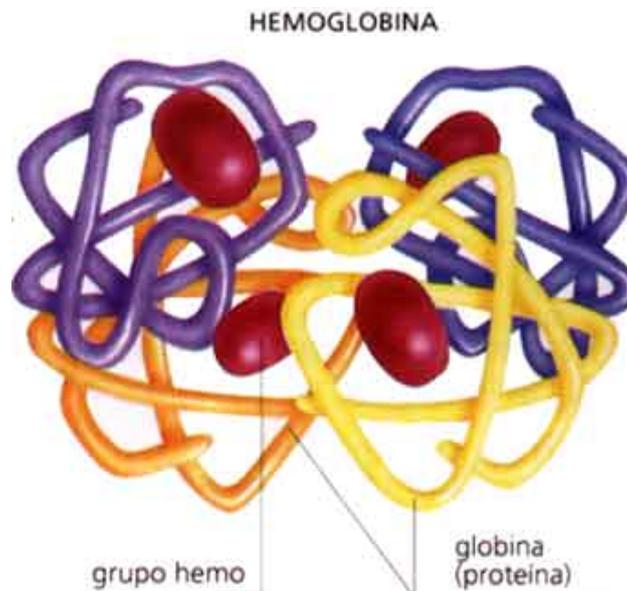


## HEMOGLOBINA Y SUS DERIVADOS CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA HEMOGLOBINA

Hemoglobina, pigmento especial que predomina en la sangre cuya función es el transporte de oxígeno. Está presente en todos los animales, excepto en algunos grupos de animales inferiores. Participa en el proceso por el que la sangre lleva los nutrientes necesarios hasta las células del organismo y conduce sus productos de desecho hasta los órganos excretores. También transporta el oxígeno desde los pulmones donde la sangre lo capta, hasta los tejidos del cuerpo. La deficiencia de hemoglobina originada por la carencia de hierro conduce a la anemia. La hemoglobina transporta más de veinte veces su volumen de oxígeno. Su unión con el monóxido de carbono es irreversible, es decir, no puede volver a unirse al oxígeno ante lo que se origina la asfixia.

### ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA



La Hemoglobina (Hb) es una molécula proteica que constituye el 95% del peso seco eritrocito. Debido a ello es el componente funcional más importante del eritrocito. La molécula de hemoglobina pesa 64.500 Daltons.

Mediante la Hb, el eritrocito realiza su función transportadora de oxígeno ( $O_2$ ) desde los pulmones a los tejidos, en los pulmones, el  $O$  se fija a la Hb y da lugar a la formación de oxihemoglobina ( $HbO_2$ ) y de esta forma es transportada hacia los tejidos, donde el  $O_2$  es liberado y la Hb se reduce a desoxihemoglobina (Hb-red).

Cada molécula de Hb puede fijar un máximo de 4 moléculas de Oxígeno (u 8 átomos) y en este caso se diría que está saturada. La unión entre el  $O_2$  y la Hb es de tipo coordinado y por tanto fácilmente dissociable. En condiciones

patológicas, la Hb puede fijar otros gases, como por ejemplo el ácido sulfhídrico (SH<sub>2</sub>) o el monóxido de carbono (CO) dando lugar a la Sulfahemoglobina y caboxihemoglobina, respectivamente, que son tóxicos para el organismo ya que impiden el transporte normal de oxígeno. Una de las causas más frecuentes de carboxihemoglobinemia es la inhalación del humo procedente de los cigarrillos o cigarros puros.

