

HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUCTURALES

1. CLASIFICACION GENERAL

Las hemoglobinopatías se clasifican en tres grupos:

- a- existen variantes estructurales de alguna de las hemoglobinas;
- b- talasemias todas caracterizadas por una disminución de la síntesis de una o mas cadenas de globina y
- c- persistencia de la Hb Fetal más allá del periodo neonatal (PHHF).

Hemoglobinopatías

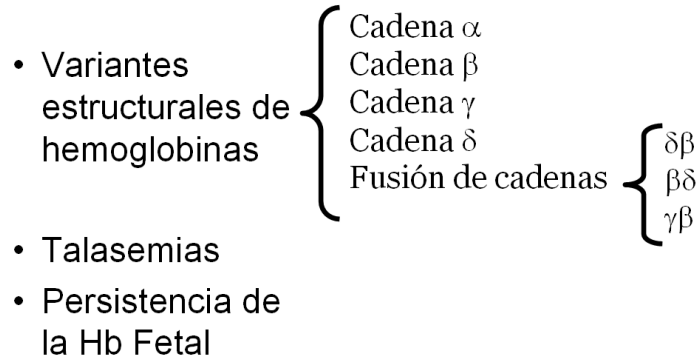


Figura 1: Clasificación de los desordenes genéticos de la hemoglobina.

La PHHF obedece a defectos en la interconversión de HbF a HbA durante el desarrollo, y se caracteriza por la síntesis de HbF durante la vida adulta. Aunque carece de expresividad clínica, la PHHF constituye un modelo muy útil para el estudio de la regulación de los cambios genéticos que acompañan al desarrollo.

Una hemoglobinopatía estructural obedece a una alteración en la secuencia de los aminoácidos de una de sus cadenas globínicas (estructura primaria), cuya consecuencia puede ser una alteración de las propiedades moleculares (físicas o químicas). La gran mayoría son asintomáticas, es decir, que el cambio estructural carece de repercusión clínica. La detección de algunas de estas hemoglobinopatías ha sido posible gracias a un cambio en su carga eléctrica superficial, que hace posible identificarlas mediante electroforesis. De las que presentan expresividad clínica, aunque esta puede ser variable, el denominador común es la anemia hemolítica.

2. VARIANTES ESTRUCTURALES DE HEMOGLOBINAS

Usando solo estudios de electroforesis de Hb y análisis de las características de la hemoglobina de los pacientes se han descrito más de 750 variantes estructurales de las hemoglobinas. Nosotros acá solo describiremos los asociados con desordenes clínicos.

Nomenclatura: A partir de 1949 cuando se describió la anemia drepanocítica que fue designada con una letra del alfabeto (HbS), se siguieron designado con letras. Ya para fines de 1950 se habían usado todas las letras del alfabeto. A partir de entonces se empezaron a denominar con el lugar de origen donde la habían descubierto.

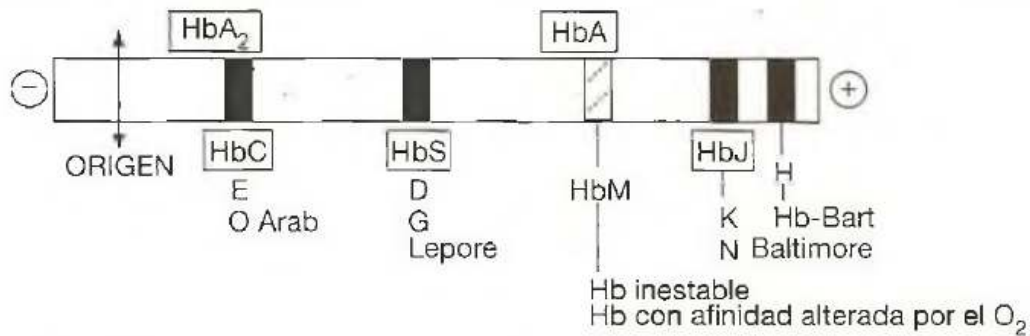


Figura 2: Electroforesis de hemoglobinas en acetato de celulosa (pH: 8,9). Desde el origen, las hemoglobinas se desplazan hacia el cátodo (polo positivo) y de acuerdo con su posición respecto a la HbA normal se clasifican en variantes lentas, rápidas o de migración normal. Se representan aquí algunas de las hemoglobinopatías de importancia clínica: **Variantes lentas.** Migran por detrás de la HbA pero por delante de la HbA₂: HbS, HbD, HbG y Hb Lepore y en la misma posición que la A₂: -HbC, HbE y HbO Arab. **Variantes rápidas.** Migran inmediatamente por delante de la HbA: HbJ, HbK y HbN y algo más lejos: HbH, Hb Bart y Hb Baltimore. **Variantes de migración normal.** Migran igual que la HbA: HbM, Hb inestables y Hb con afinidad alterada por el oxígeno. La HbF es una variante normal que migra inmediatamente por detrás de la HbA, pero en el adulto no se detecta electroforéticamente por su escasa concentración.

3. PATOLOGÍA MOLECULAR

La mayoría de las 750 variantes aisladas han surgido por un cambio de un aminoácido en una de las cadenas de globinas. De acuerdo a la alteración molecular se las clasifica en:

a-Sustituciones de una única base

Generalmente es el cambio de una única base en el triplete que codifica para un aminoácido.

b-Variantes de cadena de hemoglobina elongadas o alargadas

Se han descubierto diferentes variantes de cadena de globina, tabla N° 1. Ellas son causadas por tanto cambios de una única base en el codón de terminación, mutación en el marco de lectura, como por mutaciones que causan fallas en el clivaje del residuo iniciador de metionina.

Tabla N° 1: Variantes de Hemoglobina con Subunidades Elongadas (Alargadas) y Hemoglobinas más cortas	
Cadenas de globinas Elongadas: 1-Mutaciones en la terminación de cadena 2- Mutaciones en el marco de lectura 3- Reduplicación 4- Persistencia de la Met -N-terminal	Hbs CONSTANT SPRING, ICARIA, KOYA DORA, SEAL ROCK Hbs WAYNE, SAVERNE, TAK, CRANSTON Hbs GRADY Hbs MARSEILLE, S.FLORIDA, LONG ISLAND
Cadenas de globina truncadas: Deleciones de tripletes	Hbs LEIDEN, LYON, FREIBURG, GUNN HILL, MCKEES ROCKS, y otras.

Los mutantes de terminación (alargamiento de las cadenas de globina) son todos variantes de la cadena alfa donde hay una única sustitución de base en el codón stop UAA. Ver figura N°3. Ejemplo Hb Constant Spring la cadena α tiene 31 residuos de aminoácidos adicionales en su extremo C-terminal. Una mutación en el gen α-globina convierte el codón de stop (UAA) a un codón de glutamina (CAA). La proteína resultante α-globina en Hb Constant Spring no sólo está alterada cualitativamente sino que es inestable por lo que esta es también una anomalía cuantitativa. Como todos los fenotipos de la Hb Constant Spring y sus variantes alargadas son asociados con un fenotipo α-talasémico, generalmente es considerada en esta sección.

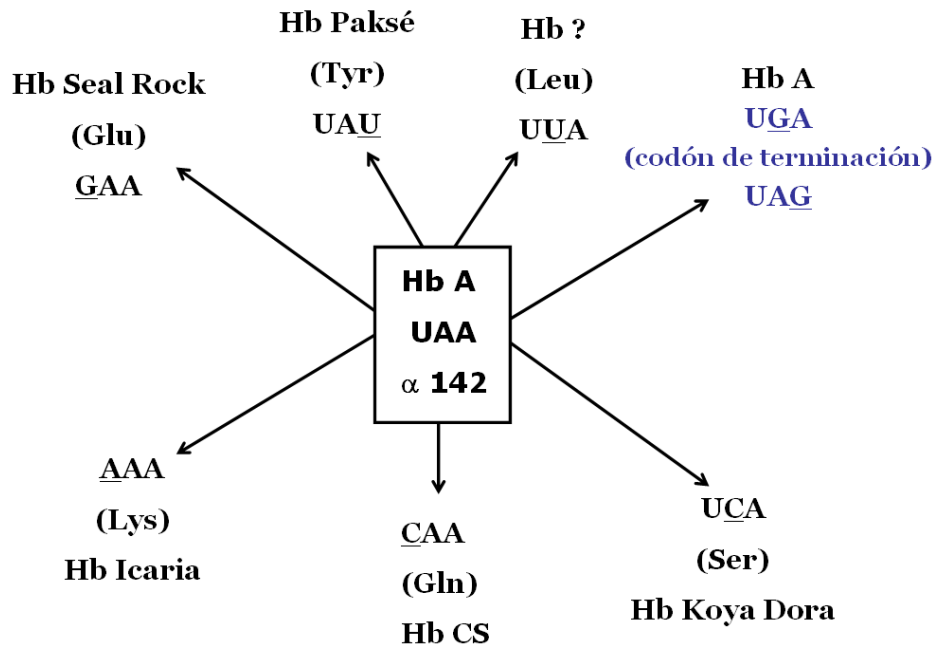


Figura 3a: Mutantes de terminación de la cadena α . Se muestra los distintos reemplazos en el codón de terminación. Que da origen a los distintos mutantes de terminación

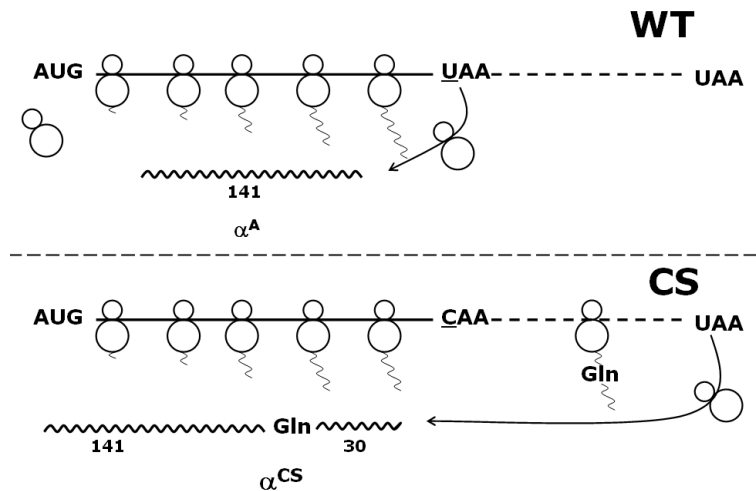


Figura 3b: Representación esquemática de la síntesis de una cadena α mas larga (28-30 aminoácidos) Hb CONSTANT SPRING (α CS)

c-Cadenas de globinas más cortas

En este caso, hay pérdida de uno o más aminoácidos adyacentes, pero se conserva el resto de la cadena normal. Estas variantes involucran la delección de 1 o más codones intactos, no afectando el marco de lectura de la proteína restante. Son ejemplos de delecciones β las Hb Freiburg (delección de un aminoácido), Hb Lyon (delección de dos aminoácidos) y Hb GunHill (delección de cinco aminoácidos).

