

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION**



T E S I N A

**Que como parte de los requisitos para obtener el diploma de
Especialidad en Hematopatología**

PAPEL DE LOS FACTORES ENDOTELIALES EN LA DREPANOCITOSIS

Presenta

Med. Cir. Haidee Palacios Ruiz

Directora de Tesina

Dra. Elba Reyes M.

AGRADECIMIENTO

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Investigación en Hematopatología del departamento de morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

La sustentante utilizó durante su entrenamiento de especialidad el equipo donado por la “Fundación Gonzalo Río Arronte” a quien se hace patente su enorme agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS

A las personas que gracias a su apoyo me brindaron la oportunidad de realizar estudios de posgrado, a mi familia que siempre han puesto su confianza en mí, y que gracias a ellos una vez más, alcanzo un logro académico mas en mi profesión, a mis profesores que gracias a su paciencia, esfuerzo y dedicación me han transmitido sus conocimientos y compartido sus experiencias, tanto profesional y personal, y que si duda han contribuido en mi desarrollo profesional. A todos ellos, gracias.

INDICE

| | |
|----------------------------|-----|
| Abreviaturas | ii |
| Índice de tablas y figuras | iii |
| Resumen | iv |
| Objetivo | 1 |
| Justificación | |
| Introducción | 2 |
| Desarrollo | |
| Membrana Eritrocitaria | |
| Estructura | |
| Citoesqueleto | 4 |
| Hemoglobina | 6 |
| Estructura | 8 |
| Funciones | 11 |
| Hemoglobinopatias | 11 |
| Drepanocitosis | 11 |
| Historia | 11 |
| Incidencia | 12 |
| Etiología | 13 |
| Fisiología | 15 |
| Manifestaciones clínicas | 18 |
| Alteraciones de membrana | 20 |
| Oxido nítrico | 21 |
| Arginina y arginasa | 25 |
| Factor tisular | 26 |
| Hidratación celular | 29 |
| Endotelio | 30 |
| Coagulopatía | 33 |
| Inflamación | 34 |
| Células sanguíneas | 35 |
| Factor von Willebrand | 36 |
| Trombomodulina | 36 |
| Tratamiento | 37 |
| Prevención | 39 |
| Conclusiones | 40 |
| Bibliografía | 41 |

ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| 2,3 DGP | 2,3 Difosfoglicerato |
| ATP | Adenosin Trifosfato |
| FT | Factor tisular |
| FVW | Factor Von Willebrand |
| GMPc | Guanosin monofosfato cíclico |
| Gp IIb/IIIa | Glicoproteína IIb/IIIa |
| Gp Lu | Glucoproteína Lutheran |
| GTP | Guanosin trifosfato |
| Hb | Hemoglobina |
| HbA | Hemoglobina adulta |
| HbA2 | Hemoglobina adulta 2 |
| HbF | Hemoglobina fetal |
| HbS | Hemoglobina de células falciformes |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular 1 |
| IκBα | Inhibidor κ B |
| IL | Interleucina |
| NF-κB | Factor Nuclear κ B |
| NO | Oxido nítrico |
| NOS | Oxido nítrico sintetasa |
| sGC | Guanilato ciclasa |
| TNF-α | Factor de Necrosis Tumoral α |
| TSP | Trombospondina |
| VCAM-1 | Molécula de adhesión de células vasculares 1 |
| VLA-4 | Antígeno muy tardío 4 |

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | | |
|---------|--|----|
| Tabla 1 | Proteínas más importantes que constituyen el citoesqueleto y su interacción entre sí | 6 |
| Tabla 2 | La combinación de las cadenas de globina da lugar a los diferentes tipos de hemoglobina | 8 |
| Tabla 3 | Medicamentos utilizados en el tratamiento de la drepanocitosis. | 38 |
| Fig 1. | Modelo de membrana celular | 4 |
| Fig 2 | El cito esqueleto en la membrana del eritrocito | 5 |
| Fig 3. | Interacción entre las proteínas del esqueleto entre sí | 6 |
| Fig 4 | Tetrámero de la hemoglobina adulta. | 7 |
| Fig 5 | Genes de la globina alfa y beta | 7 |
| Fig 6. | Estructura primaria, secundaria y terciaria de la hemoglobina | 9 |
| Fig 7. | Estructura cuaternaria de la Hb | 10 |
| Fig 8 | Distribución de la drepanocitosis | 13 |
| Fig 9. | Gen de la β globina mostrando la mutación que origina la drepanocitosis. | 14 |
| Fig 10. | Resumen de los mecanismos implicados en la drepanocitosis. | 16 |
| Fig 11. | Formación de los cuerpos tactoides en los eritrocitos. | 17 |
| Fig 12. | Formación de cúmulos de células falciformes que bloquean la circulación sanguínea. | 18 |
| Fig 13. | Síntesis y formación del NO. | 22 |
| Fig 14 | Reacción de los eritrocitos hemolizados con el NO. | 23 |
| Fig 15. | La baja disponibilidad de NO impide la vasodilatación en la drepanocitosis | 24 |
| Fig 16. | Citocinas en drepanocitosis | |
| Fig 17. | Fases de la coagulación sanguínea. | 28 |
| Fig 18 | Vías de la coagulación y fibrinólisis. | 28 |
| Fig 19. | El cotransportador Cl-K y el canal de Gardos | 29 |
| Fig 20. | Interacciones del eritrocito con el endotelio vascular. | 31 |
| Fig 21 | Interacciones de los eritrocitos en el endotelio. | 32 |
| Fig 22. | Las citocinas de la inflamación se involucran en la aparición del estado procoagulante en la drepanocitosis. | 32 |
| Fig 23 | Liberación de citocinas por el hígado | 36 |

RESUMEN

La drepanocitosis, también llamada anemia de células falciformes, es una enfermedad hereditaria originada por la presencia de una mutación en el gen de la hemoglobina, esta produce cambio de un aminoácido en la cadena β de la globina, lo que conlleva a la formación defectuosa de la hemoglobina y la forma característica de hoz de los eritrocitos, esta morfología impide su deformabilidad a través de capilares pequeños. Cuando son expuestos a factores de estrés como infecciones, administración de medicamentos o cambios de temperatura, la hemoglobina defectuosa se polimeriza y precipita dentro de un eritrocito dañado, conduciendo a su muerte prematura. Además, las plaquetas se encuentran activadas de forma crónica, existe alteración de enzimas que mantienen la integridad de la membrana plasmática, disminución de la biodisponibilidad de factores endoteliales como óxido nítrico y factor tisular, y alteración de proteínas plasmáticas como la proteína C reactiva. Una vez que la hemoglobina proveniente de los eritrocitos hemolizados interactúa con el endotelio, inhibe la vasodilatación, se activa la cascada de la coagulación y se producen complicaciones como las crisis vasooclusivas, caracterizadas por daño isquémico, infarto e inflamación, produciendo hipertensión arterial pulmonar, coagulopatías y anemia hemolítica.

OBJETIVO

Comprender la fisiopatología de la drepanocitosis y las manifestaciones clínicas de la misma, así como conocer cómo influyen los factores endoteliales y su interacción con las células sanguíneas involucradas en el desarrollo de las complicaciones vasculares, en aquellos pacientes que la padecen.

JUSTIFICACION

La drepanocitosis conduce al desarrollo de complicaciones severas a temprana edad, dentro de estas se encuentran alteraciones vasculares, las cuales varían desde transitorias, discapacitantes, o hasta mortales en niños y adultos.

Debido a la hemólisis que sufren los eritrocitos, se producen alteraciones en el endotelio vascular, expresión inadecuada de moléculas, así como alteración en el funcionamiento plaquetario, lo que conduce al riesgo aumentado de oclusiones vasculares.

INTRODUCCION

El sistema hematopoyético está formado principalmente por eritrocitos, leucocitos y plaquetas, cada una de éstas tiene una función particular en el organismo, los eritrocitos son los más abundantes, encontrándose en el humano en una cantidad de 5,000,000 a 10,000,000/ μ l en condiciones normales, su función principal es el transporte de gases, entre otras. Las enfermedades de los eritrocitos son muy diversas, entre ellas podemos mencionar a las que afectan la cantidad o el tamaño de los eritrocitos, a la célula progenitora, alteraciones de la membrana plasmática, defectos en las vías metabólicas o defectos en la hemoglobina. Las hemoglobinopatías son producto de alteraciones genéticas que afectan a la síntesis de la hemoglobina, y la manifestación clínica característica de quienes las padecen es la anemia hemolítica. Las más significativas son las talasemias y la drepanocitosis que se encuentran distribuidas en todo el mundo, pero la mayor incidencia aparece en el continente africano, y se ha extendido debido a la migración y la mezcla de razas. Existen dificultades para conocer la incidencia de las hemoglobinopatías, la más común es que no se diagnostica en los portadores que son asintomáticos.

DESARROLLO

MEMBRANA ERITROCITARIA

Al igual que otras membranas celulares, la membrana del eritrocito está constituida por lípidos, proteínas y carbohidratos. Es la responsable de la forma discoide característica del eritrocito, y contribuye a mantener su hidratación, elasticidad y deformabilidad (14).

ESTRUCTURA

Lípidos.

Constituyen aproximadamente 40 % del peso seco de la membrana, son principalmente fosfolípidos y colesterol, en menor cantidad ácidos grasos libres

y glicolípidos. Los lípidos se encuentran dispuestos en una doble capa, donde sus grupos polares están expuestos al exterior, y los grupos apolares dispuestos al interior unidos entre sí mediante enlaces hidrofóbicos. Fig. 1. La membrana lipídica tiene la característica de ser fluida, debido a los ácidos grasos insaturados que forman parte de los fosfolípidos, y por la disposición asimétrica de las proteínas incluidas en ella (14). Los aminofosfolípidos como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina se encuentran en la cara interna, y los fosfolípidos que contienen colina como la fosfatidilcolina y la esfingomiélin se encuentran en el exterior. Esta composición y organización de la membrana se mantiene durante toda la vida del eritrocito y se pierde en las hemoglobinopatías, en donde existe la incapacidad de reparar la membrana celular y se alteran las interacciones con otras células y con los componentes plasmáticos (9).

Proteínas.

Constituyen 52% del peso seco de la membrana, unas se encuentran totalmente sumergidas en la doble capa de lípidos y son llamadas proteínas integrales, otras se encuentran parcialmente o totalmente fuera de la bicapa y reciben en nombre de proteínas periféricas (14).

Las proteínas integrales tienen su superficie interna cubierta por una masa fibrilar de proteínas llamada citoesqueleto, el citoesqueleto se une a la doble capa de lípidos por medio de las proteínas integrales. Esta interacción de lípidos, proteínas integrales y proteínas del citoesqueleto da la forma bicóncava característica del eritrocito, este tiene un exceso de superficie en relación al volumen, lo que le da la propiedad de deformarse para atravesar la circulación, incluso en vasos con diámetros inferiores al tamaño propio. Cualquier alteración que disminuya su deformabilidad compromete su vida media produciendo hemólisis. La mayoría de las proteínas integrales son glicoproteínas, contienen ácido siálico lo que en la superficie externa da lugar al glucocálix (14). La proteína integral más importante es la banda 3, ésta atraviesa la membrana 12 veces, su fragmento oligosacárido origina la antigenicidad de los grupos sanguíneos Ii y ABO. Sus funciones son el

intercambio de cloro (Cl^+) y bicarbonato (HCO_3^-), contribuye a fijar el esqueleto a la membrana e interacciona con la anquirina, banda 4,1 y la banda 4,2 (14).

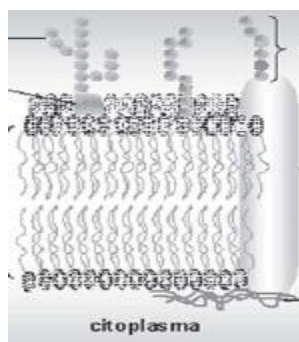


Fig 1. Modelo de la membrana celular. Membrana celular donde se observa la doble capa de lípidos, en ella se encuentran las proteínas integrales en el espesor de la misma. Tomado de Murador P, Deffine E. Aspectos estructurales de membrana eritrocitaria *Rev bras hematol.* 2007;29:169.