La molécula de Hemoglobina está formada por 4 moléculas de globina iguales 2 a 2 y cuatro grupos hemo, cada uno de los cuales se halla unido a una cadena de globina. La globina es una proteína globular cuyas características varían con el desarrollo del organismo, de forma que difieren según se trate de la vida embrionaria, la fetal o la adulta. En el individuo adulto existen cuatro formas moleculares diferentes de cadenas globínicas:

- 1) Cadena Alfa
- 2) Cadena Beta
- 3) Cadena Delta
- 4) Cadena Gamma

En el curso del desarrollo del organismo humano estas cadenas se combinan entre si de diferente manera, lo cual produce diversas formas moleculares de hemoglobina. Durante la vida adulta la forma de hemoglobina predominante (aproximadamente el 97%) es la HbA, existiendo una pequeña proporción (3%) de una fracción denominada HbA<sub>2</sub>. Durante la etapa fetal del desarrollo predomina la llamada Hemoglobina fetal (HbF), que en la edad adulta existe en muy pequeña proporción (<0,5%). En el embrión coexisten otras hemoglobinas formadas por cadenas hemoglobínicas inexistentes durante el período fetal o adulto del desarrollo: Hb Gower I, Hb Gower II, y Hb Pórdand.

El grupo Hemo es el componente no proteico de la Hb y a él se debe el color rojo de la sangre. Estructuradamente se compone de una Porfirina (Protoporfirina IX) formada por 4 pirróles en disposición espacial bidimensional o plana y 1 átomo de Fe en estado reducido Fe<sup>++</sup> situado en el centro. La protoporfirina IX es sintetizada en el eritroblasto a partir de glicocola y ácido succínico para la cual se requiere de fosfato de piridoxal (Vitamina B<sub>6</sub>). El átomo de Fe<sup>++</sup> se halla fijado a los 4 grupos pirróles mediante valencias de coordinación. La estructura espacial que adopta el átomo de Fe<sup>++</sup> en su unión con la protoporfirina IX hace que posea un total de 6 valencias de coordinación, por lo que quedan dos de ellas libres, una (5ta valencia) para unirse a la cadena de globina y otra (6ta valencia) para fijar reversiblemente el oxígeno. Este sólo se fija al hierro en forma reducida (Fe<sup>++</sup>). Cuando el hierro se halla en forma oxidada (Fe<sup>+++</sup>), la hemoglobina, se denomina, metahemoglobina y carece de función respiratoria. En condiciones fisiológicas la metahemoglobina siempre se halla en proporción inferior al 1% del total de Hb gracias a la actividad diaforasa presente en el interior del eritrocito.

La DIAFORASA mantiene permanentemente el hierro de la Hb en estado reducido evitando la pérdida de su función. Cuando en situaciones patológicas la metahemoglobina aumenta por encima del 10% la piel adquiere un color azulado característico (CIANOSIS).

La estructura terciaria de cada cadena de globina habilita una cavidad en su superficie donde se inserta el grupo hemo (cavidad del hemo). Así cada molécula de Hb contiene 4 grupos hemo. La unión entre el hemo y la correspondiente globina se realiza, principalmente a través de la 5° valencia de coordinación del hierro  $Fe^{++}$  y además a través de otros puntos de anclaje situadas en las uniones covalentes, que se establecen entre algunas cadenas laterales de los grupos pirrol y los aminoácidos de la cadena de globina.

Las uniones globina-globina mantienen la estabilidad de la molécula y son muy importantes para que ésta realice su función respiratoria- En la. HbA normal existen 2 tipos de uniones fundamental es.

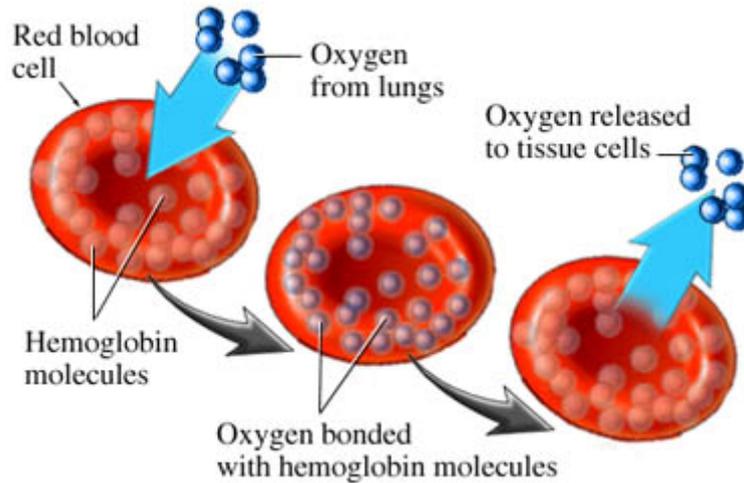
- 1) Uniones Débiles alfa 1 beta 2 (contacto entre 19 aminoácidos)
- 2) Uniones Fuertes alfa 1 beta 1 (contacto entre 34 aminoácidos)

