

Trabajos Originales

Cátedra de Medicina Infantil
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
Prof. Titular Dr. Humberto J. Notti
MENDOZA, REP. ARGENTINA

Hemoglobinas del recién nacido⁽¹⁾

POR LOS DOCTORES:

HUMBERTO J. NOTTI

Profesor Titular

JOSE LENTINI

Profesor Adjunto

OSCAR MARCO DEL PONT

Jefe de Trabajos Prácticos

PEDRO A. AMPUERO

Jefe del Laboratorio

SARA I. DE LA ROSA DE AMPUERO

Ayudante del Laboratorio

Este trabajo tiene por objeto determinar algunas características de la sangre del recién nacido en lo que al eritrocito se refiere y especialmente a las Hemoglobinas. Nos proponemos averiguar si ciertos valores medios y sus desviaciones dentro de condiciones normales, muestran alguna diferencia regional que pudiera estar vinculada a las variaciones de clima y otros factores que atañen a nuestro medio geográfico y social. Pero nos interesa especialmente averiguar si los rasgos característicos que muestra la sangre en el momento del nacimiento están o no en concordancia con otros aspectos biológicos del niño propios de esta etapa y por lo tanto, el valor que puedan tener como medio de estimación de la madurez y la normalidad, vale decir si es posible establecer patronos de los valores hemáticos, con sus lógicas variaciones que expresan la situación fisiológica del R. N. en este terreno.

El cuadro hemático como es sabido, exhibe caracteres típicos en el R. N. que expresan su estado de tránsito entre la situación fetal y del lactante, en forma tanto o más definida que en otros aspectos de su fisiología. El ajuste necesario de todas las funciones para afrontar el nuevo tipo de vida no se cumple en forma armónica y gradual, además son propias de esta etapa las amplias diferencias entre distintos individuos lo cual se refleja en el campo hematológico elocuentemente. En el momento del nacimiento en-

(1) Colaboración directa.

contramos un grupo de hemoglobinas constituidas por dos porciones, una menor, pero en vía de aumento denominada Hemoglobina Adulta A y sus variantes normales, y otra porción mayor la fetal F que tiende a disminuir paulatinamente. Esta última a su vez puede fraccionarse en dos o tres variedades, según distintos autores¹⁹ denominadas F₁, F₂ y F₃ pero todas ellas con la característica de ser álcali resistentes. Además ha sido señalado por algunos investigadores^{1, 11, 14} la presencia en el feto de una Hemoglobina precursora o embrionaria. Sin embargo con respecto a esta última no existe acuerdo, ya que otros autores como Masuda Schroeder y Jones¹⁶ han fallado en su intento de encontrarla en fetos en condiciones parecidas mediante cromatografía y resistencia al álcali observando únicamente la presencia de las F₁ y F₂.

Es frecuente encontrar diferencias de resultados en la frondosa literatura que últimamente se está acumulando sobre la cuestión que nos ocupa, dependiendo de los métodos empleados en las distintas investigaciones. También se debe tener en cuenta ciertos factores que pueden modificar estos resultados tales como lugar de obtención de las muestras, y en nuestro caso, oportunidad de la ligadura del cordón, anticoagulante empleado y otras condiciones propias del niño como la gemelaridad, con fetos transfusores o no, prematuridad, etc.

En el presente trabajo comunicamos los resultados obtenidos en el examen de la sangre del cordón de 60 R. N. en su mayoría de término a excepción de 5 casos cuyo peso era inferior a 2.500 gs. Reproducimos así en la muestra las condiciones habituales de los niños que nacen en la maternidad J. F. Moreno, Servicio Público que atiende a la población modesta de la Gran Mendoza. Todos estos niños eran sanos según control posterior. Hemos tomado simultáneamente, o sea inmediatamente después del parto sangre de la madre por punción venosa para realizar las mismas determinaciones (20 casos).

Se han establecido los siguientes datos analíticos, cantidad de hematíes por mm³ Hematocrito, cantidad de hierro en sangre total, cantidad de Hemoglobina total en gramos por ciento y Proporción de Hb Fetal.