CITOESQUELETO

Está formado por un conjunto de proteínas que recubren la superficie interna de la membrana, se encuentra en contacto íntimo con la hemoglobina. Su unión a la membrana se establece por medio de proteínas integrales llamadas banda 3 y glicoforina C. Fig.2. Las proteínas del citoesqueleto tienen funciones diversas, se identifican por medio de electroforesis y se les da una clasificación numérica con base en su peso molecular, las de peso molecular más elevado son las llamadas banda 1 y banda 2 y las de menor peso molecular son banda 7 y banda 8. La base del citoesqueleto está formada por espectrina o banda 1 y 2 y la actina o banda 5 (Tabla 1). Las que tienen función en el mantenimiento son la anquirina, la proteína 4,1, la tropomiosina, tropomodulina y aducina (14).

La espectrina es la proteína más abundante, está formada por 2 subunidades; α o banda 1, y β o banda 2, las cuales se enlazan y adquieren una forma de horquilla. Interacciona con la actina (banda 5), la proteína 4,1 y la anquirina (banda 2,1). La unión espectrina-actina se estabiliza a través de la proteína 4,1. La actina (banda 5) es una proteína globular, se une a la espectrina y estabiliza la unión de sus dos subunidades, requiere a la banda 4,1 para su función (14).

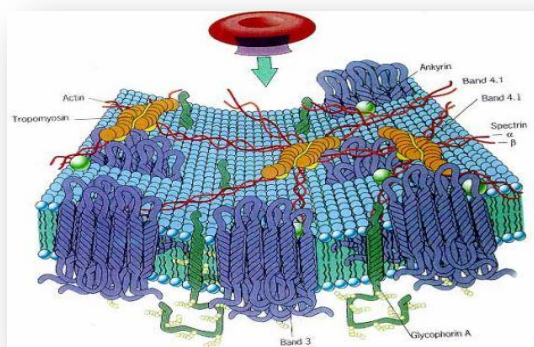


Fig 2. Citoesqueleto en la membrana del eritrocito. El esqueleto está anclado a la cara interna de la membrana del eritrocito, se observa el entrelazado de las proteínas que lo constituyen y su unión a las proteínas periféricas de la membrana. Tomado de Karp 2005

La proteína 4.1 es una fosfoproteína, se encuentra en mayor cantidad en eritrocitos viejos, su función principal es la unión de la membrana del esqueleto de actina-espectrina a la bicapa lipídica facilitando la formación de complejos entre las fibras de espectrina actina y la banda 3, los defectos en esta conducen a Eliptocitosis (3). La proteína 4,2 o palidina es una transglutaminasa. Se fija a la banda 3, a la proteína 4.1 y anquirina, tiene función de transporte de iones y la estabilización entre espectrina-actina-anquirina con la banda 3 (3). Fig 3.

Anquirina o banda 2,1, se encarga de mantener la integridad de la membrana por medio de su unión con la banda 3 y la cadena β de la espectrina. Es importante en la unión del esqueleto a la membrana lipídica (14). Fig 3

Aducina es una fosfoproteína unida a calcio/calmodulina que se localiza en el complejo de unión espectrina-actina, regula el deslizamiento de los filamentos de actina (3). Fig 3.

También hay enzimas como las proteincinasas que se encargan de la fosforilación de la espectrina y la proteína 4,1. Las hidrolasas como acetilcolinesterasa se unen a la membrana mediante un grupo fosfatidilinositol. Las ATPasas tienen función de transporte de iones a través de la membrana, como ejemplos están la ATPasas, Na-K y la bomba Na-K (14).

La acuaporina es un transportador que contribuye con 85% del intercambio osmótico de agua entre ambos lados de la membrana, se encuentra relacionado con el grupo sanguíneo Colton (14).

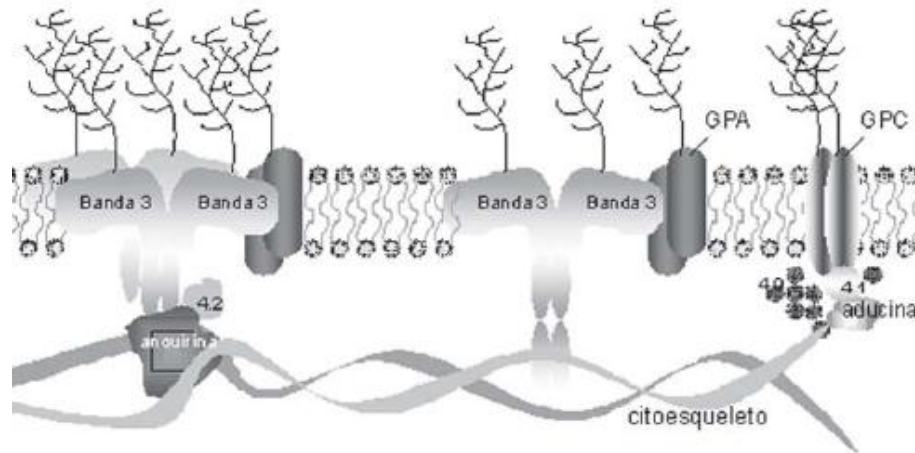


Fig 3. Interacción entre las proteínas del esqueleto entre sí. La alteración de alguna de ellas resulta en el desbalance de la relación superficie/volumen del eritrocito. Tomado de Murador P, Deffine E. Aspectos estructurales de membrana eritrocitaria *Rev. bras. Hematol.* 2007;29:169

Tabla 1. Proteínas más importantes que constituyen el citoesqueleto y su interacción entre sí. Datos obtenidos de Sans-Sabafren 2001.

| PROTEÍNA | INTERACCIÓN | COMENTARIOS |
|--------------|-------------------------------------|---|
| Espectrina | Actina, proteína 4.1 y anquirina | Es la más abundante |
| Actina | Espectrina | Estabiliza a espectrina |
| Proteína 4.1 | Actina-espectrina | Su defecto lleva a Eliptocitosis |
| Proteína 4.2 | Proteína 4.1 y anquirina | Estabiliza espectrina-actina-anquirina con la banda 3 |
| Anquirina | Banda 3 y cadena b de la espectrina | Mantiene integridad de la membrana |
| Aducina | Calcio/calmodulina | Regula el deslizamiento de los filamentos de actina |

HEMOGLOBINA

Es una proteína de 68kDa, formada por 4 subunidades proteicas llamadas globinas, cada una de ellas contienen un grupo hem. Existen 6 tipos de cadenas globinicas que son la α , β , γ , δ , ϵ y ζ . Una molécula de hemoglobina (Hb) contiene 4 de estas cadenas de globina en dos pares. La Hb del adulto

contiene dos cadenas α y dos cadenas β (Fig 4). La cadena α consta de 141 aminoácidos y la cadena β de 146 (14).

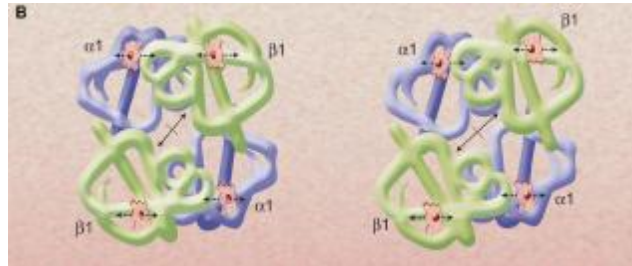


Fig 4. Tetrámero de la hemoglobina adulta. El tetrámero de la Hb adulta consta de dos cadenas de globina β y dos cadenas α . se observa en su interior el grupo hemo que interactúa con los gases sanguíneos. Tomado de Schetcher A. 2008.

Un tetrámero globular está formado por la combinación de dos polipéptidos tipo α que son las cadenas α y ζ , las cadenas del tipo β que son β , γ , δ y ϵ . La síntesis de cada cadena de globina está controlada por distintos genes, los tipo α se localizan en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3), mientras que las cadenas de tipo β se codifican en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5) (11). Por la combinación de estas cadenas se obtienen la Hb Gower 1 ($\zeta 2\epsilon 2$) Gower 2 ($\alpha 2\epsilon 2$) portland ($\zeta 2\gamma 2$) fetal ($\alpha 2\gamma 2$), la Hb adulta ($\alpha 2\beta 2$) y la Hb A2 ($\alpha 2\delta 2$) (16). Fig 5.

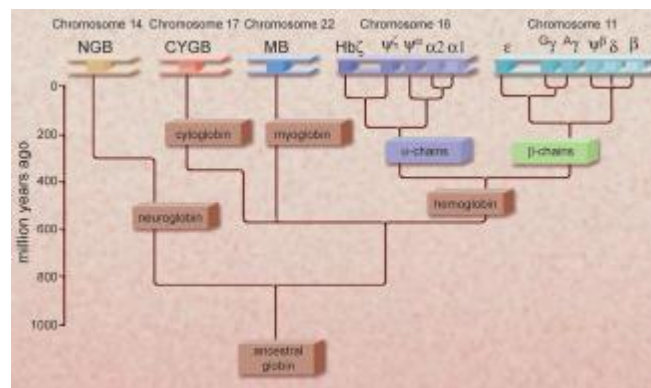


Fig 5. Genes de la globina alfa y beta. Los cromosomas 16 y 11 contienen los genes de las cadenas de globina tipo alfa y tipo beta respectivamente. Tomado de Schetcher A. 2008.

Hay diferentes tipos de Hb según las cadenas globínicas que se presenten. La Hb fetal (HbF) está formada por dos cadenas alfa y dos cadenas gama ($\alpha 2\gamma 2$), la HbA dos cadenas alfa y dos cadenas beta ($\alpha 2\beta 2$). En los

adultos la HbA se encuentra en 97%, la hemoglobina A2 (HbA2) en 2 % y la HbF en 1%, esto refleja los patrones de expresión de los genes de las cadenas α y β (15).

En el feto inicialmente se expresan los genes de la cadena ζ y ϵ , que resultan en la formación de la Hb Gower1, Gower2 y Portland (Tabla 2), su regulación a la baja, es seguida de la expresión de los genes de la cadena α y γ , que forman la HbF, que predomina en el último trimestre de la gestación, al nacimiento los genes de la cadena α permanecen activos, disminuye la expresión del gen γ , y se eleva el de la cadena β formando la HbA y HbA2, en algunos casos puede persistir la cadena γ (15).

Tabla 2. La combinación de las cadenas de globina da lugar a los diferentes tipos de hemoglobina. Datos obtenidos de Sans-Sabafren 2001.

| CADENAS DE GLOBINA | β | γ | δ | ϵ |
|--------------------|---------|----------|----------|------------|
| α | Hb A | Hb F | Hb A2 | Gower 2 |
| ζ | ----- | Portland | ----- | Gower 1 |

Estructura

Las 4 cadenas de globina forman un tetrámero, cada uno con un espacio central en que se localiza un grupo prostético hem, esta es una molécula de protoporfirina IX unido por enlaces no covalentes, el átomo de hierro (Fe) queda protegido del medio acuoso. La unión reversible a estos cuatro átomos de hierro en estado ferroso, permite a la Hb el transporte de gases, por la interacción de los residuos amino terminales (15).

La estructura secundaria de la Hb es estable en α - hélice, contiene 3,6 aminoácidos por giro, con un movimiento traslacional de 1.5Å por aminoácido en relación al eje helicoidal, su estabilidad está dada por puentes de hidrógeno intramoleculares, los cuales son débiles y se pueden romper con el calor (14).

La estructura terciaria (Fig. 6) está dada por el plegamiento de la cadena polipeptídica y de sus estructuras helicoidales. Cada grupo hem se localiza en

una cavidad que está formada por una cadena polipeptídica constituida por aminoácidos hidrofóbicos. En la cadena alfa hay 19 residuos que son las regiones de contacto con el grupo hem, y en la cadena beta son 21 aminoácidos. Los aminoácidos polares, como el ácido aspártico o el ácido glutámico y los grupos básicos como la histidina, lisina o arginina, se localizan en la superficie externa de la cadena plegada (14).

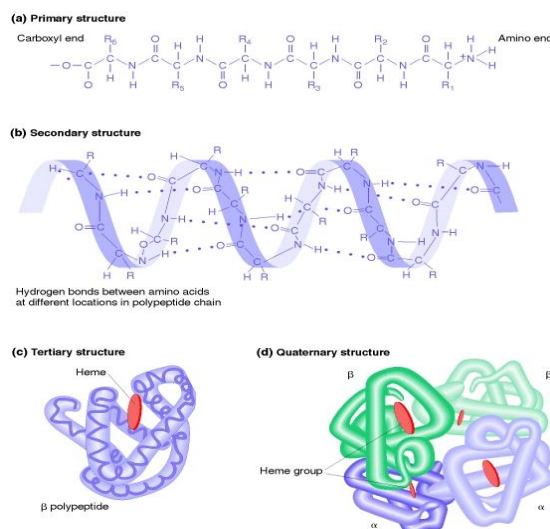


Fig 6. Estructura primaria, secundaria y terciaria de la hemoglobina. Observe la disposición estructural que conlleva a la forma globular de la molécula de hemoglobina desde la estructura primaria a la terciaria. Tomado de www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=dcp2&part=A10761&blobtype=pdf revisado 02/sep/2010.