Las uniones entre cadenas idénticas (alfal-alfa2 y betal-beta2) están formadas por un escaso número de enlaces.

**FUNCIONES DE LA HEMOGLOBINA.-** Consiste fundamentalmente en el transporte de oxígeno desde los pulmones a los tejidos y en parte también del dióxido de carbono ( $CO_2$ ), en sentido inverso. A diferencia del transporte de oxígeno, el  $CO_2$  por la hemoglobina, se realiza mediante unión covalente con los grupos amino de las cadenas globínicas, dando lugar a la carbamino hemoglobina, que tiene un color algo más oscuro que la oxihemoglobina. El resto de  $CO_2$  que constituye la mayor parte, es transportado por el plasma en forma de bicarbonato.

Cuando la concentración de  $O_2$  es elevada., como sucede en los pulmones, todas las moléculas de hemoglobina se saturan de oxígeno y cuando disminuye como sucede por ejemplo, en los tejidos, la hemoglobina libera, progresivamente su oxígeno de acuerdo con una cinética sigmoide característica.

En la función hemoglobínica intervienen también factores reguladores diversos, entre los que destacan el pH (concentración de hidrógenos), la propia concentración de  $CO_2$  y el 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) un metabolito de la glucólisis, esta actúa disminuyendo la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, lo que favorece con ello la liberación del oxígeno en los tejidos (oxigenación).



## CATABOLISMO DE LA HEMOGLOBINA

El catabolismo de la hemoglobina, es un proceso inherente a la destrucción fisiológica de los eritrocitos envejecidos por los macrófagos del organismo (médula ósea y bazo principalmente). Desde que sale de la médula ósea, un eritrocito normal circula por la sangre unos 120 días y al igual que cualquier otra célula, va perdiendo su capacidad metabólica y antioxidante. Este envejecimiento fisiológico produce lesiones irreversibles en la de su membrana, que facilitan su eliminación por el sistema mononuclear fagocítico (SMF). De hecho los eritrocitos envejecidos dejan de ser reconocidos por el organismo y se comportan como partículas extrañas que al igual que éstas, son finalmente destruidos. Como consecuencia de ello y en la propia célula macrofágica, la hemoglobina se degrada en sus constituyentes elementales; globina y hemo. Los aminoácidos de la globina son reutilizados y el hemo pierde su átomo de hierro, que también se reutiliza para las síntesis de Hb. El componente estructural del grupo, la protoporfirina IX, se transforma en un producto de excreción conocido como bilirrubina que se elimina por las heces (pigmento biliar). El hierro que se acumula en forma de hemosiderina es progresivamente transferido al plasma (transferrina y ferritina) y a través de éste llega a la médula ósea y se reutiliza para la síntesis de nuevas moléculas de hemoglobina. Debido a la poca absorción de hierro por vía digestiva, este proceso de reutilización es fundamental para mantener normal la concentración de hemoglobina del organismo.