Métodos utilizados.—Se ha obtenido sangre de la procedencia ya indicada recibida en tubo seco y estéril, utilizando como anticoagulante la mezcla de oxalatos propuesta por Wintrobe.

HEMOGLOBINAS DEL RECIÉN NACIDO

Solución de Hemoglobina.—Se lavan los hematíes 4 a 5 veces con solución clorurada isotónica y el compacto de hematíes se hemoliza luego con dos veces su volumen de agua destilada agitando repetidamente el tubo. El hemolizado se somete a centrifugación prolongada (5,000 r.p.m.) durante 1 hora a fin de separar con seguridad todo resto de estromas. El líquido sobrenadante es la solución a utilizar con una concentración aproximada del 10% de la Hb original. Esta solución puede conservarse en refrigerador entre 0 y 5 grados sin observarse alteraciones al cabo de 24 horas. Siempre que se examine una muestra de Hb problema deben realizarse paralelamente las mismas determinaciones con una Hb normal procedente de un adulto sano y que correspondería a una muestra de Hb A.

Determinación del Hierro Sanguíneo.—Se utilizó para ello el método de Wong.

Determinación de Hb Alkali Resistente (Singer y Chernoff).

a) Rvo. alcalino. Solución 0.1 N de HONa de pH 12.7, se conserva en frasco parafinado y en refrigerador.

b) Solución precipitante. 800 c.c. de sol. saturada al 50% de sulfato de amonio más 2 c.c. de ácido clorhídrico 0.1. N.

Técnica.—Colocar 1.6 ml de Rvo. alcalino en un tubo de ensayo a B. M. y a 20 grados durante unos minutos, agregar 0.10 ml de la solución de Hb exactamente medidos, agitar el tubo 10 segundos, exactamente 1 minuto después de la adición de la solución de Hb se agregan 3.4 ml de la solución precipitante agitar e invertir el tubo unas 6 veces y filtrar luego con una hoja doble de papel de filtro. **Testigo.** Se prepara con 0.10 ml de la solución de Hb más 5 ml de agua destilada. Medir en el fotocolorímetro la extinción del problema y del testigo poniendo a cero el aparato con agua destilada. Tomando como 100% la extinción del testigo se calcula el porcentaje respecto a este de la extinción del problema el cual corresponde al porcentaje de Hb álcali resistente.

Electroforesis sobre papel de filtro.—Se han seguido las técnicas generales utilizadas para electroforesis sobre papel de filtro. Utilizando la solución de Hb preparada en la forma ya indicada para efectuar la siembra. Paralelamente se ha sembrado otra tira de

control con una solución de Hb normal adulta. Se utilizó la solución buffer de veronal y veronal sódico a pH 8.6 y fuerza iónica de 0.1 M, con una migración de 10 horas a un voltaje de 150 volts. El secado y luego la coloración final se realizó con solución de azul de Bromo fenol.

La lectura de las bandas electroforéticas ya coloreadas se efectúa por densitometría. Puede también hacerse por la simple comparación visual o con instrumentos de medida para determinar la distancia recorrida por la muestra y el control. La determinación más exacta de la extensión y de la relación porcentual entre las dos bandas se alcanzará por medio de la lectura efectuada con el densitómetro, determinándose además el espacio recorrido.

Dicho espacio recorrido por la Hb se toma como índice de su velocidad, adjudicándose a la del adulto normal el valor del 100%, la velocidad de los demás tipos de Hb se toman como porcentaje de aquélla, pero variando según el pH con que se trabaje.

Resultados obtenidos.—El número de eritrocitos en nuestras determinaciones ha alcanzado un valor de 5.340,000 por mm³ como término medio, encontrándose el 80% entre cifras de 5.100,000 y 6.350,000.

Referente a este punto Clemente Smith cita las cifras obtenidas por diversos autores que se encuentran entre 4.3 y 5.2 millones por mm³ de sangre del cordón y 4.7 a 6.2 millones en sangre capilar²³. Nuestra cifra es entonces ligeramente superior, pero en nuestro país Garrahan⁷ menciona un valor medio de 5.8 millones en R. N. de término y Murtagh y colaboradores¹⁷ encuentran para el prematuro 5.95 millones en el primer día de vida.