d- Hemoglobinas de fusión

Obedecen a un entrecruzamiento desigual entre parte del gen delta de un cromosoma y parte del gen beta del cromosoma homologo durante el proceso de la meiosis (crossing-over). Hay distintas variantes de hemoglobinas que contienen cadenas fusionadas o híbridas. La primera en ser descubierta fue la hemoglobina Lepore que contiene cadenas β normales y cadenas β anormales. La hemoglobina Lepore tienen los primeros 50 a 80 aminoácidos de

las cadenas δ y los últimos 60 a 90 aminoácidos del extremo C-terminal de la cadena β . Se han descrito tres tipos de hemoglobina Lepore, en donde la transición de la secuencia δ y β ocurre en distintos puntos.

La Hemoglobina Kenya es análoga excepto que el híbrido contiene secuencias de las cadenas γ y β .

Las cadenas de fusión se forman por apareamiento no homólogo entre el locus δ de un cromosoma y el locus β de otro cromosoma complementario. Como se ve en la figura 4, el mecanismo da origen a dos cromosomas anormales; el primero el cromosoma Lepore solo tiene un gen de fusión δ - β y sobre el par homólogo de cromosoma hay un gen de fusión anti-Lepore β - δ , junto con el loci δ y β normal.

El gen híbrido resultante $\delta\beta$ se llama Lepore y el gen híbrido $\beta\delta$ se llama anti-Lepore.

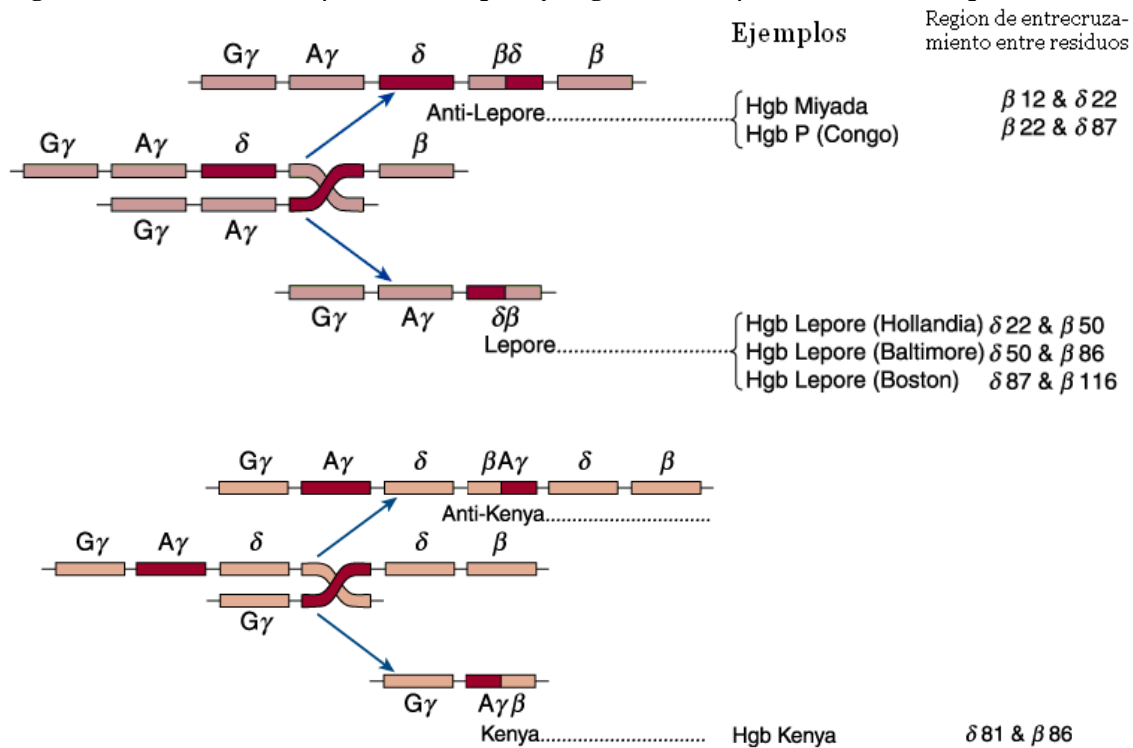


Figura 4: Mecanismo de formación de la Hemoglobina de fusión Lepore y Kenya

4. CLASIFICACIÓN SEGUN EL FENOTIPO

Las variantes estructurales se clasifican según su fenotipo en:

a- Propiedades fisico-químicas alteradas (hemoglobinopatías con alteración de carga superficial)

Estas mutaciones se hallan próximas a la superficie de la molécula de hemoglobina (mutaciones superficiales) y, la mayoría de las veces, van acompañadas de una alteración de su carga eléctrica. Algunas de ellas producen también un descenso de la solubilidad de la hemoglobina, con formación de estructuras intraeritrocitarias de características paracrystalinas. Su manifestación clínica más característica es la anemia hemolítica, y un ejemplo de este tipo de hemoglobinopatías son la HbS y HbC.

b- Variantes de Hb inestables

- Anemia hemolítica congénitas con cuerpos de Heinz

Se producen por mutaciones internas que desestabilizan la molécula de hemoglobina facilitando su desnaturalización in vivo y la formación de precipitados intraeritrocitarios o cuerpos de Heinz. Se conocen con el nombre de hemoglobinas inestables, y su manifestación

clínica es una anemia hemolítica crónica, con crisis de agudización después de la ingesta de medicamentos u otras sustancias oxidantes.

c- Variantes con afinidad alterada al oxígeno

Afectan a regiones de la molécula relacionadas con los cambios conformacionales que acompañan al proceso de fijación reversible del oxígeno molecular. Pueden ser de dos tipos

- *Variantes con alta afinidad*: hemoglobinopatías con aumento de la afinidad por el oxígeno, que dificultan la liberación del oxígeno hacia las células y, por tanto, la oxigenación celular, hay hipoxia y se presentan con eritrocitosis.

- *Variantes con baja afinidad*: que fijan poco oxígeno, pero lo liberan muy rápidamente hacia las células. Se manifiestan con anemia y cianosis.

d- Hemoglobinas M

- Metahemoglobinemia: la mutación estabiliza de forma permanente el hierro de los grupos hemo implicados en estado oxidado, impidiendo la fijación reversible del oxígeno molecular. Aunque la hemoglobina mutada (hemoglobinopatía M) solo tiene inutilizados la mitad de sus grupos hemo para el transporte de oxígeno, carece de función, y su presencia en la sangre va acompañada de metahemoglobinemia y cianosis.

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICOS ALTERADAS (HEMOGLOBINOPATÍAS CON ALTERACIÓN DE CARGA SUPERFICIAL)

5. ANEMIA FALCIFORME, DREPANOCÍTICA O EN FORMA DE HOZ

La anemia falciforme o anemia drepanocítica pertenece al grupo de hemoglobinopatías más frecuentes. Es ocasionada por una hemoglobina S, así llamada por su inicial en inglés "sickle" = hoz, debido a la forma que adoptan los eritrocitos cuando disminuye su oxigenación.

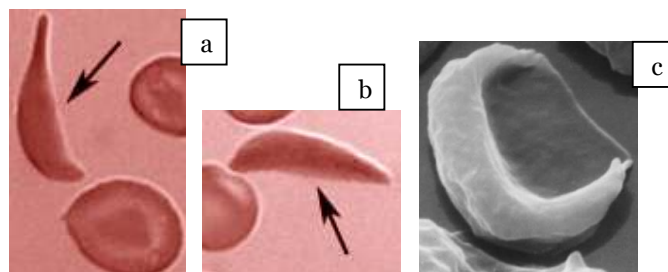


Figura 5: Observación de eritrocitos drepanocíticos (sickle cells) al MO (a y b) y al ME (c)

Descubierta en 1910 en un estudiante con una enfermedad dental, Herrick acuñó el término de "enfermedad falciforme" debido a la forma de los eritrocitos. Sin embargo, tuvieron que pasar 15 años antes de que esta enfermedad fuera considerada como primaria y no debida a una infección u otra condición. En 1927 Hahn y Gillespie demostraron que se podía provocar esta forma saturando de dióxido de carbono una suspensión de eritrocitos y hacia 1945 Pauling sugirió que la enfermedad se debía a un anormalidad de la molécula de hemoglobina a la que denominó hemoglobina S. Poco después, se evidenció que la hemoglobina S era el resultado de una mutación en el codón 6 del gen beta de la globina en la que la base adenina es sustituida por la timina (GAG → GTG) lo que ocasiona que el **Ac. glutámico** en la posición 6 de la globina sea sustituida por **valina**. Como esta sustitución se lleva a cabo en una posición superficial de la molécula de hemoglobina y la carga eléctrica es diferente, la movilidad electroforética de la HbS es menor que la de la hemoglobina normal, pudiéndose ser fácilmente separada.

La anemia falciforme se hereda en forma Autosómica Recesiva.

Debido a que los eritrocitos portadores de la hemoglobina S son resistentes a la infección por *Plasmodium falciparum* (responsable del paludismo), la distribución geográfica de esta hemoglobinopatía es paralela a las áreas donde ha existido o existe esta enfermedad

endémica. La mayor parte de los casos se encuentran en el África tropical donde hasta el 45% de la población es portadora de la mutación. También es frecuente en las áreas con población del color de EE.UU. y Centroamérica.