La estructura cuaternaria se debe a la unión entre sí de las subunidades globulares de la proteína, en esta estructura se localizan las cavidades para el hem y en su región central se localiza el 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) (14).

Las cuatro cadenas dispuestas en forma tetraédrica dan lugar a una estructura elipsoidal. Fig. 7. Entre las cadenas α y β hay contactos que pueden ser α 1- β 1 o α 2- β 2 o α 2- β 1 o α 1- β 2. Se establecen 40 contactos α 1- β 1 idénticos tanto en la molécula oxigenada como en la desoxigenada, los contactos del tipo α 1- β 2 si son diferentes, en la desoxihemoglobina existen 40 incluyendo 19 puentes de hidrógeno y en la oxihemoglobina hay 22 contactos y 12 puentes de hidrógeno, para los contactos α 1- β 2 los aminoácidos son siempre los mismos es por ello que el cambio de alguno de ellos provoca alteraciones funcionales de la Hb (14).

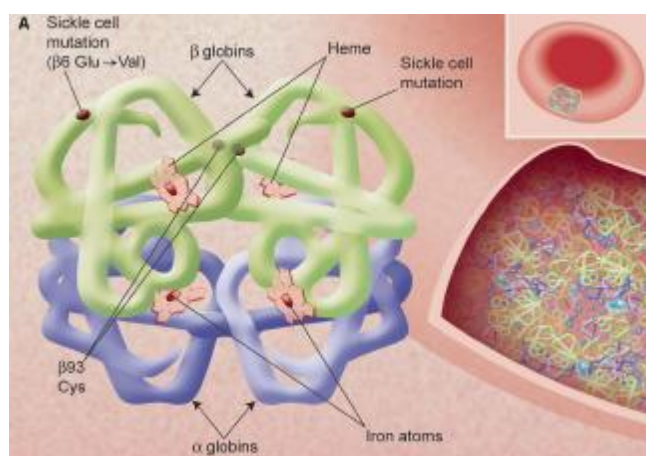


Fig 7. Estructura cuaternaria de la Hb, se observa el sitio de defecto de la drepanocitosis y la localización de los 4 átomos de hierro en los grupos hemo de cada cadena de globina. Tomado de Schetcher A 2008.

En la estructura cuaternaria durante la oxigenación de la hemoglobina el átomo de hierro se introduce en el plano de la porfirina arrastrando la histidina para formar un enlace con el oxígeno. Esta capacidad para enlazar oxígeno depende de 4 grupos prostéticos (no proteicos) que son los grupos hemo. Todos los aminoácidos de la cavidad del grupo hemo son apolares excepto la histidina proximal y la distal. El grupo hemo está formado por una estructura plana cíclica llamada protoporfirina IX y de un átomo de hierro. La protoporfirina está constituida por cuatro anillos pirrólicos unidos entre sí formando un anillo tetrapirrólico. La posición central de este anillo está ocupada por un átomo de hierro en estado reducido (Fe^{++}). El hierro tiene 6 valencias, una de ellas se une a la cadena de globina y la otra fija de manera reversible el oxígeno. El oxígeno se une cuando el hierro se encuentra en estado reducido formando la ferro hemoglobina, y el hierro en estado oxidado (Fe^{+++}) no puede captar oxígeno transformándose en metahemoglobina, cuando la hemoglobina está en forma oxigenada cambia su conformación expandida y cuando libera oxígeno adquiere una forma contraída, esto se debe a que cuando el oxígeno se une al grupo hemo se reduce su diámetro atómico, moviéndose dentro del anillo de porfirina resultando en una inclinación del hemo en la cavidad, se rompen enlaces salinos del extremo c-terminal y cambia la estructura terciaria (14).

Función

De las más conocidas es el transporte de O₂ desde los pulmones a los tejidos y, el CO₂ de los tejidos a los pulmones. También interactúa con otros 2 gases que son el monóxido de carbono (CO) y óxido nítrico (NO). Las propiedades funcionales de la molécula de Hb están determinadas principalmente por la secuencia de aminoácidos en las cadenas de globina (15). Interviene en la regulación del pH sanguíneo debido a su capacidad amortiguadora (14). El CO₂ es producido en el cuerpo, a partir del hem, por medio de la hem oxigenasa y puede por sí mismo activar a la guanilato ciclasa, estas funciones no relacionadas con el oxígeno se han aplicado al estudio de las interacciones de la hemoglobina con el óxido nítrico (15).

HEMOGLOBINOPATIAS

Se da el nombre de hemoglobinopatía a la existencia de un trastorno en la molécula de Hb (14). Las mutaciones genéticas de la molécula de Hb se clasifican en dos grupos que son las estructurales y las de defecto en la síntesis. Las alteraciones estructurales son debidas a la sustitución de un aminoácido en el gen que codifica una de las cadenas de globina, la más común es la drepanocitosis, y la base genética reside en una mutación puntual del DNA. La otra alteración es la de síntesis, donde hay síntesis disminuida o totalmente ausente en alguna de las cadenas de globina, como por ejemplo las talasemias (11).

DREPANOCITOSIS

Historia

La drepanocitosis fue la primera enfermedad en humanos que se caracterizó a nivel molecular (6). En los últimos 60 años la molécula de Hb probablemente haya sido la más estudiada, durante este periodo los pioneros en esta materia fueron Linus Pauling, Max Perutz, Vernon Ingram, Karl Singer, Herman Lehman, William Castle y Ernst Jaffé (15).

En 1910, James Herrick fué el primero en observar las células falciformes en la sangre de un estudiante africano con anemia. En 1927, Hahn y Gillespie demostraron que los glóbulos rojos falciforman en respuesta a una disminución de la tensión de oxígeno. En 1949, Linus Pauling, descubre las bases moleculares de la anemia de células falciformes, describiendo que es debida a una Hb anormal. Posteriormente, el mismo año J. Neel publicó un artículo relacionado con la genética médica. J.B. Haldane hace mas de 50 años, postuló que la mutación que origina la drepanocitosis es producto de incremento en la resistencia a la malaria en personas portadoras o heterocigotos para la enfermedad (15). En 1957 Vernon Ingram, describió la diferencia bioquímica entre la hemoglobina normal y la de los drepanocitos (1), utilizando estudios de electroforesis y cromatografía, y determinó el cambio de un aminoácido en la hemoglobina S (HbS) en comparación con la hemoglobina normal (14). En 1978 Y.W. Kan, realizó estudios sistemáticos de restricción para detectar polimorfismos en el DNA de los genes de la beta globina, afectados en estudios prenatales (15). En el año 2004 Hebbel y Kaul, fueron los primeros en caracterizar un subfenotipo de la drepanocitosis, el cual comprende hipertensión pulmonar, enfermedad vascular cerebral, priapismo y úlceras cutáneas, asociado a la disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico (5).

Incidencia

Cerca de 5% de la población mundial es portadora de genes causantes de hemoglobinopatías, cada año nacen aproximadamente 300 000 niños con hemoglobinopatías, de los cuales más de 200 000 son africanos, con anemia falciforme. En algunas zonas de África, el porcentaje de niños que nacen con este trastorno puede llegar a 2%, la prevalencia del rasgo drepanocítico (portadores sanos que han heredado el gen mutante solamente de uno de los progenitores), oscila entre 10% y 40% en África ecuatorial y disminuye de 1% a 2% en la costa norteafricana (7). Fig 8.

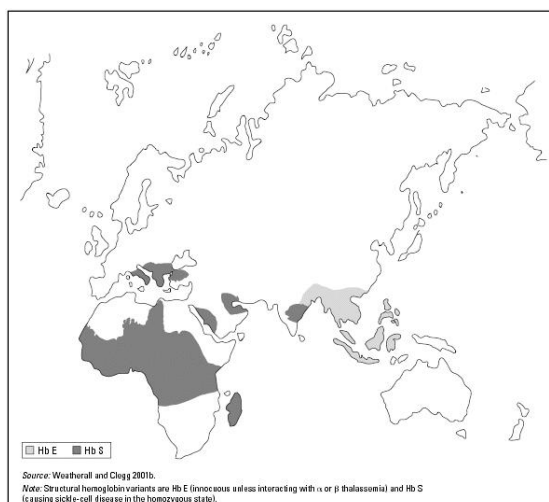


Fig 8. Distribución de la drepanocitosis. La distribución de la drepanocitosis es mundial, siendo más frecuente en el continente africano. En color gris se muestra la mayor incidencia. Tomado de www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=iga&part=A1622 revisado 02/sep/2010.

La supervivencia mediana estimada en los Estados Unidos de América en 1994, era de 42 años para los hombres y 48 años para las mujeres, mientras que en Jamaica, en 2001, era de 53 años para los hombres y 58,5 años para las mujeres. En Jamaica, la mayor mortalidad se registra entre los 6 y 12 meses de vida, que es cuando fallece 10% de los pacientes (7).

En cinco poblaciones mexicanas se hizo un estudio en 162 individuos no relacionados de tres poblaciones nahuas (Atocpan y Tlacotenco, DF, e Ixhuatlancillo, Veracruz), y en 131 mestizos (Coyolillo y Poza Rica, Veracruz), se determinó el tipo de hemoglobina por electroforesis. Entre los nahuas se reconoció un heterocigoto HbAS (0.6%) y 18 en mestizos (13.7%) (13).

La mayor incidencia ocurre en África tropical donde 45% de la población tiene la mutación. También se encuentra en población negra de Estados Unidos y Jamaica, así como también en Grecia, Italia y América Latina. La incidencia en Estados Unidos es de 1 por cada 700 nacimientos (14).

Etiología

La drepanocitosis es una enfermedad de origen genético. También llamada hemoglobinopatía S, enfermedad de células falciformes o anemia falciforme, donde los eritrocitos afectados adquieren forma de hoz en

condiciones de baja tensión de oxígeno . Una célula falciforme es un eritrocito fusiforme en forma de media luna con dos extremos afilados (14).

La Hb S se origina por la sustitución de la base timina por adenina en el codón 6 del gen β de la globina, lo que conduce a la sustitución del aminoácido ácido glutámico por valina ($\beta 6$ glu-val) (Fig. 9). La forma homocigota (HbSS) del gen β de la globina resulta en drepanocitosis, y la forma heterocigota (HbAS) es asintomática, además, estos pacientes adquieren protección contra la malaria (16).

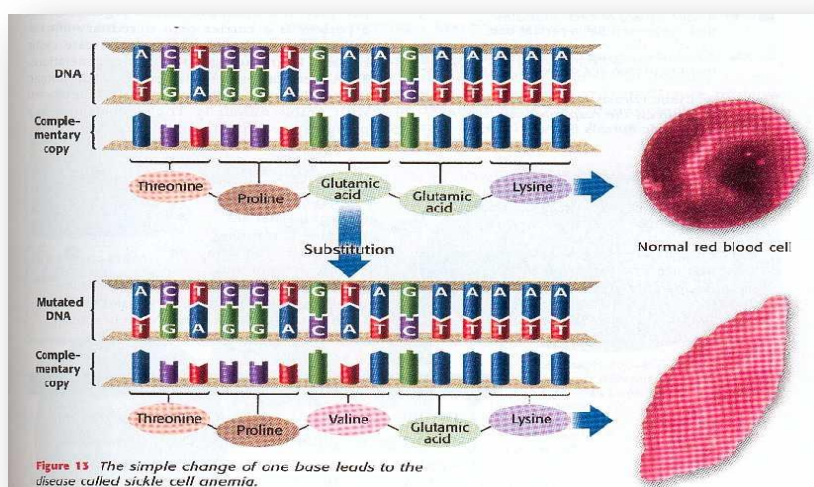


Fig. 9. Gen de la β globina mostrando la mutación que origina la drepanocitosis. Obsérvese el cambio de adenina a timina que ocurre en la drepanocitosis, lo cual codifica para el aminoácido valina, en la cadena beta de la hemoglobina, esta alteración conduce a que el eritrocito adquiera forma de media luna o de hoz. Tomado de Sonati M, 2008.