La bilirrubina plasmática se une a la Albúmina y llega al hígado donde se une al ácido glucorónico, transformándose en bilirrubina conjugada (o directa) que como tal, se elimina por vía digestiva. Cuando en condiciones patológicas aumenta la destrucción eritrocitaria (hemólisis), aumenta paralelamente la concentración de bilirrubina plasmática, lo que provoca ictericia cuando se deposita en los tejidos cutáneos y las mucosas. La bilirrubina procedente del

hemólisis debido a que no ha sido aún metabolizada por el hígado, se halla en mayor medida en su forma libre o no conjugada (bilirrubina indirecta). Una hiperbilirrubinemia de predominio indirecto es por tanto muy probablemente de origen hemolítico. Por el contrario, cuando predomina la bilirrubina directa o conjugada, es que ésta ha pasado por el hígado y por tanto, obedece a una enfermedad hepática. Existe un trastorno congénito relativamente frecuente (enfermedad de Gilbert) en el que el hígado tiene disminuida su capacidad para conjugar bilirrubina. Debido a ello en esta enfermedad suelen observarse elevaciones variables o intermitentes de bilirrubina indirecta del plasma, lo que hace que se confunda a menudo con el síndrome hemolítico. Desde los canículos biliares la mayor parte de la bilirrubina conjugada, pasa, al conducto biliar común y de ahí al tracto intestinal, en donde la flora intestinal separa el ácido glucorónico, dejando libre la bilirrubina, la cual se reducirá según el tipo de flora presente. Uno de los productos de reducción es el Urobilinógeno, un compuesto incoloro que consta en su mayor parte de estercobilinógeno. Por lo tanto la bilirrubina es el pigmento fundamental hallado en las heces. Una pequeña cantidad de urobilinógeno se absorbe en el tracto intestinal y se excreta de nuevo por el hígado o pasa a la orina. Cuando las heces y la orina se exponen al aire se oxidan hasta el grupo de compuestos de Urobilina.

## **HEMOGLOBINOMETRÍA**

La capacidad de combinación del oxígeno de la sangre es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina más que al número de hematíes. Por lo tanto la hemoglobinometría, una de las determinaciones de laboratorio más frecuentes, es importante como prueba para descartar las enfermedades asociadas con anemia y para seguir la respuesta de estas enfermedades al tratamiento.

La concentración normal de hemoglobina expresada en gramos/100 ml de sangre varía ampliamente según el estándar de Hemoglobina utilizado, la edad, sexo del paciente y la altitud del lugar.

Muchos son los métodos para determinar la concentración de la Hemoglobina, los más comúnmente utilizados se basan en uno de los cuatro procedimientos siguientes: medida de la capacidad de combinación de la sangre con el oxígeno (método gasométrico); medida del contenido en hierro en la sangre (método químico), medida colorimétrica de la densidad de la sangre total en soluciones de sulfato de cobre de densidad conocida y la determinación posterior de la hemoglobina y medida colorimétrica de un derivado coloreado de la hemoglobina por ejemplo la oxihemoglobina, la hematina ácida, la hematina alcalina y la cianmetahemoglobina y comparación de la muestra desconocida con una estándar, mediante un método espectrofotométrico.



## **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA EN SANGRE**

La determinación de la concentración de la hemoglobina en la sangre es fundamental para el diagnóstico de una anemia. Esta trascendencia clínica requiere el empleo de una metodología muy fiable y basada en las propiedades físico químicas de la hemoglobina.

Por ello, desde 1967, el ICSH recomienda emplear el método colorimétrico de la cianmetahemoglobina basado en el cálculo de la absorbancia lumínica de una solución de Hemoglobina previa transformación de alguno de sus derivados coloreados. Este método recientemente adoptado también de manera oficial por el Comité Nacional de patrones de laboratorio clínico (NCCLS) se caracteriza por una elevada fiabilidad y es reconocido por la OMS.

### **MÉTODO DE LA CIANMETAHEMOGLOBINA (ICSH-OMS)**

**Principio:** 1.- La Hemoglobina de la sangre se une al ferricianuro de potasio y se forma la metahemoglobina. 2.-La metahemoglobina se une al cianuro de potasio y se forma la cianmetahemoglobina, Se utilizan los siguientes reactivos:

#### 1) Solución de Drabkin

Bicarbonato de sodio  
Cianuro de potasio  
Ferricianuro de potasio  
Agua destilada

Esta solución debe ser límpida y colocada en frasco de vidrio oscuro resguardada de la luz. No debe conservarse más de un mes.