Genotipos de Anemia Falciforme

Se conocen varios genotipos de anemia falciforme (ver tabla N°2), caracterizados todos ellos porque la hemoglobina S constituye al menos la mitad de la hemoglobina presente: la forma más común homocigota es la hemoglobina S o anemia falciforme propiamente dicha, la hemoglobinopatía S/ β -talasemia (clínicamente indistinguible de la anemia falciforme), la hemoglobinopatía HbS/C (doble heterocigota para la HbS y la hemoglobina C) y hemoglobinopatía S con persistencia hereditaria de hemoglobina fetal, síndrome HbS/HbE (un síndrome muy raro con un fenotipo similar al de la HbS/B talasemia y otras combinaciones muy poco frecuentes de hemoglobinopatía S con otras hemoglobina anormales (Angeles, G-Philadelphia, HbO Arab, etc).

En los últimos años, la esperanza de vida ha mejorado notablemente estimándose que el 85% de los niños con anemia falciforme sobreviven hasta los 18 años y que los hombres llegan a vivir 42 años y las mujeres hasta los 48 años.

Tabla N°2 : Desordenes de Anemia Falciforme mas comunes		
Desordenes	Genotipo	Hemoglobinas
<u>Homocigota para HbS</u>		
- Enfermedad drepanocítica	$\alpha\alpha/\alpha\alpha \beta^S\beta^S$	S, F, A2
- Con α -talasemia	$-\alpha/-\alpha \beta^S\beta^S$ $-\alpha/\alpha\alpha \beta^S\beta^S$	S, F, A2↑ S, F, A2
<u>Heterocigota para HbS</u>		
- Rasgo drepanocítico	$\alpha\alpha/\alpha\alpha \beta^A\beta^S$	A, S, A2
- Con α talasemia	$-\alpha/-\alpha \beta^A\beta^S$ $-\alpha/\alpha\alpha \beta^A\beta^S$	A, S↓, A2 A, S, A2
- Con β talasemia	$\alpha\alpha/\alpha\alpha \beta^0\beta^S$ $\alpha\alpha/\alpha\alpha \beta^{+}\beta^S$	S, F, A2↑ S, A, F, A2↑
- Con variantes en cadena β	$\alpha\alpha/\alpha\alpha \beta^S\beta^C$ $\alpha\alpha/\alpha\alpha \beta^S\beta^D$ $\alpha\alpha/\alpha\alpha \beta^S\beta^O$ Arab Muchas otras	S, C, A2 S, D, A2 S, O _{Arab} , A2,
- Con variantes en cadena α	$\alpha^G\alpha/\alpha\alpha \beta^A\beta^S$ Otras interacciones mas	A, S, G, A2, G2, SG
- Con PHHF	$\alpha\alpha/\alpha\alpha \beta^{S-}$	S, F, A2

5.1- Fisiopatología

Como consecuencia de la mutación, cuando la hemoglobina se desoxigena, sufre un proceso espontáneo de polimerización formando un gel cristalino. Cada polímero está formado por 14 haces longitudinales de deoxi-Hb que se disponen formando un cuerpo tactoide, estructura cilíndrica insoluble y rígida. Debido a estos polímeros, se rompe el citoesqueleto del eritrocito, adoptando este la forma característica del drepanocito.

Aunque el fenómeno de la falciformación es reversible, entre el 5 y el 50% de los eritrocitos falciformes no consiguen recuperar su forma original, siendo eliminados por el sistema mononuclear fagocítico. Por otra parte, los eritrocitos alterados presentan un gran descenso del volumen corpuscular y un gran aumento de la concentración de hemoglobina. Esto es debido a que la deoxi-Hb induce alteraciones de la membrana eritrocitaria (modificación de la composición y distribución de los fosfolípidos en la bicapa) que se traducen por una

profunda deshidratación. Adicionalmente, los drepanocitos exhiben una gran tendencia a adherirse al endotelio vascular favoreciendo la formación de microtrombos y oclusiones vasculares periféricas.

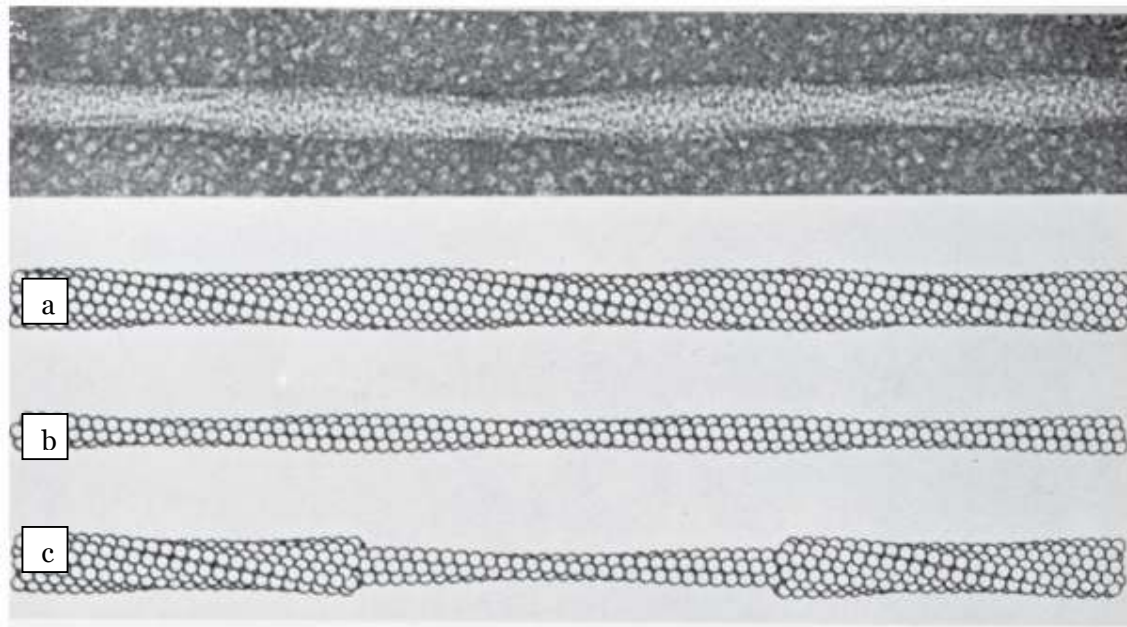
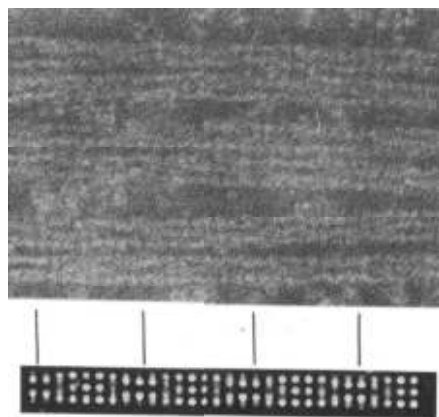


Figura 6: Micrografía electrónica de fibras teñidas negativamente de HbS y la estructura deducida por reconstrucción de la imagen tridimensional. Las fibras reconstruidas esta presente como modelos de balones, (cada balón representa un tetrámero de HbS). Los modelos se presentan como la cubierta exterior (a), el núcleo interno (b) y una combinación de ambos filamentos el externo y el interno (c)



Es interesante destacar que la hemoglobina S puede interaccionar con otras formas de hemoglobina, en particular con la hemoglobina fetal (HbF). En presencia de esta forma de hemoglobina, se reduce el grado de polimerización de la HbS, lo que explica que la anemia falciforme no se presente nunca durante el período neonatal o en la persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal. La inhibición de la polimerización de la HbS por la HbF requiere de la formación de formas híbridas asimétricas de HbS/HbF. Los residuos 22, 80 y especialmente 87 de la cadena gamma están implicados en los sitios de contacto intermolecular que estabilizan los polímeros de HbS desoxigenada, lo que contribuye a la forma distorsionada del hematíe y la disminución de su deformación.

Una de las características más importantes de esta enfermedad es la vaso-oclusión que es articular de la Hb S. La vaso-oclusión se inicia y es sostenida por la interacción entre las células deformadas por la polimerización de la Hb S el endotelio de los vasos y algunos

constituyentes del plasma. La desoxigenación de las células con hemoglobina S produce una salida de potasio de los glóbulos rojos, lo cual aumenta la densidad de los glóbulos y la tendencia de la hemoglobina S a polimerizarse.

5.2- Diagnóstico de Laboratorio

La confirmación diagnóstica de la anemia falciforme o de su carácter portador se lleva a cabo mediante el hemograma:

- hay anemia macro- o microcítica y reticulocitosis
- el examen morfológico del frotis que muestra la presencia de numerosos drepanocitos y
- la electroforesis de las hemoglobinas a pH alcalino que permite determinar el tipo de hemoglobina predominante, y que en el caso de la anemia falciforme homocigota es mayoritario con ausencia total de hemoglobina HbA normal. En el caso de la anemia falciforme portador heterocigoto las bandas electroforéticas de las HbA y HbS suelen ser de la misma intensidad.

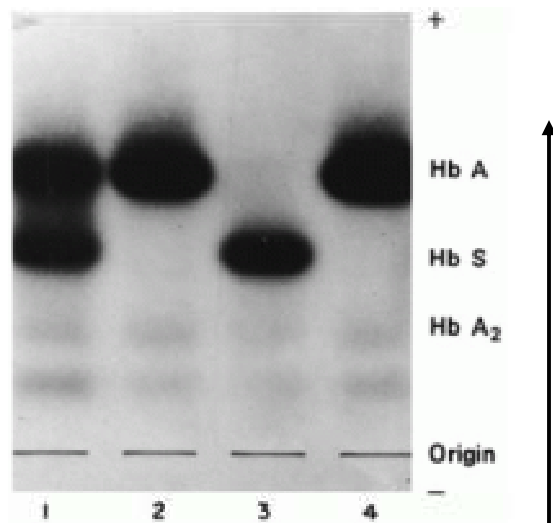


Figura 7: Electroforesis de hemoglobina (gel de almidón; pH8,6).
En donde 1: Rasgo drepanocítico; 2: normal; 3: anemia drepanocítica y 4: normal.