Este cambio origina la formación de interacciones intermoleculares estables, entre los tetrámeros de Hb intraeritrocitarios con aumento de la concentración de desoxihemoglobina S, este proceso es la base para entender la fisiopatología de la drepanocitosis (15). El aminoácido sustituto se localiza superficialmente, tiene carga eléctrica diferente y menor actividad electroforética (14). Cuando la Hb se desoxigena, se polimeriza formando un gel cristalino llamado cuerpo tactoide, cada polímero está formado por 14 tetrámeros de desoxihemoglobina que se unen entre sí formando haces longitudinales, y modifican la morfología del eritrocito adoptando la forma de hoz o media luna. Este proceso de falciformación se ve favorecido por

descenso de la presión parcial de oxígeno, la concentración de hemoglobina S, disminución de la temperatura y del pH. Los eritrocitos falciformes recuperan su forma en cuanto vuelve a oxigenarse la hemoglobina, y los que no lo logran son destruidos y eliminados por los macrófagos (14). La polimerización de la hemoglobina S desoxigenada provoca daño en la microcirculación (15).

Fisiopatología

En condiciones normales un eritrocito transita en la circulación arterial en 1 a 2 segundos, en la micro circulación en 1 segundo y en la venosa en 15 segundos, por consiguiente un eritrocito atraviesa el pulmón un promedio de 4 veces por minuto (1).

Cuando la Hb S se encuentra en estado desoxigenado, el residuo sustituto de valina en esta molécula participa en un contacto intermolecular, dentro del espacio hidrofóbico, sobre una molécula de hemoglobina cercana, esta interacción conduce a la formación de un polímero de hemoglobina con la subsecuente despolimerización, esta es reversible si las condiciones del ambiente son favorables, la despolimerización se vuelve irreversible si el eritrocito tarda en llegar a una zona con adecuada tensión de oxígeno (Fig.10). La polimerización irreversible solo ocurre en eritrocitos intensamente dañados por oxidación o deshidratación (1).

La polimerización y despolimerización de la hemoglobina en los eritrocitos es un proceso recurrente durante toda su vida; según la teoría cinética de la polimerización de la hemoglobina, existe un periodo de retraso entre la generación de la desoxihemoglobina S y la iniciación de la polimerización, este periodo se sabe es lo suficientemente prolongado para muchos eritrocitos como para alcanzar el pulmón y ser reoxigenado. Si el tiempo de tránsito capilar excede este periodo, el eritrocito falciforme queda detenido causando oclusión física transitoria o permanente, e inicia una cascada de eventos de señalización afectando la hemodinamia (1).

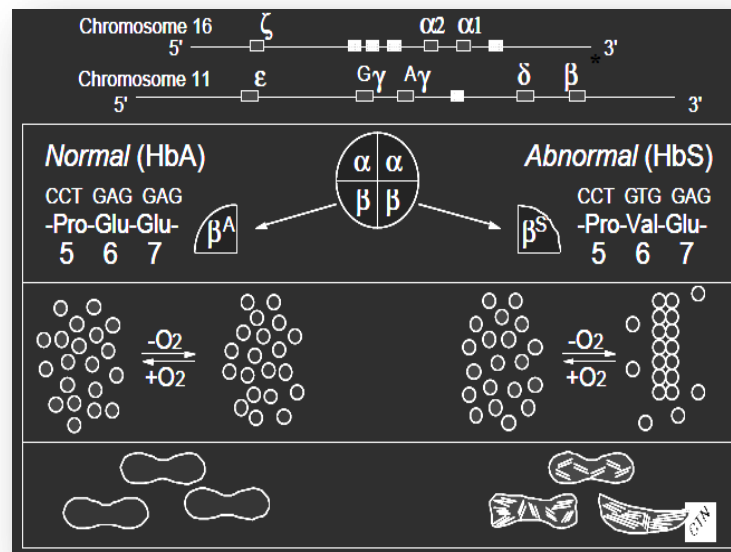


Fig 10. Resumen de los mecanismos implicados en la drepanocitosis. En esta figura podemos resumir en breve los que sucede en la drepanocitosis. En el primer nivel (superior) existe el aminoácido sustituto, en el segundo la formación de la Hb S, en el tercero la formación del polímero de Hb en condiciones normales (izquierda) y en condiciones de baja tensión de oxígeno (derecha), y en el ultimo (inferior) la forma que adquieren los eritrocitos afectados. Tomado de Tom Noguchi Constance NIH.

Después de la desoxigenación, aparece una leve deformación en el borde con desplazamiento de la Hb a una región de la célula. Entonces se alarga y se vuelve rígida debido a la polimerización de la Hb S en barras, las cuales están compuestas por filamentos monomoleculares de 6 a 7 nm, entrelazados en una hélice de 6 filamentos, conforme aumenta la polimerización, estos filamentos sufren alineación con el eje mayor del eritrocito (Fig 11). Si se reoxigena vuelve a su forma normal pero mientras tanto, en este proceso de falciformación y desfalciformación pierde membrana mediante fragmentación, volviéndose irreversible en su forma (14). La polimerización de la Hb S conduce a la desestabilización de la membrana del eritrocito, se produce hemólisis intravascular, liberando hemoglobina al plasma, así como arginasa eritrocitaria, la cual convierte la L-arginina a L-ornitina, esto es importante porque la L-arginina sirve como sustrato para la síntesis de NO (1).

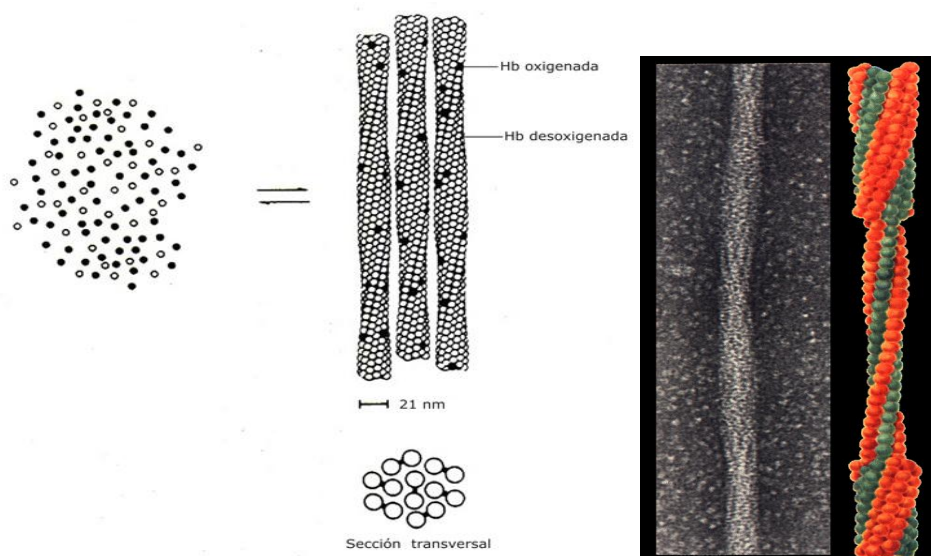


Fig 11. Formación de los cuerpos tactoides en los eritrocitos. Los filamentos del polímero de hemoglobina miden 6 a 7 nm, se entrelazan en 7 pares y forman los cuerpos tactoides dentro del eritrocito, haciendo que adquiera la forma de hoz. Tomado de Svarch E. Fisiopatología de la drepanocitosis *Rev cub hematol inmunol* 2009;25(1):3.

La formación de los cuerpos tactoides en el citoplasma del eritrocito, se acompaña de la formación de sustancias oxidantes, como ion superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales libres, los cuales alteran la estructura de la membrana, la composición y distribución de los fosfolípidos lo que provoca aumento de permeabilidad al potasio y un exceso de calcio intraeritrocitario por el canal de Gardos, también se vuelven fácilmente adheribles al endotelio vascular, facilitado por la trombospondina (TSP), debido a la activación plaquetaria (14).

La inflexibilidad de los eritrocitos les impide pasar a través de la circulación de una manera eficiente, esto provoca su destrucción lo cual conlleva a la aparición de anemia y a vasooclusión intermitentes que causan daño tisular y dolor (6). Los factores que contribuyen con los fenómenos de vasooclusión son la inflamación, activación endotelial, alteración de la membrana del eritrocito, adhesión leucocitaria, activación y agregación plaquetaria, activación de la coagulación y alteración de la biodisponibilidad de factores vasoactivos (16).

Manifestaciones clínicas

En edades tempranas, las manifestaciones clínicas están ausentes debido a que están protegidos por un alto nivel de Hb fetal en las primeras 8 a 10 semanas (3).

Existen dos formas clínicas: la homocigota (HbSS) en la que los pacientes sufren anemia falciforme, con manifestaciones de anemia hemolítica y crisis vasooclusivas, y la forma heterocigota (HbAS) que generalmente es asintomática (14). Existen dos subfenotipos de la enfermedad; uno que se manifiesta por un fenotipo de viscosidad, vasooclusión y otro de disfunción endotelial. En el primero las complicaciones son principalmente consecuencia de la obstrucción vascular por eritrocitos falciformes, la patogénesis se caracteriza por daño de isquemia-reperfusión, adhesión, infarto e inflamación. En el segundo hay anemia hemolítica, hipertensión pulmonar, hipertensión sistólica sistémica, úlcera cutánea en miembros pélvicos, asma y muerte súbita (12).

Las manifestaciones las podemos dividir en:

Crisis vasooclusivas son las más frecuentes, pueden aparecer diario o hasta una vez al año y aparecen por obstrucción del flujo sanguíneo, hay hipoxia tisular lo que genera dolor (Fig 12). Puede afectar cualquier parte del organismo, pero principalmente en huesos, tórax y abdomen, también en bazo o vasos cerebrales.

Crisis aplásicas ocurren por la hemólisis o por depresión de la eritropoyesis a causa de una infección por parvovirus B19, hay disminución de reticulocitos con la producción ineficiente de eritrocitos.

Crisis de secuestro se observan en niños pequeños y aparece por almacenamiento súbito masivo de eritrocitos en hígado o bazo, aparecen hepatomegalia o esplenomegalia, hay disminución en el nivel de Hb, riesgo de choque hipovolémico, falla cardiovascular y muerte.

Crisis hemolítica está dada por una crisis de acortamiento de la vida media del eritrocito, aparece ictericia, disminución de la Hb, aumento de reticulocitos (3).

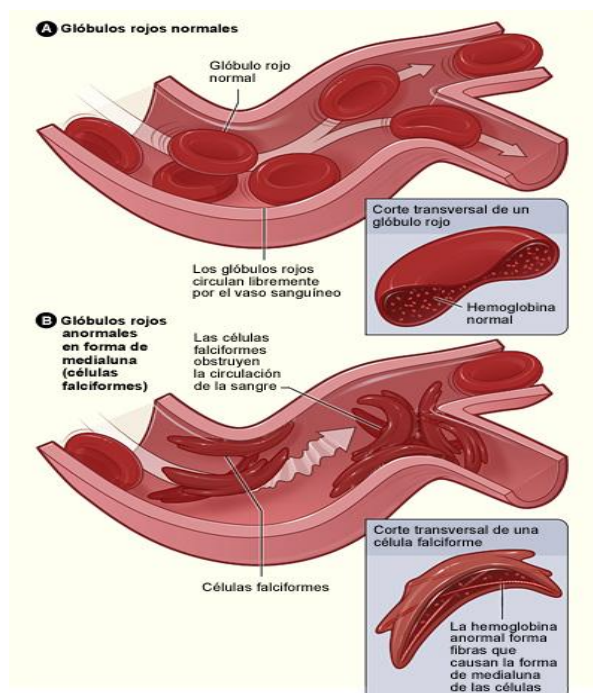


Fig 12. Formación de cúmulos de células falciformes que bloquean la circulación sanguínea. En condiciones normales un eritrocito se deforma para atravesar la circulación sanguínea, en la imagen inferior los drepanocitos, que no se deforman, bloquean la circulación, lo que produce las crisis vasooclusivas y dolor en la región afectada. Tomado de www.nhlbi.nih.gov/health/dci/diseases/sca/SCA-what.html. consultado 02/Sep/2010.

Alrededor del 25% de los episodios vasooclusivos está asociado a estrés físico, especialmente infecciones, por esta razón los pacientes con crisis agudas deben tener una evaluación acerca de signos y síntomas de infección, incluyendo pulmonar, urinaria, biliar, cutánea u otras sistémicas. Otros factores incluyen en 75% estrés emocional o físico, deshidratación o cambios de temperatura ambiental (17).