Hematocrito.—Hemos encontrado un valor medio de 52% de volumen globular con valores extremos de 39 y 63%. A este respecto Smith menciona los datos de varios investigadores que se desplazan entre 51.3 y 57.2% en sangre del cordón con un leve aumento hasta el segundo día y descendiendo al 35% a los dos o cuatro meses. Murtagh concede un valor del 62% en los prematuros.

La cantidad de Hb total ha sido en esta serie de 17.6 gs. % con un 80% de casos entre 16 y 21 gs. %. Estos valores concuerdan con el de los diversos autores que admiten una media de 17 gs. % en cordón y 19 gs. % aproximadamente en sangre capilar. Con estos

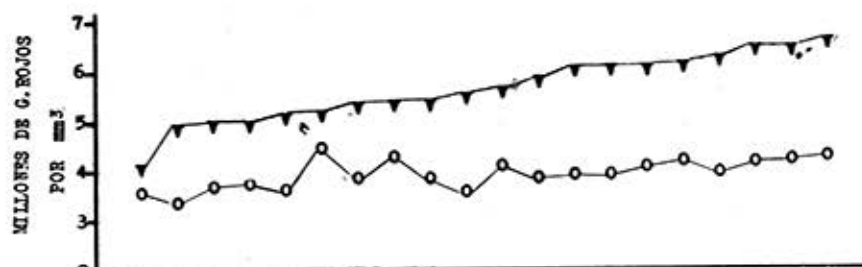
HEMOGLOBINAS DEL RECIÉN NACIDO

datos se puede calcular el volumen corpuscular medio, y la Hb corpuscular media, datos que hemos omitido por ser una simple secuencia de aquellos.

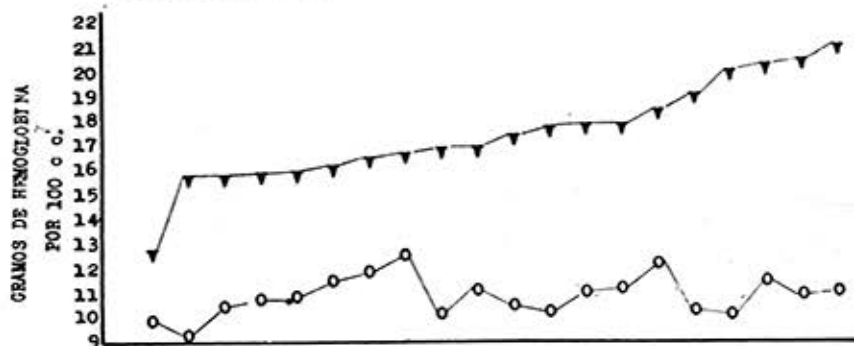
Como decíamos en párrafos superiores, hemos realizado determinaciones en la sangre de 20 de estos niños, comparando los valores individuales respectivos observamos que, como cabía esperarlo no hay vínculo de unión alguno entre las cantidades de hematíes y de Hb total de los niños y de sus correspondientes madres. Si ordenamos los valores de los primeros en orden creciente de manera que formen una curva ascendente, observaremos que los de sus respectivas madres varían en forma indeterminada a ambos lados de una recta horizontal (Cuadro No. 1). Esto no sólo indica la inde-

Cuadro 1

GLOBULOS ROJOS Y HEMOGLOBINA DE 20 NIÑOS Y SUS RESPECTIVAS MADRES

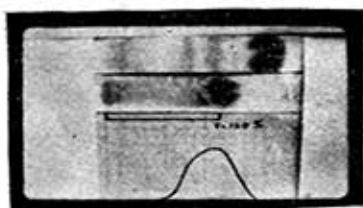


▼ Niños ordenados según valores crecientes de g. rojos
○ Sus respectivas madres

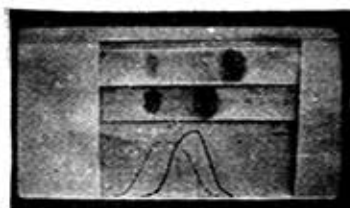


▼ Niños ordenados según sus valores de hemoglobina total
○ Sus respectivas madres