Para confirmar el carácter drepanocítico del componente hemoglobínico anormal se lleva a cabo el examen microscópico de los hematíes sometidos a desoxigenación sobre el portaobjetos.

5.3- Diagnóstico molecular

La mutación en el codón 6 del gen beta de la globina en la que una base adenina es sustituida por la timina ($GAG \rightarrow GTG$) ocasiona que el glutámico en la posición 6 de la globina sea sustituida por valina. Esta mutación puntual destruye el sitio de reconocimiento de la enzima DdeI (. El diagnóstico molecular consistirá en amplificación por PCR del segmento del gen de β -globina, corte con la enzima Dde I y electroforesis en un gel de agarosa.

5.4- Manifestaciones clínicas

La hemoglobinopatía S se presenta en dos formas clínicas: la homocigota, la más frecuente, en la que los pacientes experimentan anemia hemolítica y la heterocigota, generalmente asintomática. Durante el periodo neonatal, la anemia falciforme es poco manifiesta debido al efecto protector de la HbF. La intensidad de la enfermedad, que se manifiesta a partir de los 3 o 4 meses de edad, depende de su coexistencia con otras hemoglobinopatías asociadas y es muy variable de unos pacientes a otros.

En el desarrollo de la anemia falciforme pueden considerarse tres fases evolutivas con sintomatología característica: 1) fase estacionaria; 2) fase de expresividad aguda, y 3) fase de expresividad crónica.

1. Fase estacionaria.

Corresponde, generalmente, a los primeros años de vida (1-4 años), y sus manifestaciones clínicas son las propias de un síndrome hemolítico crónico moderado o intenso (anemia, palidez cutáneo-mucosa, subictericia conjuntival y retraso del crecimiento óseo y gonadal). En esta fase, es característica una intensa retención eritrocitaria esplénica (hiperesplenismo) con complicaciones vasooclusivas de carácter local y progresivo que conducen a la pérdida de la función esplénica o autoesplenectomía.

2. Fase de expresividad aguda.

Se inicia a partir de los 4 años de edad, con agravamiento del cuadro anémico ($Hb < 80$ g/L) y aparición de diversas manifestaciones clínicas de carácter agudo debidas a las crisis vasooclusivas que afectan de forma importante a diversos órganos, aunque muy especialmente al pulmón, al riñón y al tejido óseo (drepanocitosis).

Las **crisis vasooclusivas** constituyen, de hecho, la manifestación clínica más característica y grave de la anemia falciforme y, muchas veces, el primer síntoma. Se trata de ataques, muy dolorosos y pasajeros, que pueden durar días o semanas. Aunque pueden aparecer espontáneamente, lo más frecuente es que sean desencadenados por situaciones tan diversas como hipoxia, fiebre, infecciones, acidosis, deshidratación, hipotermia, cambios climáticos o estacionales y la menstruación. Obedecen a oclusiones de la microvasculatura que pueden afectar distintos territorios del organismo (huesos, tórax y zonas distales de las extremidades), generalmente acompañadas de infecciones, que suelen ser recidivantes. Una de sus manifestaciones más características es el dolor óseo generalizado o limitado a los huesos largos (húmero, fémur, tibias) en sujetos adultos o pequeños, de las extremidades superiores e inferiores (dactilitis) en los niños. La dactilitis da lugar al primer síntoma conocido como síndrome de manos y pies, consistente en inflamación, dolor agudo y muy intenso con tumefacción subcutánea de la superficie dorsal de manos y pies. Este síndrome puede confundirse fácilmente con un acceso de fiebre reumática o artritis séptica. Otras regiones que también suelen afectarse en las crisis dolorosas son la condrocostal (dolor torácico), vertebral (dolor dorso-lumbar) y el bazo (cuadro de dolor abdominal agudo). Las crisis vasooclusivas es el mesenterio, da lugar a infartos de los vasos mesentéricos, que son causa de dolor abdominal muy intenso y de carácter agudo (síndrome mesentérico).

Igualmente, la oclusión de vasos cerebrales es causa frecuente de accidentes neurológicos agudos, como hemiplejía, monoplejía y convulsiones. La intensidad y gravedad de estas crisis vasooclusivas puede variar de un paciente a otro, y existen formas relativamente benignas o con escasa expresividad clínica. Estos casos suelen ir acompañados de aumentos importantes de la concentración de HbF, que ejerce un efecto protector contra la disminución de la solubilidad.

Las infecciones constituyen la complicación más frecuente de la anemia falciforme, y son responsables de un elevado porcentaje de fallecimientos en estos enfermos. Ello obedece a que no solo constituyen una complicación del cuadro drepanocítico sino que son, en sí mismas, un factor desencadenante de las crisis.

La aparición de fiebre, taquipnea e intenso dolor torácico (síndrome torácico) constituye la causa más frecuente de hospitalización de los pacientes con anemia falciforme. El síndrome torácico pone de manifiesto una afectación del sistema vascular pulmonar, que casi siempre va acompañada de infección o hipertensión pulmonar, y que suele cursar con una insuficiencia cardiorrespiratoria grave que puede ser causa de muerte. Menos frecuentes que las complicaciones pulmonares son las oclusiones vasculares agudas de otros territorios, entre los que destacan la retina, el sistema nervioso central (SNC) y los cuerpos cavernosos del pene. La trombosis de la arteria central de la retina puede constituir una causa de ceguera (amaurosis) y la de los cuerpos cavernosos del pene, de priapismo que, con el tiempo, se transforma en impotencia, por fibrosis de los tejidos esponjosos eréctil del pene. Ambas

complicaciones son en general menos frecuentes que la trombosis cerebral, causa relativamente frecuente de apoplejía.

3. Fase de expresividad crónica. Es propia de los pacientes que han logrado sobrevivir la primera infancia, por lo que es característica de la adolescencia y la edad adulta. El carácter evolutivo crónico de la anemia falciforme afecta de forma importante al crecimiento y desarrollo corporal, al sistema nervioso central, cardiovascular, pulmonar, hepatobiliar y gastrointestinal. Asimismo, condiciona lesiones graves de la función renal y trastornos visuales que pueden conducir a la ceguera.

5.5- Patofisiología en la anemia drepanocítica: vías involucradas

La hemólisis de la anemia falciforme es, a la vez, intravascular y extravascular. El carácter intravascular resulta de la lisis de drepanocitos por acción del complemento (mayor sensibilidad al complemento) y la pérdida de deformabilidad por la falciformación (mayor fragilidad al cizallamiento de la circulación sanguínea).

El carácter extravascular resulta de la menor capacidad de deformabilidad de los drepanocitos.

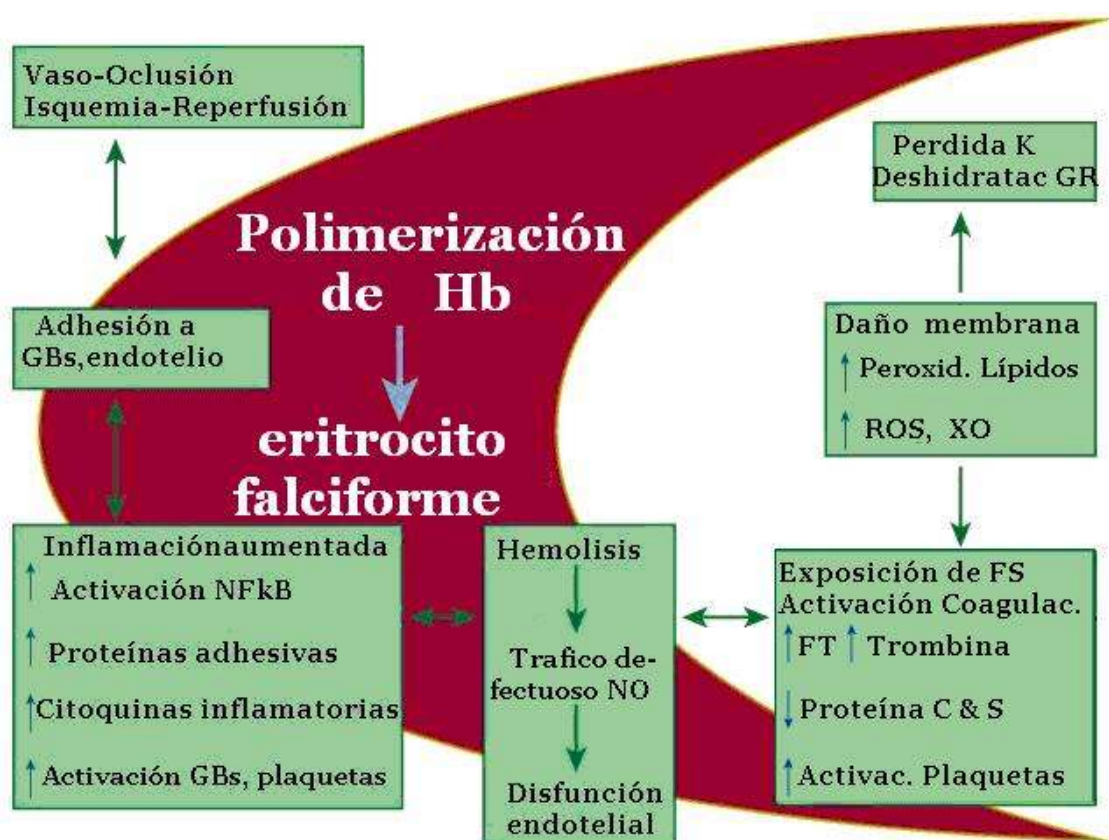


Figura 8: Esquema que resume la fisiopatología de la anemia por eritrocitos drepanocíticos. FS: fosfatidilserina; ROS: especies reactivas al oxígeno; TF: Factor Tisular; Leucocitos: GB; XO: xantina oxidasa.