Otras manifestaciones son retraso del crecimiento, alteraciones óseas como ensanchamiento óseo, dactilitis por necrosis avascular, necrosis de la cabeza del fémur, síntomas parecidos a osteomielitis o artritis, pérdida de la capacidad de concentración de la orina, necrosis papilar renal, insuficiencia renal, priapismo, colestasis intrahepática, obstrucción de vasos retinianos, desprendimiento de retina, ceguera, úlceras en piernas, y propensión a infecciones como neumonía (3).

Entre las complicaciones crónicas se encuentran anemia hemolítica crónica, episodios intermitentes de vasooclusión y dolor, aumento del riesgo de infecciones debido a auto esplenectomía, síndrome torácico agudo, accidente vascular cerebral, retinopatía, hipertensión pulmonar y daño orgánico (16).

ALTERACIONES DE LA MEMBRANA

Las alteraciones de los lípidos y las proteínas de la membrana eritrocitaria, conducen a apoptosis durante la eritropoyesis, o a muerte temprana del eritrocito dentro de la circulación sanguínea. Las mutaciones de la cadena de globina en las hemoglobinopatías como drepanocitosis o talasemia, tienen un gran efecto en la membrana del eritrocito (9).

La alteración de la Hb produce un aumento del estrés oxidativo de la célula, la cual requiere mayor actividad del sistema antioxidante y reparación del daño para mantener la viabilidad de la membrana plasmática. Este aumento del estrés oxidativo interviene en la apoptosis de la célula durante su desarrollo, reduciendo su vida media en la circulación (9).

En la drepanocitosis existen reportes que indican evidencia de oxidación de lípidos, sugiriendo que la reparación de fosfolípidos no es eficiente como para mantener la composición molecular de los mismos. La composición de fosfolípidos es mantenida durante toda la vida, debido a que los ácidos grasos son tomados directamente del plasma, y estos dependen de la dieta. El proceso es activado por acetil coenzima A dependiente de ATP que interviene en el remplazo de los ácidos grasos de la membrana provenientes del plasma. Este proceso de reparación se encuentra aumentado en la drepanocitosis, lo que conlleva a ser ineficiente y por tanto, no repara el daño de la membrana (9).

Fosfatidilserina

La asimetría en la distribución de los aminofosfolípidos, como la fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, es característica de las células eucariotas. La exposición de fosfatidilserina en la superficie celular es un proceso normal en las plaquetas activadas y actúa en la hemostasia para organización de factores de la coagulación. Las células con fosfatidilserina expuesta en su superficie, son reconocidas por macrófagos en la apoptosis temprana, y removidas de la circulación. Cuando los eritrocitos dañados no son removidos rápidamente pueden inducir imbalance en la hemostasia e interactuar con otras células sanguíneas y endoteliales. Los aminofosfolípidos se mantienen en el interior de la membrana gracias a un transportador

dependiente de ATP llamado flipasa, esta familia de ATP asas funcionan como una traslocasa de aminofosfolípidos a través de la membrana (9).

También hay otras proteínas que se han identificado como transportadores de lípidos, desde el interior hasta el exterior de la membrana, por medio de un proceso activo bidireccional. Cuando existe aumento de calcio en el citoplasma disminuye la actividad de la flipasa e incrementa la de la escramblasa, lo cual provoca la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular. Durante la activación plaquetaria es esencial la exposición de fosfatidilserina, ya que forma el complejo protrombinasa, luego la protrombina es escindida a trombina, un paso importante en el proceso de coagulación. Por otro lado la exposición de fosfatidilserina sobre las membranas plasmáticas, conduce a estado protrombótico, también es un activador del reconocimiento y remoción de células en apoptosis por los macrófagos. Podemos decir que hay tres procesos implicados en la apoptosis; el calcio citoplásmico, estrés oxidativo y exposición de fosfatidilserina en la membrana del eritrocito (9).

OXIDO NITRICO

Es un gas soluble, con una vida media de pocos segundos, es producido por la mayoría de las células en mamíferos, incluyendo el endotelio vascular, células de musculo liso, macrófagos, neutrófilos, plaquetas y epitelios (1). Se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina, por acción de la enzima oxido nítrico sintetasa (NOS), su función primaria es la vasodilatación y mantener el tono vascular sistémico y pulmonar. Una vez formado difunde a las células de musculo liso cercano, donde reacciona con el ion ferroso del grupo hem de la hemoglobina, por la guanilato ciclasa lo que produce aumento de la síntesis de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) a partir de guanosin trifosfato (GTP), el GMPc activa la protein cinasa G, la cual estimula la ATP asa dependiente de calcio, que llena los depósitos de calcio intracelulares, disminuyendo la concentración del mismo dentro del eritrocito, esto produce relajación del musculo liso y por lo tanto, vasodilatación (1) Fig 13. También es un importante inhibidor de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (7).

Los niveles reducidos de calcio intracelular en las plaquetas, conducen a disminución de la expresión de P-selectina y la conformación activa de la glicoproteína IIb/IIIa (GpIIb/IIIa), requerido para la unión del fibrinógeno (1).

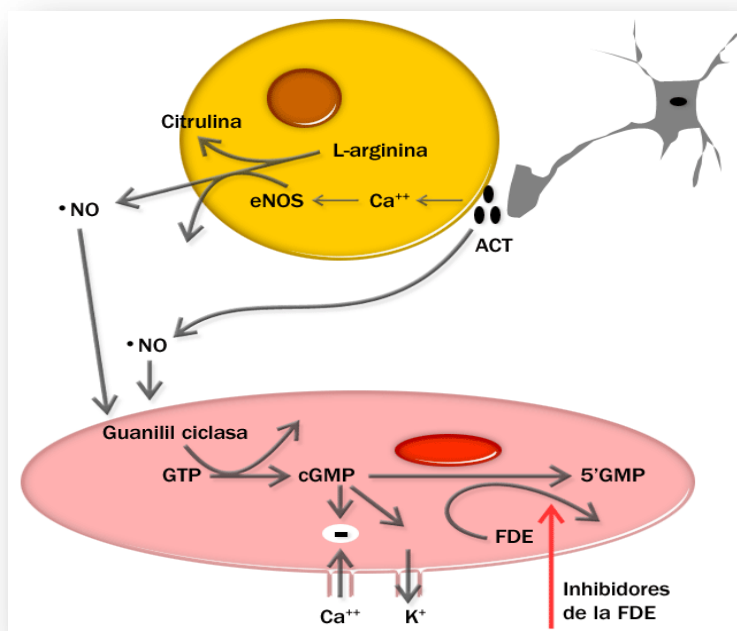


Fig 13. Síntesis y formación del NO. La síntesis de NO inicia con la arginina, difunde al endotelio y activa a la guanilato ciclasa por GMPc, su función es la relajación endotelial entre otras. Tomado de Aslan M, Freeman B. 2007

Es una molécula de señalización celular que se activa a través de la producción de la guanilato ciclasa por GMPc. Es particularmente importante en los mamíferos en la regulación del tono vascular, interacciones celulares y función neural. El óxido nítrico (NO) reacciona con la oxihemoglobina para producir metahemoglobina, hierro férrico y iones nitrato (Fig.14). Estudios recientes sugieren que la mayoría de la metahemoglobina de los eritrocitos circulantes se deriva de este proceso de oxidación, que es reversible, gracias al sistema eritrocitario de la metahemoglobina reductasa.

Otra reacción es la del NO con la desoxihemoglobina para formar nitrosilhemoglobina con el NO unido al átomo de hierro ferroso, esta reacción es irreversible. Existe una tercera reacción que es la unión de NO al aminoácido cisteína de la cadena β en la posición 93, y formar la S-nitrosilhemoglobina, esto sugiere que la S-nitrosilhemoglobina puede disociarse

para liberar NO en concentraciones bajas de O₂, por lo que este puede ser un mecanismo que promueve la dilatación vascular, incremento del flujo sanguíneo y entrega de oxígeno. Los iones nitrito dentro de los eritrocitos pueden ser reducidos a óxido nítrico por la desoxihemoglobina, entonces el óxido nítrico generado permite a los eritrocitos entrar a regiones de hipoxia relativa (15).

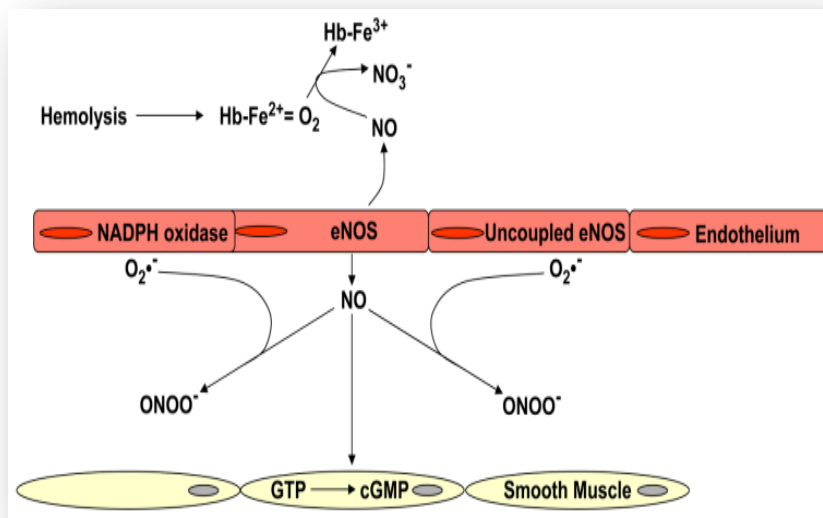


Fig 14. Reacción de los eritrocitos hemolizados con el NO. La hemoglobina proveniente de los eritrocitos hemolizados reacciona con el NO, lo que provoca que la cantidad destinada a la relajación endotelial este disminuida y por lo tanto no hay vasodilatación, además produce especies reactivas del oxígeno. Tomado de Aslan M, Freeman B. 2007.

Su función de antagonista de la inflamación se debe a inhibición de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), por medio de inducción de la expresión de su inhibidor, él I κ B α y la estabilización del complejo NF- κ B/I κ B α . El NF- κ B controla la expresión de una variedad de genes involucrados en la inflamación y en la respuesta inmune (1).

Los niveles bajos observados en drepanocitosis, son el resultado de varios sucesos, como la hemólisis intravascular, incremento del consumo por el exceso de especies reactivas de oxígeno producidos en plasma y endotelio, y también por una reacción con la hemoglobina libre en plasma que se libera durante la hemólisis. Ésta reducción de la biodisponibilidad del NO produce

vasoconstricción, incremento de la activación plaquetaria y expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales (16).

La hemólisis del eritrocito inicia un ataque global a la vía arginina-óxido nítrico. En condiciones normales, la Hb está a salvo dentro de la membrana plasmática del eritrocito, sin embargo, durante la hemólisis ésta es liberada al plasma donde rápidamente reacciona con NO y lo destruye. Esto provoca un alto consumo de NO y la formación de especies reactivas del oxígeno que inhiben la vasodilatación (12). Fig.15.

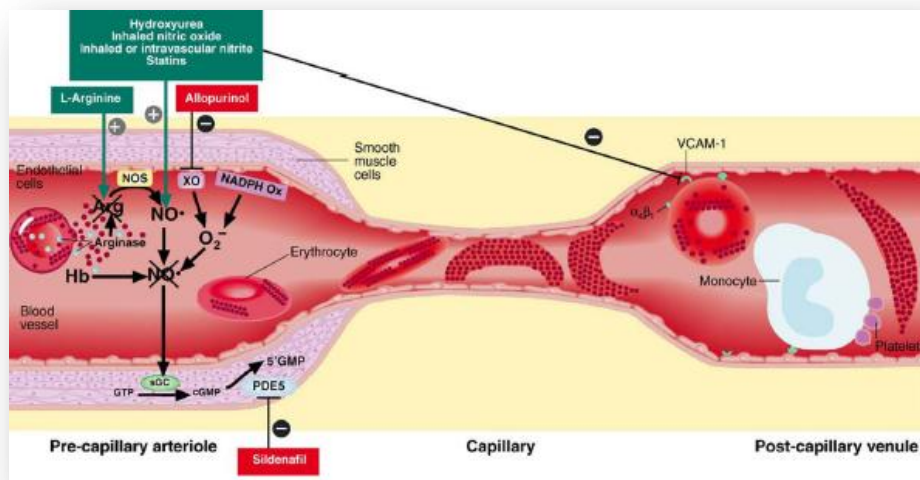


Fig 15. La baja disponibilidad de NO impide la vasodilatación en la drepanocitosis. Los eritrocitos en forma de hoz obstruyen la circulación sanguínea. Estos eventos son los iniciadores de la oclusión vascular que hay en la drepanocitosis. Tomado de Gladwin M 2005.