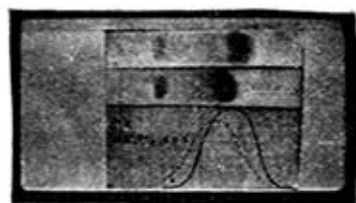
pendencia lógica de los mecanismos hemopoyéticos y sistemas enzimáticos sintetizadores de Hb de ambos organismos, sino también que no hay una distribución proporcional de la materia prima aminoácidos, hierro, etc., pues encontramos pares en que las madres pueden considerarse en estado de anemia y sin embargo sus hijos tienen valores altos, y a su vez existen niños cuyos valores pueden considerarse bajos, atribuibles a factores individuales del feto puesto que sus madres exhiben una situación hemopoyética satisfactoria.



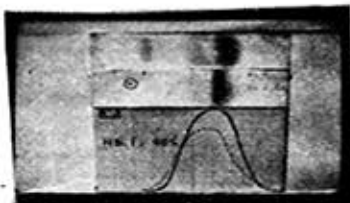
Banda electroforética de Hb A.



Banda superior y trazo de línea llena Hb A.
Banda inferior y línea de puntos Hb F, Hb álcali resistente 80%.



Banda superior y trazo de línea llena Hb A.
Banda inferior y línea de puntos Hb F, Hb álcali resistente 60%.



Banda superior y trazo de línea llena Hb A.
Banda inferior y línea de puntos Hb F, Hb álcali resistente 40%.

Nos ha interesado en forma especial el estudio de las Hbs fetales, ya que su presencia es una nota característica de esta temprana edad, las proporciones en que se encuentra y otros aspectos relacionados con ellas.

Su determinación mediante los métodos de desnaturalización alcalina y electroforesis sobre papel da resultados que se corresponden en una manera general, pero el último método no parece ser de utilidad cuando la cantidad de Hb F es pequeña y en cambio

HEMOGLOBINAS DEL RECIÉN NACIDO

cuando su proporción es elevada se obtiene una banda característica retrasada, pero una sola, es decir incluyendo el resto de Hb A. En casos patológicos se pueden obtener dobles bandas correspondientes a los componentes presentes.

La Hb F tiene la misma naturaleza química que todas las conocidas en el hombre en un sentido general, es decir tiene 4 núcleos Hem Ferroporfirina agregados a una globina. Esta última se compone de dos medias moléculas simétricas, las cuales a su vez están constituidas por dos cadenas de péptidos denominadas alfa y beta con un peso molecular total aproximado de 66.700 (Ingram¹²).

Pero a su vez se diferencia de todas las demás por varias propiedades entre las cuales posiblemente la más importante es la resistencia a la desnaturalización por los álcalis. Estas diferencias dependen de la composición de una u otra de las cadenas mencionadas, por sustitución de algunos de los aminoácidos. Numerosas investigaciones resumidas últimamente por White y Beaven²⁶ han establecido que estas Hbs tienen 2,6 grupos valina terminales en lugar de los 5 que tiene la Hb A y que difiere también en todas las demás por un mayor número de grupos lisina y menos sulfhidrilos.

Tiene una solubilidad distinta siendo más estable que la Hb A en solución fuerte de fosfato buffer, propiedad que ha sido aprovechada por Roche y Darrien¹⁹ no sólo para separarla sino para aislar las tres fracciones F₁, F₂ y F₃ que ya mencionamos mediante soluciones de concentración creciente de estas sales. Se han hecho algunas observaciones en sangre de cordón de variedades parecidas a la Hb F, en Indochina y en Texas, se trata de las llamadas Barts, Fessas y Papaspyrou, Alexandra. Pero en realidad se trata de casos aislados y no bien estudiados²⁸.