POLIMERIZACION DE HEMOGLOBINA

La presencia de HbS, permite a esta polimerizar cuando se desoxigena, ya que la valina puede unirse a ésteres complementarios en cadenas de globina adyacentes. La polimerización de la HbS desoxigenada es el elemento primario indispensable en la patogénesis molecular de esta enfermedad. La agregación de las moléculas de desoxi-Hb S en los polímeros ocurre cuando los agregados alcanzar un tamaño termodinámico crítico. Este proceso se denomina nucleación homogénea y se llama núcleo crítico al menor conjunto formado que favorece el crecimiento del polímero. La adición de moléculas de desoxi-Hb S posteriores a los polímeros

ya formados se denomina nucleación heterogénea, lo que resulta en polímero ramificado (ver figura 5). El crecimiento del polímero es, por tanto, un proceso exponencial en el que hay un tiempo de retardo entre la presencia de moléculas de desoxi-Hb S y la formación de polímeros. Este tiempo de retardo es inversamente proporcional a la concentración de las moléculas de Hb S. La formación de polímeros altera las propiedades reológicas de los glóbulos rojos. El proceso de formación de células falciformes, que inicialmente es reversible con la oxigenación de la deoxi-hemoglobina S, eventualmente conduce a la formación glóbulos rojos en forma de hoz que no vuelven a su forma discoide normal con la oxigenación debido a daños en la membrana impartida por repetidos ciclos de formación de células falciformes y estado normal en la circulación. Estas células se denominan células irreversiblemente falciformes. La velocidad y el grado de polimerización dependen de varios factores, incluyendo la concentración de hemoglobina intracelular, la presencia de hemoglobinas distintas a Hb S, la saturación de oxígeno en sangre, pH, temperatura y el nivel de 2,3-BPG. La oclusión microvascular por glóbulos rojos falciformes que contienen polímeros es favorecida por los tiempos de tránsito prolongado a través de la microcirculación, la deoxigenación rápida y un mayor número de células falciformes que son más densas que las normales.

DESHIDRATACION CELULAR:

La injuria sobre la membrana en eritrocitos con Hb S resulta en alteración en la homeostasis de cationes. Las células falciformes rojas tienen una menor capacidad para mantener el potasio intracelular como resultado de la activación de los canales de calcio activados por potasio (canal Gardos), y el canal de cotransporte de cloruro-potasio. El resultado neto es la pérdida de potasio intracelular y el agua resultando deshidratación celular. Esto efectivamente aumenta la concentración de hemoglobina en los eritrocitos, favoreciendo la formación de células falciformes.

BARRIDO (SCAVENGING) DE OXIDO NITRICO (NO) Y DISFUNCION DE ENDOTELIO

NO es un gas soluble sintetizado a partir de L-arginina por la NOS endotelial (*eNOS*). La disminución de la producción de NO y los niveles de sustrato, es decir, L-arginina, se han documentado en SCD (sickle cell disease) especialmente durante las crisis de hemólisis vaso-occlusivas. Los procesos de hemólisis crónica con liberación de hemoglobina libre al plasma resulta en el “scavenging” del NO con la consiguiente disfunción endotelial. Ver Figura 9. Las reacciones involucradas son:

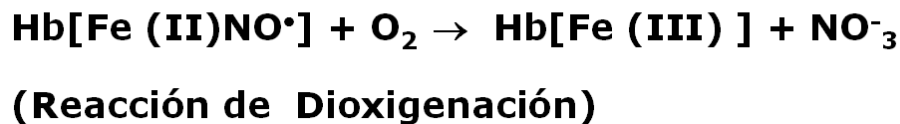
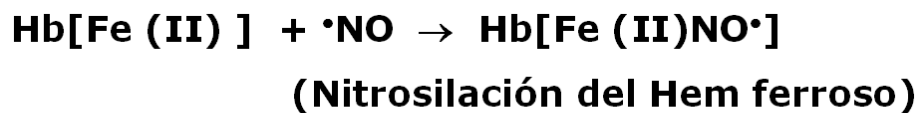


Figura 9: Reacciones de Hemoglobina libre con oxido nítrico.

Existen una serie de factores que provocan una activación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos denominada disfunción endotelial. La disminución de NO es una de ellas. **La activación de las células endoteliales** provoca la expresión en su superficie de moléculas de adhesión, entre las que se encuentra la molécula de adhesión de célula vascular-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) que permite la adhesión de monocitos y linfocitos T circulantes al endotelio, lo que inicia su reclutamiento.

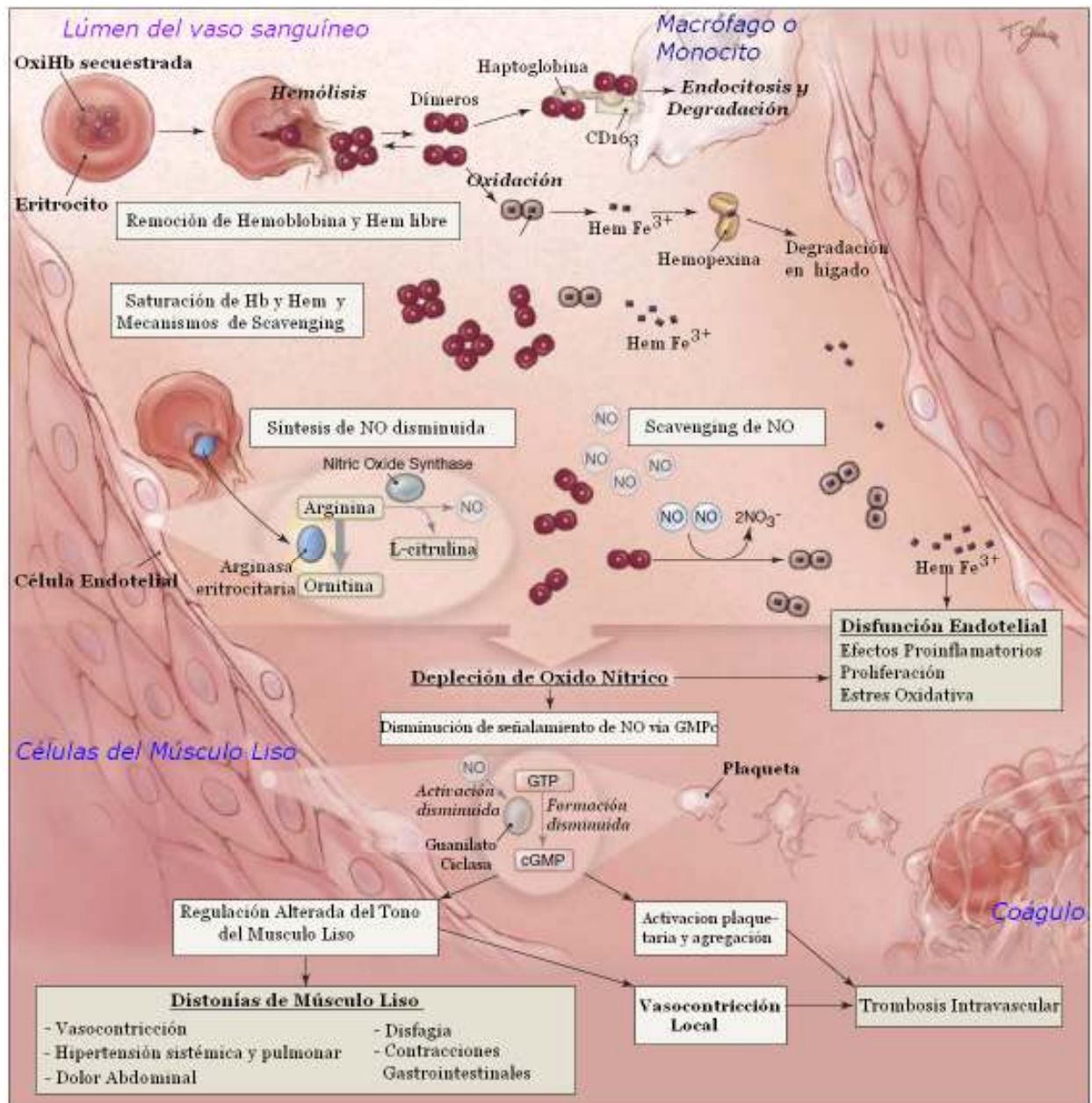


Figura 10: Durante la hemólisis intravascular, hemoglobina es liberada en el plasma donde normalmente es clarificada por los scavengers de hemoglobina: haptoglobina, CD163 y hemopexina. Los complejos haptoglobina-hemoglobina se une a CD 163 sobre la superficie de macrófagos/monocitos que inicia la endocitosis y degradación del complejo. Hemoglobina oxidada también libera hem férrico la cual es unida por la hemopexina y degradada por los hepatocitos en el hígado. La hemólisis excesiva satura y disminuye estos sistemas y genera un aumento de hemoglobina y hem en el plasma. Hemoglobina plasmática y el hem median efectos directos pro-inflamatorios, proliferativos y pro-oxidantes sobre las células endoteliales del vaso. NO es normalmente generada desde L-arginina en las células endoteliales por la enzima oxido nítrico sintasa (NOS). NO mantiene la relajación del músculo liso e inhibe la activación y agregación de plaquetas, regulando el tono vascular. Durante la hemólisis intravascular, la disponibilidad de NO puede ser limitada por esta reacción con oxihemoglobina (NO scavenging) y por la disminución de sus síntesis (por la ruptura del sustrato para la síntesis de NO: la L-arginina por la arginasa eritrocitaria). La deplición de NO resulta en una menor activación de de la Guanilato Ciclasa una enzima requerida para la generación de GMPC. La disminución de los niveles GMPC interrumpe la regulación del tono muscular liso que resulta en distonías. Además la disminución de los niveles de GMPC a través de la deplición de NO puede marcar una activación y agregación de las plaquetas que promueve la formación del coágulo.

ADHESIVIDAD CELULAR ANORMAL:

La activación del endotelio genera que las células rojas drepanocíticas se adhieren al endotelio a diferencia de sus contrapartes normales. Las células recientemente liberadas (reticulocitos), son más adherentes que los glóbulos rojos falciformes más densos. Se cree que esto se debe a que los glóbulos rojos más deformable se adhieren al endotelio activado tras la cual los glóbulos rojos densos se encuentran atrapados, lo que genera oclusión microvascular. Las moléculas implicadas en la adhesión de eritrocitos falciformes en el endotelio incluyen moléculas de adhesión celular vascular (VCAM-1), integrina $\alpha V\beta 3$, P-selectina y la trombospondina. El sitio de la adhesión inicialmente sería las vénulas postcapilares que es el sitio en donde células falciformes parecen interactuar con las células blancas adheridas al endotelio. Un alto número de neutrófilos son un factor pronóstico adverso en la anemia de células falciformes. Debido a su mayor tamaño, los leucocitos adherentes causan mayor disminución de calibre del vaso que los glóbulos rojos. Se produce diapédesis en las vénulas postcapilares, un sitio de vaso oclusión en la anemia de células falciformes. Aumento de los niveles de las moléculas de adhesión de neutrófilos, L-selectina, integrinas $\alpha M\beta 2$ se asocian con un fenotipo clínico grave.