La destrucción del NO causa daño en la función endotelial por activación de moléculas de adhesión incluyendo VCAM-1, E-selectina y endotelina-1, este último es un potente vasoconstrictor. La liberación simultánea de arginina eritrocitaria durante la hemólisis, limita la disponibilidad de la arginina para la NOS contribuyendo a la deficiencia del NO (12).

ARGININA Y ARGINASA

En condiciones normales la L-arginina es convertida por la NOS a NO y citrulina, el NO difunde a la célula muscular lisa, donde se une a su principal receptor que es la guanilato ciclasa (sGC), esta convierte al GTP a GMPc induciendo relajación del musculo liso y vasodilatación a través de múltiples mecanismos. En el músculo liso vascular pulmonar la fosfodiesterasa-5 (PDE5) hidroliza GTP a 5'GMP (3).

Cuando la arginina es catalizada a NO, la NOS forma un producto intermediario que es la N-hidroxi L-arginina (NOHA), la cual es un potente inhibidor de la arginasa, esta refleja el complicado mecanismo del mantenimiento de la homeostasis. La disponibilidad de la arginina se encuentra disminuida también en pacientes con disfunción renal, debido a que en el riñón ocurre síntesis *de novo* de arginina a partir de citrulina (12).

La arginasa es una enzima esencial del ciclo de la urea, responsable de la conversión de la arginina a ornitina y urea. La NOS y la arginasa son enzimas que pueden ser expresadas simultáneamente bajo condiciones de inflamación, lo que provoca la competencia de ambas por su sustrato común. Hay dos tipos de arginasa identificados; la tipo 1 es citosólica y se encuentra en gran cantidad en hígado y eritrocitos, la tipo 2 es una enzima mitocondrial, se encuentra principalmente en riñón, próstata, testículos e intestino delgado. La actividad de la arginasa plasmática esta elevada en la drepanocitosis como consecuencia de inflamación, disfunción hepática y principalmente, por la liberación de la misma a partir de los eritrocitos durante la hemólisis (12). La arginasa es una enzima intraeritrocitaria que, durante la hemólisis se libera al plasma y, redirige el metabolismo de la L-arginina a L-ornitina y formación de L-prolina, la cual es esencial para el crecimiento de células musculares lisas y síntesis de colágeno (Fig 16). También la inducción de la arginasa promueve el remodelado aberrante de vasos sanguíneos y, formación de la intima de los mismos (12).

La prolina es un aminoácido que se ve involucrado en la fibrosis pulmonar, remodelado de vías aéreas y proliferación de músculo liso vascular, que son características comunes en la drepanocitosis, estas complicaciones

pulmonares comprometen la oxigenación y contribuyen al círculo vicioso de la falciformación de los eritrocitos (12).

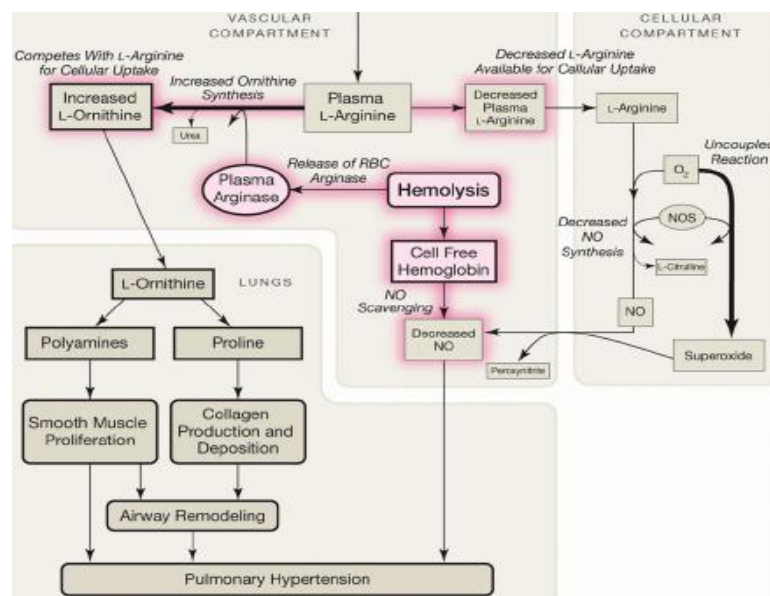


Fig 16. Metabolismo de la L-arginina. La fuente de la L-arginina del plasma es la síntesis renal a partir de citulina, recambio proteico y la dieta. Tomado de Morris Et al. *JAMA* 2005;294(1):81-90

FACTOR TISULAR

El factor tisular es una glicoproteína transmembranal de 47 kDa, es un potente estimulador de la vía extrínseca de la cascada de coagulación y un mediador esencial de la coagulación, se expresa en la superficie de células mononucleares y endoteliales, es estimulado por bacterias, productos bacterianos o citocinas proinflamatorias (18). Es un activador enzimático que forma un complejo catalítico con el factor VIIa, e inicia la cascada de coagulación por activación de los factores IX y X, con el resultado final de la formación de trombina (Fig.17). Se puede encontrar aumentado en la adventicia de vasos sanguíneos y en la placa de ateroma. El factor tisular biológicamente activo se encuentra en la circulación sanguínea y pared de vasos sanguíneos. Se puede encontrar aumentado en síndromes protrombóticos como infarto de miocardio, síndrome antifosfolípidos y drepanocitosis (4).

El factor tisular (FT) está presente en la superficie celular como una proteína de membrana. Bajo condiciones normales, las células no vasculares presentan un factor tisular activo, sin embargo, células endoteliales, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, pueden ser inducidos a producirlo. Los mediadores inflamatorios que están incrementados en el plasma de pacientes con drepanocitosis como IL-1, TNF- α y proteína C reactiva, pueden inducir la síntesis del FT en monocitos y células endoteliales, además que las células endoteliales circulantes expresan cantidades elevadas de FT en drepanocitosis (1). La interacción del factor tisular con el factor VIIa provoca la hidrólisis de los factores IX y X, e inicia la cascada de la coagulación. La presencia de fosfatidilserina en vesículas cubiertas de factor tisular aumenta la hidrólisis del factor X. La fosfatidilserina expuesta en la superficie de los eritrocitos provee un medio ambiente para la activación del FT y aumenta la actividad coagulante asociada con la enfermedad (11). Una vez hidrolizado el factor Xa por la vía del factor tisular, forma un complejo protrombinasa con el factor Va, y participa en la escisión de la protrombina a trombina y fragmento 1.2. El incremento de las concentraciones plasmáticas del fragmento 1.2 de la protrombina, y los niveles reducidos del factor V en pacientes con drepanocitosis, sugiere incremento en la generación de trombina. La trombina escinde los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno para formar monómeros de fibrina que polimerizan espontáneamente y forman el coagulo de fibrina. Los niveles altos de fibrinopéptido A, encontrados en drepanocitosis, indican la presencia del aumento de la proteólisis del fibrinógeno. La degradación de la fibrina por la plasmina produce el dímero D, que se utiliza como marcador serológico de la coagulación (1).

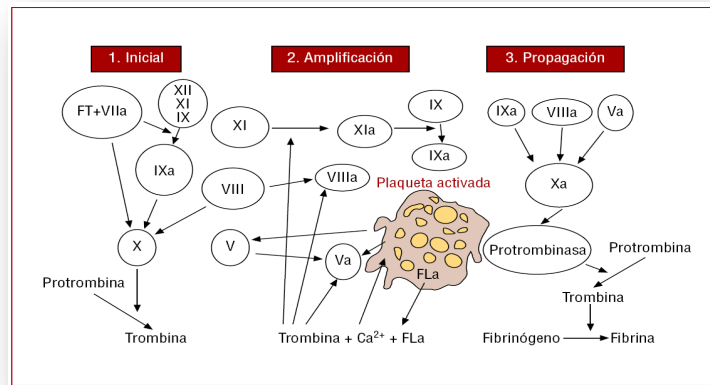


Fig 17. Fases de la coagulación sanguínea. La cascada de coagulación inicia con el complejo FT-VIIa, un exceso de FT provoca un estado protrombótico en pacientes con drepanocitosis. Tomado de Aslan M, Freeman B, 2007.

Los marcadores plasmáticos de la fibrinólisis como el dímero D y el complejo plasmina antiplasmina, se han reportado elevados en pacientes asintomáticos con drepanocitosis. El complejo factor tisular-factor VII activado (FT-FVIIa), es el iniciador fisiológico de la hemostasia y en la drepanocitosis, existe una expresión anormal del factor tisular cuya expresión se encuentra elevada durante los episodios de dolor, además la actividad procoagulante y el antígeno del factor tisular se encuentran elevados. Existen numerosos factores plasmáticos que pueden incrementar la expresión del factor tisular en células endoteliales o hematopoyéticas, como trombina, IL-1, TNF- α y endotoxina, las cuales se encuentran aumentadas en la drepanocitosis (2). Fig 18.

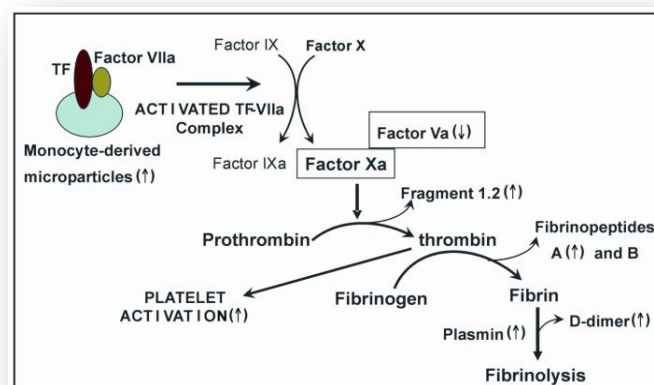


Fig 18. Vías de la coagulación y fibrinólisis. El fragmento 1.2, el fibrinopéptido A y el dímero D que derivan de los pasos de la cascada de la coagulación, pueden servir como marcadores del estado procoagulante. Tomado de Aslan M, Freeman B, 2007.

HIDRATACION CELULAR

La membrana eritrocitaria tiene varias vías que mantienen la hidratación celular, los dos más importantes son el sistema de cotransporte K-Cl y el otro, es el canal de Gardos (16). Fig 19.

El cotransportador de K-Cl cuando se activa, permite la salida de K y Cl seguido por agua, provocando deshidratación, en la drepanocitosis esta vía se encuentra anormalmente activada, conduciendo un incremento de la concentración celular de Hb S y su polimerización (16).

El canal Gardos es una bomba de flujo de salida, se activa por un incremento intracelular de calcio debido a la desoxigenación y falciformación de los eritrocitos (16). El aumento de Ca intracelular provoca pérdida selectiva de K (14). La endotelina-1 y la prostaglandina E alteran la cinética del canal Gardos, lo que provoca deshidratación y polimerización de la Hb S (7). La endotelina-1 activa los canales de Gardos en eritrocitos, su efecto puede promover la deshidratación de los mismos, facilitar su falciformación y aumentar su adhesividad (5).

Las acuaporinas son proteínas de canal de la membrana que sirven como poros selectivos, a través de los cuales, el agua cruza la membrana plasmática, contribuye a la capacidad del eritrocito para ajustarse rápidamente a los cambios de osmolaridad (14).

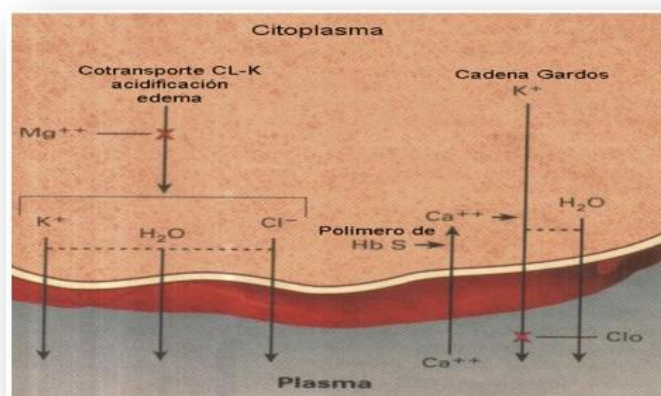


Fig 19. El cotransportador Cl-K y el canal de Gardos. Se ven afectados en la drepanocitosis, su funcionamiento aumentado conlleva al daño celular por deshidratación. Tomado de Bunn H, *N Engl J Med* 1997;337:762-769

ENDOTELIO

Los eritrocitos son más adherentes al endotelio vascular y a proteínas de matriz extracelular, esta adhesión está mediada por receptores de superficie como VCAM, CD47, ICAM-4 y fosfatidilserina, además los niveles altos de reticulocitos que sobreexpresan CD36 y VLA-4 incrementan la adhesión endotelial. También existe la hipótesis de que la producción incrementada de eritroblastos, debido a la anemia crónica, eleva los niveles del factor de crecimiento placentario (PIGF), el cual activa a los monocitos y al endotelio y contribuye a la vasooclusión (16).