#### 2) patrón o Estándar de cianmetahemoglobina.

## **Materiales**

- 1) Fotocolorímetro o Espectrofotómetro
- 2) Tubos de 12 x 100mm
- 3) Sangre venosa total, mantenida incoagulable con EDLA- K3 o con heparina. Puede emplearse también sangre capilar.
- 4) Pipetas volumétricas calibradas de cristal de 5ml.
- 5) Pipetas automáticas de 0,02 ml (20 ul) o pipeta de sahli.



## **MÉTODO O TÉCNICA**

- 1) Conectar el espectrofotómetro según las especificaciones de la casa comercial.
- 2) Homogenizar bien la sangre mediante agitación suave durante un tiempo mínimo de 5 minutos o por inversión del tubo 20 veces.
- 3) Pipetear 5ml de solución de Drabkin en un tubo.

- 4) Mediante micropipeta añadir 0,02 ml de sangre o 20 ul de sangre homogenizada en el tubo con solución de Drabkin. Al realizar esta operación, es fundamental eliminar el exceso de sangre que puede quedar en las paredes externas del capilar antes de introducirlo en el reactivo y procurar así mismo que no quede sangre adherida a las paredes internas de la pipeta.
- 5) Agitar el tubo mediante inversión (4o5 veces) con el fin de homogenizar bien la mezcla sangre-reactivo y esperar mínimo 5 minutos para que se produzca la hemólisis total y se completa la transformación de toda la hemoglobina en cianmetahemoglobina.
- 6) Leer la absorbancia de la solución a 540mm o 546mm con blanco de reactivo.
- 7) Para calcular la concentración de hemoglobina es recomendable disponer de una gráfica o curva de calibración o aplicando la siguiente formula:

$$\text{Hemoglobina g/dl} = \frac{A (\text{muestra}) \times \text{Concentración de Standard}}{A (\text{Standard})}$$

A: absorbancia o densidad óptica

- 8) Cuando utilizamos factor:

$$\text{Hemoglobina g/dl} = A (\text{muestra}) \times \text{Factor (36.7)}$$



## CAUSAS DE ERROR EN LA DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA

### Errores en la obtención de la muestra de sangre

- Errores de extracción
- Empleo de anticoagulantes no recomendados
- Coagulación parcial de la sangre

### Errores de la dilución

- Empleo de pipetas volumétricas mal calibradas, sucias o húmedas
- No eliminación del exceso de sangre adherida a las paredes externas del capilarantes de introducirlo al reactivo
- Dilución incompleta de la sangre en el reactivo

### Errores de la transformación de la hemoglobina en cianmetahemoglobina

- Empleo de reactivo de Drabkin mal preparado o caducado

Lectura antes del tiempo necesario para la completa transformación de hemoglobina en cianmetahemoglobina

#### **Errores de la determinación**

Empleo de instrumentos no calibrados  
Cubetas sucias, deterioradas o no ajustadas  
Soluciones turbias de cianmetahemoglobina

#### **Errores de la conservación del reactivo**

Congelación del reactivo  
Conservación del reactivo en botellas de polietileno.

#### **VALORES DE REFERENCIA**

Los valores de la concentración de hemoglobina en sangre varían ampliamente con la edad y el sexo.

Así son especialmente elevados en recién nacidos a término 17-19 g/dl y bajos durante el embarazo 10-11 g/dl Adulto hombre son de 14,5 +- 2 g/dl y en las mujeres 13,5 +- 2 g/dl. Cuando se consideran los valores de referencia de la concentración de hemoglobina en sangre hay que tener presente el grupo étnico o la población a la que vienen referidos (población de referencia), pues los valores pueden estar muy influidos por los hábitos alimentarios y el estado de nutrición.