INFLAMACION:

La anemia falciforme crónica se caracteriza por leucocitosis, activación anormal de los neutrófilos, monocitos y un aumento de varios mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF α), la interleuquina (IL) -6, IL-1. Varias moléculas de adhesión son upregulated, por ejemplo, VCAM, selectinas y las integrinas y se producen un aumento de reactantes de fase aguda, como la proteína C-reactiva, fosfolipasa A2 secretora (sPLA2) y la activación de la cascada de coagulación.

ISQUEMIA-REPERFUSIÓN:

Similar a otros estados de enfermedad, por ejemplo, infarto de miocardio, la resolución de la vaso-oclusión resulta en la repercusión de la lesión caracterizada por la generación de estrés oxidativo, la peroxidación de lípidos y aumento de la expresión del factor nuclear-B, un jugador clave en el proceso inflamatorio.

LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DE COAGULACIÓN:

En los pacientes con anemia de células falciformes hay un aumento en los niveles del factor tisular (activador de la cascada extrínseca de la coagulación). La exposición de fosfatidilserina (factor tisular) en la superficie de los glóbulos rojos da un nuevo impulso para la activación de los procesos de coagulación. La mayor generación de trombina, la activación plaquetaria y la fibrinólisis puede resultar en favor de un estado procoagulante.

VASCULOPATIA CRONICA:

En la anemia de células falciformes, varios lechos vasculares muestran cambios similares a la enfermedad vascular aterosclerótica: hiperplasia de la capa íntima de los vasos y la proliferación del músculo liso. Sin embargo, las placas cargados de lípidos de características de la enfermedad vascular aterosclerótica no están presentes.

TODO ESTO GENERA LAS CRISIS DE VASOCLUSION**6. OTRAS VARIANTES ESTRUCTURALES DE HEMOGLOBINA CON PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS ALTERADAS**

Las otras variantes de hemoglobina que son encontradas comúnmente son Hemoglobinas C, D y E.

Hemoglobina C: fue la segunda variante a ser identificada electrofóreticamente. Resulta de la sustitución de Lisina por Ac.Glutámico en la posición 6 de la cadena de β de globina. Existe un número de observaciones que sugieren que la Hemoglobina C es menos soluble que la Hemoglobina A y tiene tendencia a cristalizar en el eritrocito.

Hemoglobina D: este termino se usa par describir un número de variantes de hemoglobinas que tienen una velocidad de migración idéntica a HbS en una electroforesis a pH alcalino. La mas común de estas hemoglobinas es la Hb D- LOS ANGELES, sus eritrocitos son normales excepto por el elevado numero de células target.

Hemoglobina E: Es la variante más común en el mundo. Resulta de la sustitución de Acido Glutámico por Lisina en la posición 26 en la cadena β de globina.

7. VARIANTES DE HEMOGLOBINA INESTABLES

Más de 90 hemoglobina inestables se han informado. Sin embargo el término de hemoglobina inestable es usualmente reservado para los fenotipos clínicos asociados con variantes en la cual la inestabilidad de la misma es suficiente para causar hemólisis reconocible clínicamente. El cuadro clínico asociado a tales hemoglobina anormales es llamado Anemia Hemolítica Congénita de Cuerpos de Heinz, (CHBA: congenital Heinz body hemolytic anemia).

7.1- Bases moleculares de la inestabilidad de hemoglobinas

Hay 5 diferentes clases de mutaciones que pueden resultar en inestabilidad de hemoglobina:

(1)Mutaciones en el bolsillo del hem. La unión del hem a la globina involucra interacciones específicas con residuos de aminoácido no polares en las regiones CD, E, F, y FG de las subunidades de globina. La mayoría de estos residuos NO son variables, su sustitución marca una disminución en la estabilidad de la unión de globina al hem, con pérdida del grupo hem. Algunos ejemplos se pueden observar en la figura 11-A.

(2) Mutaciones con ruptura de α -hélice: este grupo está integrado por variantes inestables que interrumpen la estructura secundaria de las cadenas de globina. Cerca del 75% de las cadenas de globinas se encuentran en la forma de α -hélice. En la α -hélice el aminoácido Prolina (Pro) no puede participar excepto como parte de uno de los tres residuos iniciales. Once hemoglobina inestables se han descriptos que resultan de la sustitución de prolina por leucina, cinco que son causadas por un cambio de alanina por prolina y tres en la cual Prolina es sustituida por histidina. Estas mutaciones generan alteraciones conformacionales de las hemoglobinas. Figura 11-B

(3) Mutaciones en las zonas de contacto (interfaz) $\alpha_1\beta_2$: el primer paso en el ensamble del tetrámero de Hemoglobina es la formación de un dímero $\alpha\beta$ esta estructura es estabilizada por una estructura secundaria que expone los aminoácidos cargados (ac.glutámico, ac. aspartico, lisina y arginina) sobre la superficie de la molécula en contacto con el H₂O y estabiliza el interior de la molécula (interfaz $\alpha\beta$) con interacciones hidrofóbicas. Algunas de estas variantes resultan en alteración de la estructura terciaria y por tanto permiten acceso de agua al interior hidrofobico de la subunidades de globina. Como consecuencia de ello se produce la disociación de las cadenas de hemoglobina.

(4) Deleciones de aminoácidos: Este defecto y el siguiente (5) resultan de anormalidades estructurales groseras de las subunidades de globina. Al menos 11 variantes contienen deleciones de 1-5 residuos aminoácidos, muchos de los cuales involucran regiones en o cerca de las esquinas interhélices.

(5) Cadenas Elongadas: unas pocas variantes inestables a causa de mutaciones en el codón de terminación (o stop) o en el marco de lectura que generan cadenas de globina elongadas (más largas) que son no funcionales.

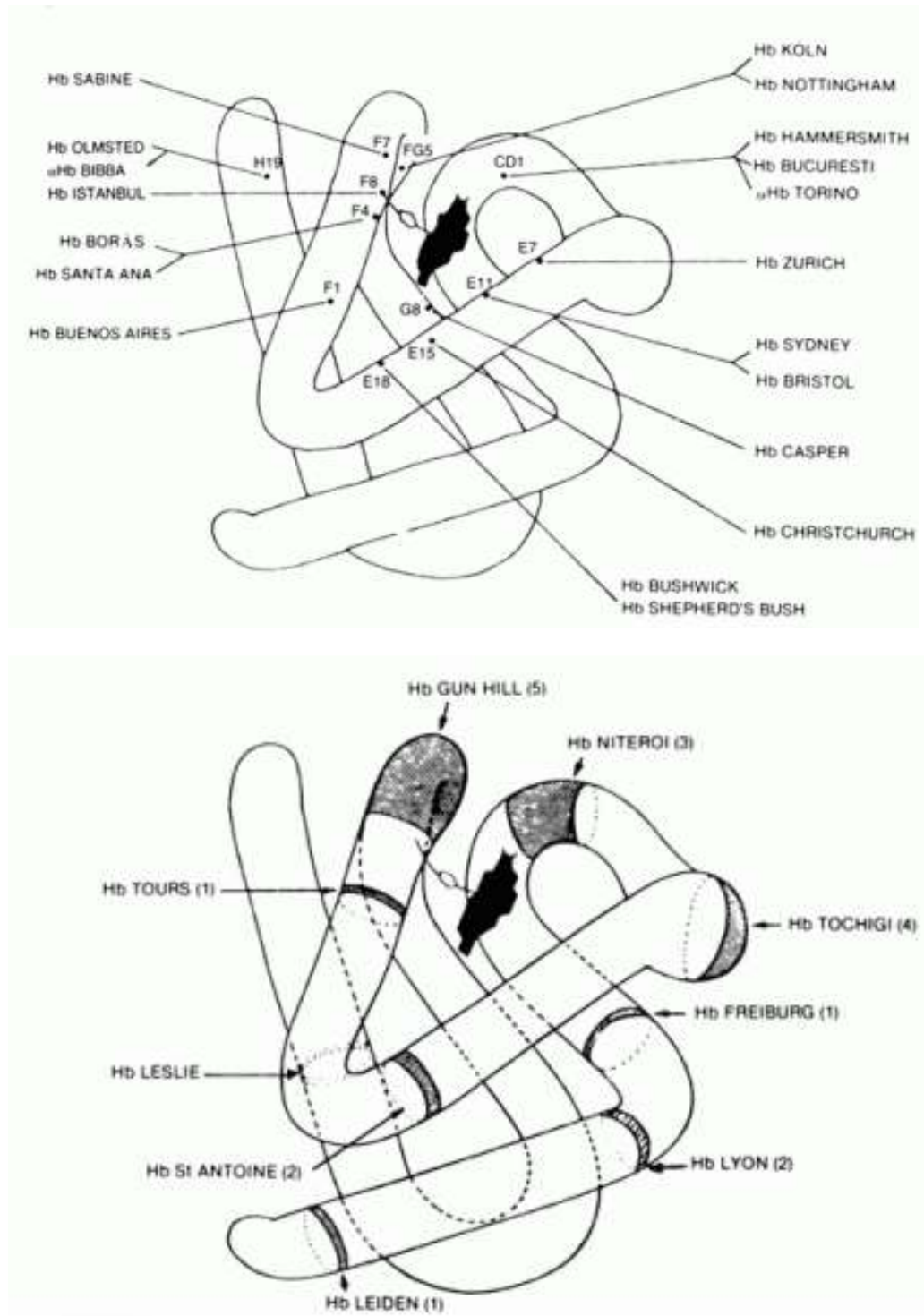


Figura 11: Hemoglobina inestables. A-Mutaciones tipo1. B- Mutaciones tipo 2, 3, 4, 5 y 6.