La afectación que tiene la pared de los vasos sanguíneos es una consecuencia indirecta de la polimerización de la hemoglobina dentro de los eritrocitos (5). La interacción eritrocito-endotelio es mediada por moléculas de adhesión expresadas tanto en eritrocitos como en la membrana endotelial, por la interacción VLA-4-VCAM-1 existe incremento de la expresión e inducción de las moléculas que se expresan en el eritrocito, como VLA-4 y glucoproteína Lutheran (Gp Lu), en leucocitos se expresa ICAM-1, y en el endotelio VCAM-1, ICAM-1 y CD34 (10).

Por si solo el endotelio se encuentra anormalmente activado, existe aumento de expresión de las moléculas de adhesión, como VCAM-1 y tromboplastina, lo cual es el resultado de la elevación de citocinas inflamatorias en el plasma, proteínas de adhesión como E-selectina, P-selectina, laminina, fibronectina y la integrina $\alpha V \beta 3$ que interactúan con los receptores de adhesión expresados en los eritrocitos y leucocitos, provocando vasooclusión (16).

Los reticulocitos expresan CD36 y $\alpha 4 \beta 1$ integrina, los cuales son capaces de unirse a trombospondina y fibronectina respectivamente (9). Los reticulocitos participan en interacciones adhesivas mediadas por el incremento de niveles de la integrina VLA-4 y glicoproteína de membrana IV (CD36), ambas moléculas median la adhesión de los reticulocitos a diferentes ligandos vasculares. VLA-4 se une a VCAM-1 y a fibronectina, una proteína abundante en la matriz extracelular que está limitada a la superficie del endotelio activado. CD36 media la adhesión a través de un puente de trombospondina (TSP) a la

integrina $\alpha_V\beta_3$ en el endotelio microvascular y vasos sanguíneos activados (1).Fig 20.

La trombospondina (TSP) es una proteína presente en la circulación, y en la matriz subendotelial; en la circulación normalmente es secuestrada en los gránulos α plaquetarios, y una vez ocurrida la activación, se libera al plasma y aumenta la concentración plasmática de TSP soluble en drepanocitosis. La TSP se une a CD47 (proteína asociada a integrina o PAI) expresada en los eritrocitos, la adhesión a la TSP en eritrocitos normales y células falciformes. La TSP subendotelial es un sustrato primario adhesivo de las células endoteliales, puede estar expuesto a células del torrente sanguíneo, como resultado del daño vascular inherente en pacientes con drepanocitosis. Tanto los eritrocitos normales como los falciformes expresan la misma cantidad de CD47, sin embargo la adhesión de TSP difiere entre ellas. En condiciones de flujo sanguíneo basal CD47 es una molécula de adhesión primaria en eritrocitos falciformes para TSP subendotelial, mientras que en eritrocitos normales no es así, esto parece ser explicado porque la TSP soluble puede regular la actividad de CD47 para adherirse a la TSP subendotelial. CD47 media la adhesión de reticulocitos a TSP subendotelial a través de la activación de la integrina VLA-4 (11).

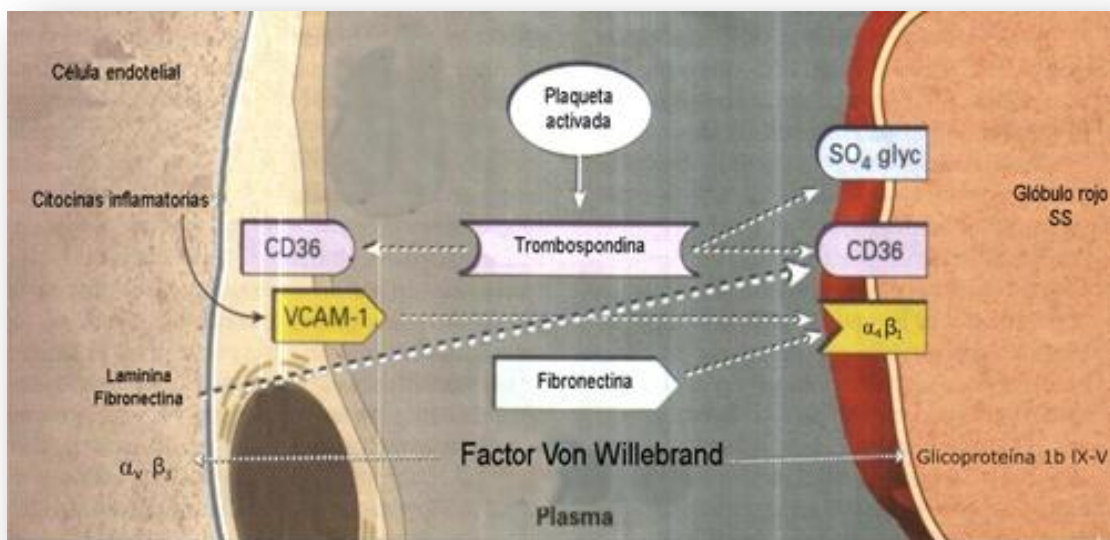


Fig 20. Interacciones del eritrocito con el endotelio vascular. Las interacciones del eritrocito y el endotelio se llevan a cabo a través de moléculas de adhesión con expresión aumentada. Tomado de Bunn H, *N Engl J Med* 1997;337:762-769.

Los eritrocitos falciformes expresan moléculas de adhesión, en eritrocitos maduros se observa aumento de expresión de los niveles de la Gp Lu de grupo sanguíneo y la glicoproteína Lw. La Gp Lu se une a la laminina, que es una proteína de matriz extracelular distribuida en los vasos sanguíneos. El daño endotelial permite la adherencia de eritrocitos a los elementos expuestos en la matriz (1).

La glicoproteína Lw elevada en los eritrocitos, es homologa a los miembros de la familia de moléculas de adhesión intercelulares, como el ICAM-4, diversos estudios han mostrado que la glicoproteína Lw se asocia con integrinas específicas expresadas en los leucocitos, como LFA-1, Mac-1 y en plaquetas como α IIb, β 3 requiriendo una significancia fisiológica de ICAM-4 y mediado por la interacción plaqueta-eritrocito en hemostasia y trombosis (1). Fig 21.

La endotelina-1 es una hormona peptídica, es el más potente vasoconstrictor conocido en el humano. Ejerce su acción a través del receptor de endotelina-1 A (ETA) y en la médula renal a través del receptor de endotelina B (ETB), el bloqueo de estos receptores se ha usado como estrategia para el tratamiento de hipertensión pulmonar. El bloqueo del receptor de endotelina reduce la activación del canal de Gardos (8).

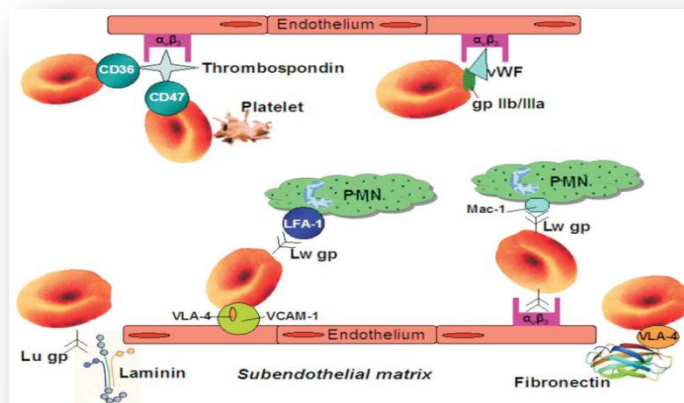


Fig 21. Interacciones de los eritrocitos en el endotelio. Los eritrocitos se adhieren al endotelio a través de moléculas como trombospondina, Factor Von Willebrand, Gp Lw, laminina y fibronectina. También ocurre quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares lo que aumenta aun más la inflamación. Tomado de Aslan M, Freeman B 2007.

COAGULOPATÍA

La activación de la coagulación puede ser un efecto debido a la disminución del NO. La exposición de fosfatidilserina en los eritrocitos induce incremento en la expresión del FT. El NO tiene la propiedad de inhibir la activación plaquetaria, la expresión del FT y la generación de trombina, es por ello que la hemólisis intravascular tiene el potencial de conducir a un estado procoagulante (12).

Algunos componentes de la hemostasia como función plaquetaria, sistema procoagulante, sistema anticoagulante y sistema fibrinolítico, se encuentran alterados hacia el estado procoagulante. La asimetría anormal de la membrana fosfolípida de los eritrocitos es mantenida por acción de una traslocasa de aminofosfolípidos dependiente de ATP, llamada flipasa, que transporta fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina del exterior al interior de la membrana, y la escramblasa cuando se activa por un flujo dependiente de Ca se transportan los aminofosfolípidos en ambas direcciones (2).

La exposición anormal de fosfatidilserina puede ocurrir debido a los repetidos ciclos de falciformación y desfalciformación del eritrocito, causada por la polimerización y despolimerización de la Hb S. La actividad de la flipasa se encuentra disminuida debido al estrés oxidativo. Esta exposición de la fosfatidilserina es un sitio blanco para el complejo enzimático involucrado en las vías de coagulación y anticoagulación, además se alteran las propiedades adhesivas del eritrocito. Los niveles plasmáticos del fragmento 1.2 de la protrombina están asociados con el número de eritrocitos circulantes con la fosfatidilserina expuesta, así como los niveles del dímero-D y el complejo plasmina-antiplasmina (2).

En condiciones de estasis eritrocitaria, existe un efecto proactivador de la IL-8 en la estimulación, lo que favorece la adhesión celular y la migración transendotelial. La estimulación de la L-selectina favorece el rodamiento y reclutamiento de los neutrófilos (10).

Existe disminución de los niveles de proteínas anticoagulantes naturales como proteína C y proteína S, esto puede ser consecuencia de tres factores; el

primero es el consumo crónico de los mismos debido al incremento en la generación de trombina resultante de la expresión intravascular del factor tisular y actividad protrombinasa de los eritrocitos, el segundo es incremento de la unión de la proteína S a los eritrocitos con la fosfatidilserina expuesta, y el tercero, es la inhibición de la unión de la proteína S a la β 2-glicoproteína 1 por anticuerpos antifosfolipidos, lo que provoca la inactivación de la proteína S por la proteína circulante C4b de unión (2).

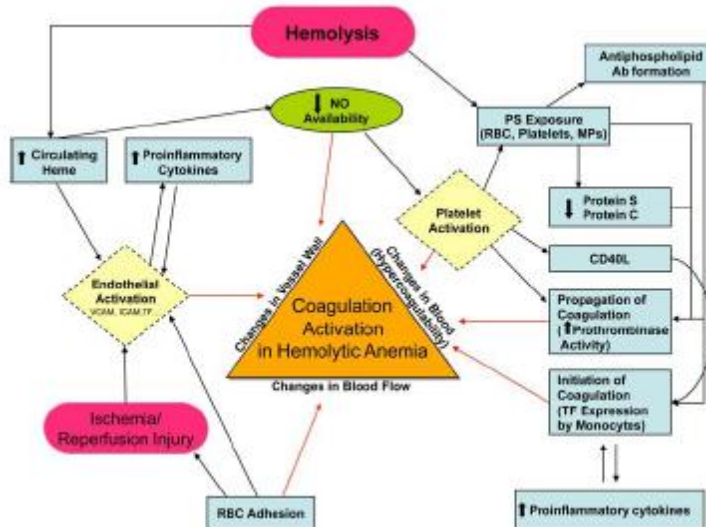


Fig 22. Citocinas en drepanocitosis .Las citocinas de la inflamación se involucran en la aparición del estado procoagulante en la drepanocitosis. Tomado de Ataga K, Key N, 2007.