De la sustitución de algunos aminoácidos depende también la diferencia de las cargas eléctricas de la molécula de las distintas Hbs y como consecuencia su diferente velocidad de translación electroforética a que ya nos hemos referido y su comportamiento frente a otros procedimientos que permiten su separación.

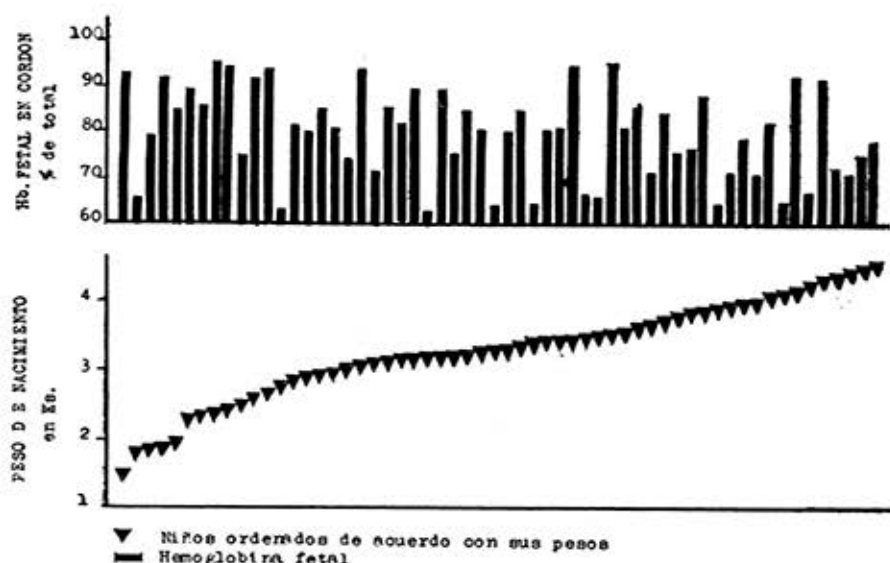
Nosotros hemos utilizado solamente los dos métodos mencionados y mediante ellos hemos encontrado los siguientes valores de Hb álcali resistente en nuestra serie de niños. Un valor medio de 83% pero con amplias variaciones individuales desde 60 a 95%.

Tratando de averiguar el significado de estas oscilaciones, hemos comparado estos resultados con los de la Hb total de cada niño y

hemos observado que no existe relación alguna entre estos dos valores. Los resultados más bajos entre 12.5 y 14 gs. % de Hb total presentan variaciones muy dispares de Hb fetal y los casos de contenido alto de Hb total muestran las mismas variaciones discrepantes, revelando que la producción de ambas responde a mecanismos separados. Más importante nos parece la comparación de los pesos de los niños para lo cual los hemos ordenado en forma creciente con sus respectivas proporciones de Hb F (Cuadro No. 2).

Cuadro 2

PESO DE NACIMIENTO Y VALORES DE HEMOGLOBINA FETAL



Tampoco existe relación visible entre estos dos factores, niños de 4 o más kilos tanto tienen proporciones altas como bajas de esta Hb y lo mismo ocurre con los que su peso estaba alrededor de 2 Kg.

Se ha considerado siempre que el peso del nacimiento es una expresión global de la madurez del niño, y si por otra parte admitimos que a mayor cantidad de Hb F hay que atribuirle un significado de mayor inmadurez hemática, ya que ésta tiende a desaparecer rápidamente a medida que el niño se desarrolla y crece. Habrá que deducir de los resultados que hemos obtenido que este proceso de maduración hemática es independiente de la maduración general.

HEMOGLOBINAS DEL RECIÉN NACIDO

Cada niño parece tener su propio ritmo de maduración en sus distintos sectores morfológicos y fisiológicos con diferencias cronológicas y cuantitativas, pero encuadrado dentro del plan general de desarrollo de esta edad. Es propio de esta edad y aún del feto de pocos meses la coexistencia de ambas Hbs A y F, en distintas proporciones según los casos, respondiendo a mecanismos de producción independientes. La sustitución de la última por la primera es un hecho que se inicia antes del nacimiento y se acentúa antes de llegar a la etapa del término y constituye la segunda nota de esta evolución, el cese funcional del mecanismo formador de Hb F. Una vez agotada o en vías de disminución esta Hb no reaparece más en condiciones genéticas normales. Tanto es así que aunque la hemopoyesis esté sobre estimulada no altera esta tendencia biológica. Es lo que vemos en las enfermedades hemolíticas, especialmente en la del R. N. en que aparecen células jóvenes por maduración morfológica incompleta y acelerada pero en que la tasa de Hb F no regresa a los valores del feto y del recién nacido sino que baja significativamente.