Dependiendo del tipo de mutación y después de la formación de metahemoglobina, la formación de cuerpos de Heinz puede hacerse por dos mecanismos diferentes:

- a) disociación de las subunidades hemoglobínicas, seguida de desheminización y precipitación de la globina, y
- b) formación de hemicromos o moléculas de metahemoglobina en las que la quinta y la sexta valencia de coordinación del ion férrico se hallan unidas a la cadena de globina.

7.2- Mecanismos de formación de los cuerpos de Heinz

La oxihemoglobina en solución se autooxida (1) y se transforma en metahemoglobina (metHb-Fe⁺³). En este proceso de auto-oxidación se produce ion superóxido (O₂⁻), (2). Figura N° 12.

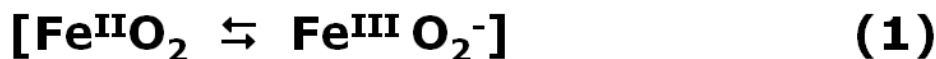
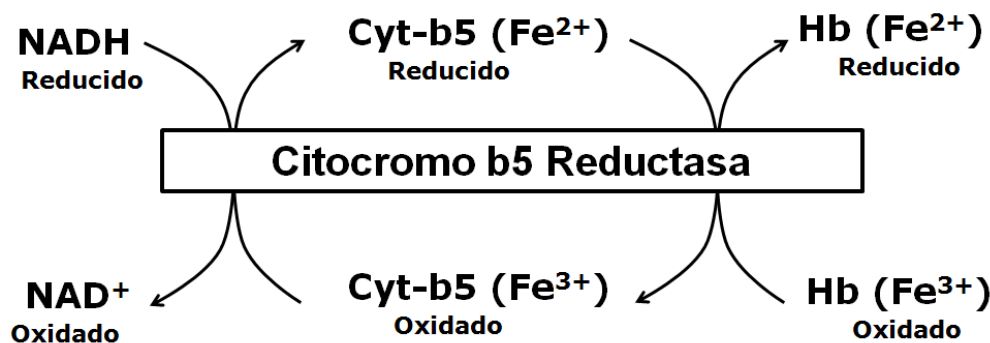


Figura 12: Mecanismo de formación metahemoglobina.

Normalmente se genera 0,5% a 3% de metahemoglobina al día. En condiciones fisiológicas, el sistema citocromo b5-metahemoglobina reductasa dependiente de NADH representa cerca del 99% de la reducción diaria de metahemoglobina a la hemoglobina. El sistema comprende tres elementos: NADH, la proteína citocromo b5 (con un grupo prostético Hem y la enzima citocromo b5 reductasa. El donante de electrones es NADH es un producto de la oxidación de la glucosa. Los electrones pasan de NADH a citocromo b5 y finalmente a metahemoglobina; la transferencia de electrones está catalizada por la enzima citocromo b5 reductasa.



Las hemoglobinas inestables muestran una velocidad de autooxidación mayor que la hemoglobina normal y el sistema del citocromo b5-metahemoglobina reductasa dependiente de NADH es insuficiente para mantener Hb (Fe²⁺). La meta hemoglobina puede ser convertida en hemicromo. Estos aparecen cuando la sexta posición de coordinación del hierro se une de manera covalente con un ligando en la molécula de Hb (histidina distal-E7), lo que distorsiona la estructura terciaria.

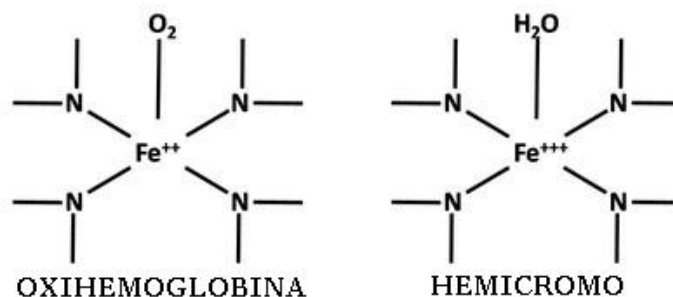


Figura 13: Se denominan genéricamente como hemicromos a todos los derivados férricos, cuya quinta y/o sexta posición de coordinación con el hierro se une en otra posición de la normal (quinta posición de coordinación del hierro se une a una fenilalanina proximal (F8) o la sexta posición de coordinación del hierro se une a la histidina

distal (E7), generando una distorsión de la molécula. Pueden ser fácilmente reducidos al estado ferroso por el sistema enzimático citocromo B-metaHb reductasa (en presencia de citocromo B y NADH+H⁺), en este caso es un hemicromo reversible.

Los hemicromos pueden ser reversibles o irreversibles dependiendo del grado de distorsión de la molécula de Hb y la capacidad potencial de la enzima metahemoglobina reductasa de reducirlos. Cuando los fenómenos oxidativos facilitan la ruptura de los contactos se produce la disociación de las cadenas polipeptídicas en dímeros y monómeros que precipitan y constituyen las inclusiones cocoides intraeritrocitarias denominadas cuerpos de Heinz, que se unen a la membrana y acortan la vida del glóbulo rojo.

La formación de los cuerpos rígidos de Heinz causa retardo del pasaje de los eritrocitos a través en la microcirculación y aumenta su destrucción prematura. Además, la formación de metahemoglobina favorece la disociación del hem desde la hemoglobina. Ver Figura N°14 donde se denota el mecanismo de formación de los cuerpos de Heinz.

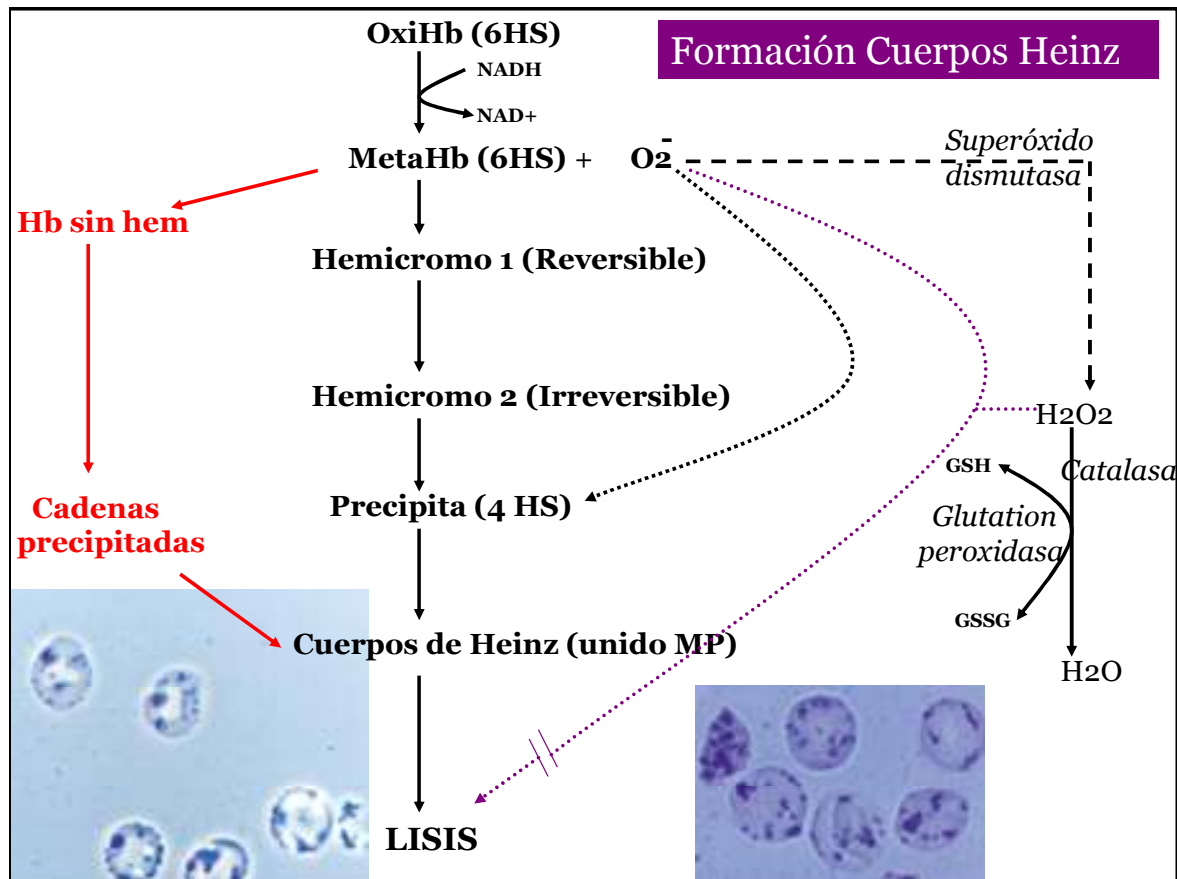


Figura 14: Mecanismo de formación de cuerpos de Heinz. La metahemoglobina puede ser convertida en hemicromos. Un hemicromo se genera cuando el Hem sale del bolsillo que lo contiene y se une a otro sitio de la cadena (quinta posición de coordinación del hierro se une a una fenilalanina proximal (F8) o la sexta posición de coordinación del hierro se une a la histidina distal (E7)). Hay precipitación intraeritrocitaria y oxidación de los grupos sulfhidrilos de la hemoglobina. Se forman puentes disulfuro entre las cadenas de globina y los -HS de Banda 3. Se observan los cuerpos cocoides unido en la membrana plasmática ocasionando los denominados cuerpos de Heinz, lo cual ocasiona hemólisis intra y extravascular. Donde -HS: grupos sulfhidrilos; MP: membrana plasmática.

En resumen: Los hemicromos son moléculas de metahemoglobina en las que la quinta y la sexta valencia de coordinación del ión férrico se hallan unidas a la cadena de globina. Los cuerpos de Heinz nunca se observan mediante la coloración convencional de May-Grunwald-Giemsa (MGG) sino que requieren la previa incubación de los eritrocitos con un colorante supravital como por ejemplo azul brillante de cresilo o azul de metileno, habitualmente empleados en la tinción de reticulocitos.