INFLAMACION

Algunos marcadores de la inflamación se encuentran elevados en la drepanocitosis como el $\text{TNF-}\alpha$, proteína C reactiva e IL-1 e IL-8 (Fig. 22). También se encuentran elevados los mediadores de activación endotelial como VCAM-1, endotelina 1 y SCD 40L. Otros marcadores elevados son el factor de von Willebrand (FVW) y el factor VII, esto provoca generación crónica de trombina con niveles de dímero-D elevados y el complejo trombina-antitrombina (17). Los niveles de deshidrogenasa láctica (LDH) se encuentran elevados y puede ser útil como marcador de la hemoglobinemia (8).

Un recuento elevado de leucocitos es un factor de riesgo para la gravedad de síndrome torácico agudo e infartos cerebrales. Las crisis vasooclusivas frecuentes, y la isquemia tisular inducen una respuesta

inflamatoria continua, y una de las características más importantes de la inflamación es la migración de leucocitos desde la circulación a través del endotelio, dentro de sitios afectados por daño tisular (11).

CELULAS SANGUINEAS

Hay evidencia de que las plaquetas se encuentran en un estado crónico activado, esto puede ser explicado, por incremento en el número de plaquetas jóvenes metabólicamente activas, o por incremento de los niveles plasmáticos de agonistas plaquetarios como trombina, ADP y epinefrina (2).

La migración de leucocitos desde el centro del flujo sanguíneo hacia el endotelio vascular es inducido por citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF-alfa secretados por macrófagos tisulares. La IL-1 y TNF-alfa activan a las células vasculares endoteliales, lo que conlleva a un aumento de la expresión de marcadores endoteliales como E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM los cuales funcionan como receptores de proteínas de adhesión de leucocitos (1). Además IL-1, IL-6 y TNF- α también activan a los hepatocitos para sintetizar proteínas de fase aguda como α -1-antitripsina, ceruloplasmina, α -2-macroglobulina y proteína C reactiva (1). Fig. 23.

El aumento de citocinas por las células mononucleares y células endoteliales, demuestra la presencia de un estado de activación leucocitario y endotelial permanente, determinado por un estado continuo de inflamación subclínica. En neutrófilos puede encontrarse disminución de las moléculas LFA-1 y L-selectina y aumento de la molécula ICAM-1 (10).

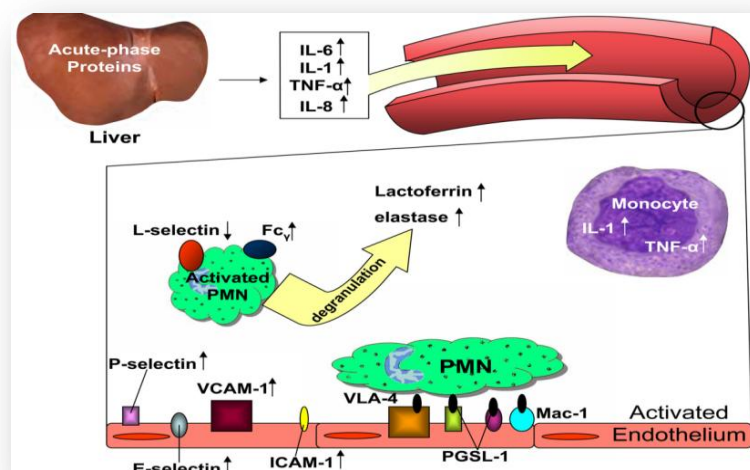


Fig 23. Liberación de citocinas por el hígado. El hígado libera citocinas proinflamatorias que llegan al sitio de vasooclusión, llegan leucocitos a adherirse al endotelio activado los cuales liberan más citocinas y se aumenta la inflamación. Tomado de Aslan M, Freeman B, 2007.

FACTOR VON WILLEBRAND

Es una proteína plasmática multimérica, sintetizada por los megacariocitos y células endoteliales, también media la interacción adhesiva entre eritrocitos falciformes y el endotelio. Algunas formas de vWF de alto peso molecular secretado por células endoteliales, promueve la adhesión de eritrocitos falciformes al endotelio. El endotelio *ex vivo* tratado con desmopresina induce adhesión eritrocitaria, esto se debe a que la desmopresina causa la liberación de formas multiméricas del vWF en células endoteliales. Los receptores GPIIb/IIIa-parecidos expresados en eritrocitos promueven la adhesión de eritrocitos falciformes a vWF interactuando con la integrina $\alpha v \beta 3$ (1).

TROMBOMODULINA

La producción de trombina es inhibida por un mecanismo de retroalimentación negativa a través del sistema trombosmodulina-proteína C. La trombosmodulina, es una proteína integral de membrana expresada en la superficie celular de células endoteliales vasculares que une trombina. Induce

cambios conformacionales en donde el complejo proteico formado puede activar a la proteína C, está a su vez con la ayuda de su cofactor, la proteína S, inhiben múltiples pasos en la vía de la coagulación. Los niveles producidos de la proteína C y proteína S en pacientes con drepanocitosis reflejan la baja síntesis de proteínas debido a disfunción hepática o al consumo crónico, debido al incremento en la generación del factor tisular o trombina. La trombina es un potente activador plaquetario que tiene dos tipos de receptores de señalización, el cual incluye la unión a las proteínas G, por los receptores PAR-1 y PAR-4 (1).

TRATAMIENTO

El tratamiento incluye evitar la aparición de crisis de dolor por vasooclusión, manejo de los episodios agudos o las infecciones, profilaxis con vacuna contra *haemophilus influenzae* tipo b, principalmente en niños, mantener adecuada hidratación, evitar estrés físico y emocional, cambios bruscos de temperatura, infecciones y alimentación adecuada (16).

La hidroxiurea es un agente citostático que se usa en el tratamiento de la eritrocitosis y trombocitosis en la policitemia vera y otras enfermedades mieloproliferativas. Puede ser oxidada por los grupos hem para producir NO, esta producción de NO es resultado de la hidrólisis de la hidroxiurea a hidroxilamina, seguido de una reacción de la hidroxilamina con la Hb (19). Tabla 3. El butirato de sodio, la 5-azacitidina y la hidroxiurea tienen la capacidad de reactivar los genes de la cadena γ de la Hb e incrementar la producción de la HbF. Otro fármaco es el Poloxámero 118 que es un surfactante no iónico copolimérico que incrementa la solubilidad de la HbS, reduciendo la viscosidad de la sangre y la frecuencia y duración de los episodios vasooclusivos. Los suplementos orales de magnesio como inhibidor del cotransporte K-Cl, mejoran la hidratación de los eritrocitos e incrementan los niveles Hb. El clotrimazol en modelos animales puede bloquear el canal de Gardos (16). Tabla 3.

La HbF tiene efectos benéficos en la drepanocitosis. En 1948 Janeth Watson notó que la HbA desplaza al nacimiento a la HbF, y que ésta limitaba

manifestaciones de la drepanocitosis. Otras investigaciones sugieren que el mecanismo implicado es que la HbF tiene un efecto protector contra la polimerización intracelular. De Simone y Heller demostraron que la 5-azacitidina y la hidroxiurea (hidroxicarbamida) elevan la concentración de la HbF. En 1998 la hidroxiurea fue aprobada por la FDA (15).

La decitabina actúa en la hipometilación del promotor del gen de la γ -globina, con cambios en la acetilación de la histona y estructura de la cromatina. El butirato es un ácido graso de cadena corta que inhibe la desacetilación de la histona y cambia la estructura de la cromatina (13).

Senicapoc o ICA-17403 (14) bloquea específicamente el canal de Gardos limitando la pérdida de K, Cl y agua, disminuye la deshidratación y por lo tanto, la hemólisis, mejorando la anemia (17). Para aumentar la biodisponibilidad del NO, las estrategias terapéuticas son la administración de NO inhalado, el sildenafil y suplementos de L-arginina. La inhalación del gas se hace a 80ppm durante 1.5 horas. La sulfasalazina inhibe al NF- κ B involucrado en la expresión de genes de la inflamación. El condroitin sulfato A y el heparán sulfato inhiben la adhesión de eritrocitos mediada por TSP (1).

Tabla 3. Medicamentos utilizados en el tratamiento de la drepanocitosis. Datos obtenidos de Macias C, Del Valle L, 2009, Sans-Sabafren 2001, Kato G, 2008.

| FÁRMACO | MECANISMO DE ACCION |
|--|--|
| Hidroxiurea, butirato de sodio y 5-azacitidina | Aumentan la HbF por medio de reactivación de genes |
| Poloxamero 118 | Incrementa la solubilidad de la HbS |
| Magnesio | Inhibe el contranporte K-Cl |
| Clotrimazol y senicapoc | Bloquea al canal de Gardos |
| Sulfazalazina | Inhibe al NF- κ B |
| Sildenafil | Aumenta la biodisponibilidad de NO |
| Condrointin sulfato A | Inhiben la adhesión del eritrocito por TSP |

PREVENCIÓN

Los niveles de prevención son diferentes:

- 1.- Informar a los padres de niños afectados que el riesgo de recurrencia de tener un hijo afectado disminuye limitando el número de hijos.
- 2.- La realización del diagnóstico prenatal a parejas.
- 3.- Ofrecer medidas diagnósticas en escuelas o antes del matrimonio.
- 4.- Realizar diagnóstico prenatal (11).

CONCLUSIONES

- Las crisis vasooclusivas en la drepanocitosis, aparecen debido a múltiples factores como, factores endoteliales, células sanguíneas, moléculas de adhesión, proteínas y citocinas.
- El mal funcionamiento de alguno de ellos, conduce a un aumento del riesgo de presentar las crisis, pueden verse a cualquier edad, estas complicaciones pueden manifestarse con variación de tiempo, desde una vez al día o hasta una vez cada año, van desde un dolor leve hasta manifestaciones graves o mortales como un infarto cerebral. Los tratamientos que se pueden utilizar actúan a nivel celular o molecular, sin embargo pocos son utilizados en humanos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Aslan M, Freeman B, Redox independent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1469-1483.
- 2 Ataga K, Key N. Hipercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem. *Am Soc Hematol* 2007: 91-6.
- 3 Beutler Ernest, Lichtman Marshall, Kipps Thomas. Williams hematology 2007. 6^a ed. Edit. Marban libros. Chapter 47. Pp. 447-461.
- 4 Bogdanov V, Balasubramanian V, Hathcock J. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating soluble thrombogenic protein. *Nat Med*. 2003;9:458-462.
- 5 Gladwin M, Lottenberg R, Walters M. Sickle cell disease: advances in pathogenesis and management. *Am Soc Hematol*. 2005, 51-7
- 6 Higgs D, Wood W. Genetic Complexity in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008;105(33):11595-6
- 7 http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA59/A59_9-sp.pdf 2006
- 8 Kato G. Novel small molecule therapeutics for sickle cell disease: nitric oxide, carbon monoxide, nitrite, and apolipoprotein A-1. *Am Soc Hematol*. 2008;186-92
- 9 Kuypers F. Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies. *Am J Hematol*. 2007 (1): 68 - 73.
- 10 Macias C, del Valle L, Socarras B, De leon J, Badía T. Expresion de las moleculas de adhesion en la anemia drepanocitica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2009;25(2):59-74.
- 11 Modell B. Darlinson M. Global Epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicator. *Bull World Health Organ*. 2008,86;480-487.
- 12 Morris C. Mechanism of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Am Soc Hematol*. 2008(1): 177-185.

- 13 Peñaloza R, Buentello L, Hernandez M, Nieva B. Frecuencia de la hemoglobina S en cinco poblaciones mexicanas y su importancia en la salud publica. *Salud Publica de México* 2008;50(4):325-329.
- 14 Sans-Sabrafen, Besses, Raebel. Hematología clínica. Edit Hartcourt, 2001. 4a ed. Introducción al estudio de la patología eritrocitaria. Bases bioquímicas y fisiológicas Pp. 66-67. Hemoglobinopatías Pp.188-191. Anemia de celulas falciformes Pp 221-228.
- 15 Schechter A. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008;12:3927-3938.
- 16 Sonati M, Costa F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr.* 2008;84:540-551.
- 17 Telen M. Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease. *Am Soc Hematol.* 2007(1): 84-89.
- 18 Van der Poll T. Tissue factor as an initiator of coagulation and inflammation in the lung. *Crit Care* 2008, 12(suppl6):53
- 19 Vladan P, Bojana B, Beleslin-Cokic, Melanija T. Hidroxiurea induces the eNOS-cGMP pathway in endotelial cells. *Blood* 2006, 108:184-191.