Formándose tanto el Hem como la globina en el interior del eritrocito, se ha pensado que la formación de la Hb F y A dependería del lugar donde se efectúa la hemopoyesis en la vida fetal y extrauterina, pero es evidente que no es así, pues en el feto con hemopoyesis visceral existen ya las dos Hbs, y en la etapa medular, en los últimos meses se sigue produciendo todavía la variedad F.

En nuestro medio Sepich²⁰ ha estudiado numerosos casos de enfermedad hemolítica encontrando en niños no transfundidos valores de Hb F bajos llegando algunos a menos del 30% no obstante haber en estos casos focos eritropoyéticos activos en el hígado y otros órganos.

Pero este esquema se altera en condiciones genéticas anómalas y así vemos aparecer o persistir pigmento álcali resistente en diversas hemoglobinopatías. En la Talassemia, Gatto y numerosos autores⁸ han estudiado la participación de esta Hb. En los casos que se combinan genes de Talassemia-S. Mac Iver West y colb.¹⁵ encuentran hasta un 16% y citan en su trabajo de revisión del tema autores que señalan cifras de hasta 22%. En los casos debidos a la presencia de Hbs C. H. M. y E. puros o asociados a Talassemia se encuentran también cantidades variables pero aumentadas de Hb F.

En el recién nacido sin embargo, no existen hemoglobinopatías desde el punto de vista clínico, aunque se trate de niños cuyo genotipo se manifestará al cabo de pocos meses a través de una afección de esta clase. Esto es debido a que estas enfermedades constituyen alteraciones de la molécula de la Hb A y se pondrán de manifiesto en el momento en que debiendo ésta haber sustituido casi completamente a la fetal, no lo hace porque su producción está frenada como acontece en la Talassemia manteniéndose la producción del pigmento F o aparece en su lugar una de tipo anómalo.

La literatura actual especializada está plena de comunicaciones sobre estas Hbs anormales^{4, 22, 24, 25, 27} en los diversos estados homo y heterocigotas en los que la Hb F aparece en distintas proporciones, especialmente cuando actúa el Gen Talassemia pero como una consecuencia de la alteración que afecta al mecanismo de producción de la Hb A.

Ha sido también planteada la cuestión de la participación inmunológica específica de las distintas Hbs en distintos procesos. Al presente parece estar demostrada mediante trabajos de Chernoff³, de Goodman y Campbell¹⁰ la capacidad de formar anticuerpos y la especificidad de la F frente a la A y S. Pero la intervención de esta cualidad antigénica en la patología no parece probable quedando como un rasgo diferencial más entre ellas.

C O N C L U S I O N E S

Los valores hallados concuerdan en un sentido general con los de numerosos investigadores que han tratado este tópico, tanto en el país como en el extranjero, y las diferencias se pueden atribuir a los métodos empleados y a la constitución de las muestras con que se ha trabajado pero sin significación relevante. Han quedado de manifiesto como hechos característicos de esta etapa los siguientes: la independencia de los mecanismos productores de ambas Hbs F y A. Las amplias variaciones de sus cantidades relativas y absolutas en condiciones que consideramos como normales y especialmente la falta de concordancia de estas variaciones con las diferencias que pueden haber en otros aspectos entre cada niño. El tenor de Hb F y como consecuencia el valor recíproco de Hb A no está en relación con el peso del nacimiento y por lo tanto con el grado de crecimiento y desarrollo de cada niño si es que se toma este peso como

HEMOGLOBINAS DEL RECIÉN NACIDO

expresión de este último. Será necesario tener en cuenta estas diferencias que expresan un ritmo individual en que se desenvuelve la función Hemoglobinogénica de cada niño cuando se trata de valorar su madurez o lo que es más importante, la gravedad de enfermedades tales como enfermedad hemolítica u otros procesos del R. N.