7.3- Mecanismo de Hemólisis

Los eritrocitos que contienen los cuerpos de Heinz tienen disminuida la capacidad de deformabilidad. Las células son atrapadas durante el tránsito entre los cordones y sinusoides del bazo. Este proceso causa daño de la membrana que también puede ser mediado por la adherencia de los cuerpos de Heinz a la superficie interna de la membrana del eritrocito. No se conoce exactamente el mecanismo por el cual se produce.

Una teoría propuesta como mecanismo de hemólisis sería la siguiente (1º) un aumento de la oxidación y fosforilación de tirosina en la proteína Banda 3 (conocida también como intercambiador aniónico (AE1, anion exchange); (2º) reclutamiento progresivo de AE1 fosforilada en grandes complejos en membrana lo cuales contienen hemicromos y (3º) paralela lisis de los eritrocitos y una masiva liberación de vesículas que contienen hemicromos.

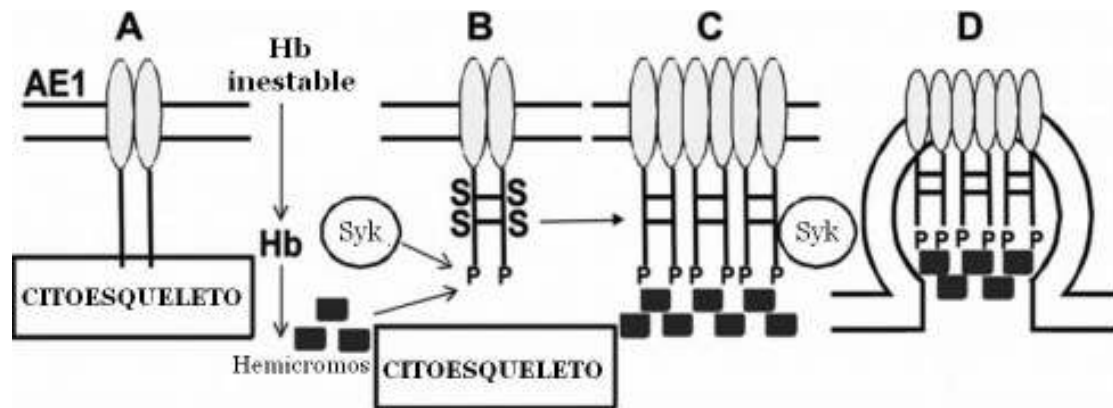


Figura 14: Mecanismo propuesto. AE1 es dinámicamente asociado con el citoesqueleto a través de la unión de anquirina en células normales de eritrocitos (A). En células afectadas se produce una oxidación irreversible entre los grupos -SH de AE1 y hemoglobina y formación de los cuerpos de Heinz. Cuando el eritrocito circula por el bazo, existe una fosforilación por una tirosina quinasa de bazo (Syk: spleen tyrosine kinase); que promueve la fosforilación de AE1, disminución de la afinidad con anquirina (citoesqueleto), aumento de la movilidad lateral y agrupamiento (clustering) de AE1 fosforilada (C). Grandes agregados de AE1 y hemicromos son liberados en vesículas (D) y Hemólisis.

Las cadenas que hay en exceso, unidas al esqueleto de membrana pierden thioles, presumiblemente debido al ataque oxidativo. Existe un aumento de radicales libres, dienos conjugados (marcadores de oxidación de lípidos). En los eritrocitos con defectos se encuentra aumentado los niveles de sistema de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y niveles aumentados de ROS (especies reactivas al oxígeno).

7.4- Mecanismos de Remoción Fagocítica de Eritrocitos

La secuencia de eventos sería:

- Unión de los hemicromos a la proteína Banda 3 (AE1),
- Oxidación de los -SH dominios citoplasmático de Banda 3,
- Generación de agregados de alto peso molecular de Banda 3 (clustering de banda 3) que une IgG y complemento,
- Opsonización con Anticuerpos anti- Banda3
- Reconocimiento por parte del sistema mononuclear-fagocítico y fagocitosis por macrófagos.

8. VARIANTES CON AFINIDAD ALTERADA AL OXIGENO

Distintas síndromes clínicas resultan de anomalías en la unión al O₂ por hemoglobina anormales. Tabla 3. Se han encontrado tanto con altas o bajas afinidad al O₂. Cerca de un

tercio de las variantes inestables descritas anteriormente poseen una incrementada afinidad al O₂. Hay cerca de unas 40 anormalidades en la cual el incremento de la afinidad al O₂ ocurre sin inestabilidad. Estas variantes algunas veces asociadas a síndromes de policitemia. Por el otro lado, las variantes caracterizadas con baja afinidad al O₂ pueden resultar en formas heredables de anemia con cianosis.

8.1- Variantes con alta afinidad al O₂ y Policitemia

Como se sabe la hemoglobina existe en un equilibrio entre 2 conformaciones cuaternarias, R (Relaxed State) y T (Tense State). Cuando esta totalmente desoxigenada (desoxi-Hb) asume un estado T en la cual tiene una baja afinidad por O₂ y relativamente alta por otras moléculas alostéricas como protones Bohr y 2,3-DPG. Por el otro lado, oxihemoglobina existe en el estado R en el cual tiene alta afinidad por el O₂ y baja por los otros efectores alostéricos. La transición entre estos dos estados requiere cooperación entre las subunidades.

La mayoría de las variantes de hemoglobina con alta afinidad por O₂ resultan de mutaciones que causan sustituciones de aminoácidos que afectan el equilibrio entre los estados R y T. La característica más usual de estos pacientes es un eritrocitosis en los exámenes hematológicos de rutina.

8.2- Variantes con baja afinidad al O₂

Hay unos pocos casos descritos, ver tabla 2. En este grupo hay algunas hemoglobina inestables y algunas hemoglobina M también tienen una afinidad disminuida al O₂.

Tabla N° 3: Variantes de Hemoglobina con afinidad alterada al Oxígeno	
Variantes con alta afinidad al O₂	
<u>- Mutaciones en los contactos $\alpha\beta_2$</u>	
Hb CHESAPEAKE	$\alpha 92$ Arg→Leu
Hb J-CAPE TOWN	$\alpha 92$ Arg→Gln
Hb TARRANT	$\alpha 126$ Asp→Asn
Hb LEGNANO	$\alpha 141$ Arg→Leu
<u>- Mutaciones en los sitios de unión del 2,3 DPG</u>	
Hb RAHERE	$\beta 86$ Lys→Thr
Hb HELSINKI	$\beta 82$ Lys→Met
Hb PROVIDENCE	$\beta 82$ Lys→Asn
<u>- Mutaciones en el sitio de unión del Hem</u>	
Hb HEATHROW	$\beta 103$ Phe→Leu
Variantes con baja afinidad al O₂	
<u>- Mutaciones en los contactos $\alpha\beta_2$</u>	
Hb KANSAS	$\beta 102$ Asn→Thr
Hb BETH ISRAEL	$\beta 102$ Asn→Ser
<u>- Mutaciones en los sitios de unión del 2,3 DPG</u>	
Hb RALEIGH	$\beta 1$ Val→Acet. Ala

8.3- Variantes de Hemoglobina debido a Cianosis Congénita

HEMOGLOBINOPATIAS M

La mutación por HbM puede afectar a las cadenas α o β y se caracteriza por preservar el hierro de dos (2) de los cuatro grupos hemo en estado férrico (Fe³⁺) permanente. Debido a ello, estas hemoglobinas presentan una oxigenación parcial, y parte importante de ellas se

halla siempre en estado desoxigenado. Por ello, a este tipo de metahemoglobinas se las conoce como HbM, y se clasifican según las diferentes áreas geográficas en las que se han descrito. Cuando la concentración de hemoglobina desoxigenada supera los 50 g/L la sangre adquiere una tonalidad azulada que se refleja en la piel y las mucosas dando lugar a cianosis. Las hemoglobinas M se heredan con carácter autosómico dominante, y debido a ello, los portadores heterocigotos presentan cianosis sin ningún otro trastorno, excepto en aquellos casos en los que la HbM es, además, inestable, y en los que a la cianosis se sobreañade un cuadro de hemolisis crónica (HbM Saskatoon y HbM Hyde Park).

9. **BIBLIOGRAFIA:**

- **D.J. Weatherall, J.B. Clegg, D.R. Higgs, W.G. Wood.** Chapter 113: The Hemoglobinopathies. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly W S, Valle D (eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, McGraw Hill, 2001; page. 3417-3484.
- **D.J. Weatherall, J.B. Clegg, D.R. Higgs, W.G. Wood.** PART 19: BLOOD. Chapter 181: The Hemoglobinopathies. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly W S, Valle D (eds). The online metabolic & molecular bases of inherited disease. New York, McGraw Hill, 2012; pag. 1-151.
- **Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM.** Pathophysiology of Sickle Cell Disease. Annu Rev Pathol. 2019 Jan 24;14:263-292. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30332562; PMCID: PMC7053558.
- **Piel FB, Steinberg MH, Rees DC.** Sickle Cell Disease. N Engl J Med. 2017 Apr 20;376(16):1561-1573. doi: 10.1056/NEJMra1510865. PMID: 28423290.
- **Bibas M.** Sickle Cell Disease. N Engl J Med. 2017 Jul 20;377(3):303-304. doi: 10.1056/NEJMc1706325. PMID: 28723336.
- **Kenneth Kaushansky, Marshall A. Lichtman, Thomas J. Kipps, Uri Seligsohn, Josef T. Prchal.** 2010. Williams Hematology, Eighth Edition. CD ISBN 978-0-07-162145-8; MHID 0-07-162145-8.
- **Russell P. Rother, Leonard Bell, Peter Hillmen, MB, and Mark T. Gladwin.** 2005. The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin. A Novel Mechanism of Human Disease. *JAMA*, 293:1653-1662.
- **Pantaleo A, Ferru E, Carta F, Mannu F, Simula LF, Khadjavi A, Pippia P and Turin F** (2011) Irreversible AE1 Tyrosine Phosphorylation Leads to Membrane Vesiculation in G6PD Deficient Red Cells. *PLoS ONE* 6(1): e15847