. Un estudio análogo pero más pequeño se está efectuando en la vecina antilla de Jamaica. Se espera que los datos obtenidos de estos estudios proveerá una base con la que los pacientes tratados con nuevos agentes contra la enfermedad puedan ser comparados. Porque no hay terapia específica por el momento un estudio de este tipo sobre la evolución natural de la enfermedad no es solo ético sino también muy deseable.

AGENTES TERAPEUTICOS POTENCIALES

Existen tres tipos de sustancias que pueden ser usadas como terapia en la enfermedad atendiendo a su manera de actuar:

- a) Los que inhiben la formación intraglobular del gel.
- b) Los que impiden la deformidad del glóbulo independientemente de un efecto inhibitor en la formación del gel.
- c) Aquellas que por otros métodos previenen la interacción patológica entre el glóbulo rojo deformado y la microvasculatura.

INHIBIDORES DE LA GELACION

Los más extensamente estudiados de este grupo son:

Ureas, Fenilalanina, L-Phe-L-phe-1-Arginina, sulfato de piridoxal, gliceraldehido, mostaza nitrogenada, dimetiladipimidato, cianato de potasio, fosfato sódico de carbomoyl, Acido acetildibromosalicilico, cistamina y el Bis N mateimidometil eter.

Aunque todos estos agentes han probado prevenir la polimerización de la Hb S in vitro su uso in vivo ha tropezado con dificultades derivadas de su toxicidad hacia otros tejidos a las dosis necesarias para un efecto clínico significativo.

INHIBIDORES DE LA DEFORMACION

El agente más estudiado en esta categoría es el Zinc. De manera aún desconocida este metal altera la membrana del glóbulo rojo y previene su deformidad y ya en vivo se ha comprobado que disminuye el número de ISC en algunos pacientes.

Estudios controlados se hayan en progreso con este metal.

Otro agente en esta categoría es el hidroclorehidrato de procaína aunque su estudio se haya aún en etapas muy tempranas.

INHIBIDORES DE LA INTERACCION ENTRE EL GLOBULO DEFORMADO Y LA MICROVASCULATURA:

Como el proceso aún no se comprende bien, es difícil designar y evaluar compuestos que actúen de esta manera y todavía no hay ningún agente de este tipo en estudio.

Recientemente dos nuevas maneras de atacar el problema han recibido gran atención de parte de los investigadores:

1.— Una disminución selectiva en el 2-3 Difosfoglicerato (DPG) del glóbulo rojo aumentaría la afinidad por el oxígeno de la Hb S e inhibiría su gelación. El DPG solo tiene funciones significativas en el eritrocito y por tanto el medicamento utilizado en esta forma no tendría toxicidad para otras células; con un mejor conocimiento de los mecanismos de síntesis y degradación del DPG sería posible designar y estudiar modificadores enzimáticos específicos.

2.— Otro enfoque terapéutico consiste en utilizar sustancias que aumenten el volumen corpuscular del glóbulo rojo y de esa manera se disminuiría la concentración intraglobular de la Hb S. Como la kinética de la gelación es muy dependiente de la concentración de Hb S deoxigenada intraglobular, una pequeña disminución en la concentración de ésta tendría un gran efecto retardante sobre la polimerización y deformidad del glóbulo.

REPORTE DEL RADIOLOGO

(Viene de la Pág. 174)

RESPUESTA: Mediante una enema de bario se demuestra a nivel del ciego y tercio proximal del colon derecho una masa concéntrica la cual causa muy marcada estrechez del lumen intestinal y distorsiona considerablemente el patrón de la mucosa. Cáncer del colon con apariencia típica de "corazón de manzana comida".