B I B L I O G R A F I A

- 1.—Allison, A. C.—Notation for haemoglobin type. *Science*, 122-640. 1955.
- 2.—Bergen, W. R., Sturgeon, H. and Itano.—Zone electrophoresis of abnormal haemoglobin associated with sickle cell disease. *Act. Hemat.* 12-160, 1954.
- 3.—Chernoff, A.—Production of antihemoglobin sera. *Blood* 8, 399-413. 1953.
- 4.—Chernoff, A.—Sindrome of Hemoglobin D. *Blood* 2, 1958.
- 5.—Durrum, L., Motulsky, A. y Paul, H.—Paper electrophoresis of abnormal hemoglobins and its clinical applications. *Blood* 9, 749. 1954.
- 6.—Gajdos, A.—Dónnes recentes sur la biosyntheses de l'Hemoglobine. *Le sang* 3, 212. 1958.
- 7.—Garrahan, J.—El Ateneo. 1952.
- 8.—Gatto, I.—Electroforesis sobre papel en las anomalías hereditarias de la Hemoglobina. *Sangre* 1, 248. 1956.
- 9.—Geral, P.—Characterization electrophoretic of hemoglobin M. *Blood* 10 de 1958.
- 10.—Goodman, M. and Campbell, D.—Differences in antigenic specificity of human normal total and sickle cell hemoglobins. *Blood* 8, 422. 1953.
- 11.—Halbrecht, I. and Klibansky, C.—Identification of a new normal embryonic hemoglobin. *Nature* 178, 794. 1956.
- 12.—Ingram, V. M.—Chemistry of abnormal hemoglobin. *British Med. Bulletin* XV, 1, 28. 1959.
- 13.—Jonxis, J. H. and Huisman, T. H.—The detection and estimation of fetal hemoglobins by means of alkali. *Blood* 11, 1009. 1956.
- 14.—Kunzel, W.—Human Embryohemoglobin. *Nature* 179, 477. 1957.
- 15.—Mac Iver, J. E. and West, L.—Sickle cell thalassemia in Jamaica. *Blood* 4, 1958.

- 16.—*Masuda Schroeder and Jones.* Blood 2. 1960.
- 17.—*Murtagh, J. Martinez, Castro, Videla y colab.*—Estudios hematológicos en prematuros. El recién nacido 10, 128. 1955.
- 18.—*Rimington, C.*—Biosynthesis of hemoglobin British Med. Bulletin 1, 18. 1959.
- 19.—*Roche et Darrien* les Hemoglobines humaines et les modifications physiologique. Le Sang, 24, 98. 1953.
- 20.—*Sepich, L.*—25 Triduo Científico Asociación Bloquímica Argentina, Noviembre 1959.
- 21.—*Singer, K., Chernoff, A. and Singer, A.*—Blood, 1951.
- 22.—*Singer, K. and Jefferson, A.*—Hemoglobine S Thalassemia disease and Hemoglobine C Thalassemia disease. Blood 7, 1957.
- 23.—*Smith, C.*—The Physiology of the New Born Infant. C. Thomas Publisher III. 1959.
- 24.—*Supa Makorn and Minnich, V.*—Hemoglobin E. Blood, 6 de 1957.
- 25.—*Vechio, F.*—Sul comportamento elettroforetico dell hemoglobina nell anemia di Cooley. Pediatria Milano, 60, 413. 1952.
- 26.—*White, J. and Beaven, G. H.*—Fetal Hemoglobin. Brit. Med. Bull. XV, 1, 34. 1959.
- 27.—*Wolf, J., Michael, R. and Von Hoff.*—Hemoglobine H-Thalassemia disease. Blood 5. 1958.
- 28.—*Vella, F.*—Heterogeneity of human fetal hemoglobin. Nature 184 (Suplem. 5): 272, 1959.