

7
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

COMPARACION DE 3 METODOS DE LABORATORIO Y ANALISIS DEL ARBOL GENEALOGICO PARA LA DETECCION DE VARONES DEFICIENTES Y MUJERES HETEROCIGOTAS DE LA DEFICIENCIA DE GLUCOSA - 6 - FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PD)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O
P R E S E N T A ;**

MONICA HERNANDEZ SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

BIOLOGA MA. EUGENIA VEGA HERNANDEZ

**REALIZADA EN: DEPARTAMENTO DE GENETICA DEL
HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO "LA RAZA",
I. M. S. S.**

MEXICO, D. F.,

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E .

	Pág.
I INTRODUCCION	4
II METABOLISMO DEL ERITROCITO.	6
III CLASIFICACION DE ANEMIAS	17
IV BIOQUIMICA DE LOS ERITROCITOS DEFICIENTES DE G6PD	21
V GENETICA DE LA DEFICIENCIA DE G6PD	29
VI MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA DEFICIENCIA DE G6PD	36
VII METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA DEFICIENCIA DE G6PD	40
VIII OBJETIVOS	44
IX MATERIAL Y METODOS	45
X RESULTADOS	54
XI DISCUSION	73
XII CONCLUSIONES	78
XIII REFERENCIAS	79

RESUMEN.

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enfermedad hereditaria recesiva ligada al cromosoma X, por lo que los varones portadores del gen anormal, están afectados clínicamente y las mujeres heterocigotas son sanas. Esta deficiencia puede provocar anemia hemolítica bajo condiciones de estrés, con la administración de fármacos oxidantes, en infecciones en el período neonatal y en ciertos individuos a la ingestión de habas (Vicia fava).

Por eso es conveniente contar con métodos sensibles para la identificación de varones deficientes para prevención en -- cuanto a la ingestión de drogas que puedan inducir hemólisis en este tipo de individuos que nunca han presentado anemia hemolítica y para mujeres portadoras con el fin de dar asesoría genética en relación al tipo de herencia.

En este trabajo se utilizaron 3 métodos de laboratorio: reducción de metahemoglobina de Brewer, actividad enzimática de G6PD en eritrocitos y la citoquímica de actividad de G6PD en -- eritrocitos ligada a MTT-tetrazolium, junto con el análisis del árbol genealógico, para seleccionar cual de estas detecta al -- 100% de varones afectados y al 100% de mujeres heterocigotas de G6PD.

El estudio se realizó en 6 familias de 6 varones deficientes de G6PD (propositus) que habían sido diagnosticados en el Departamento de Hematología Pediátrica del Hospital General, -- Centro Médico "La Raza", I.M.S.S., y que no tenían estudio familiar.

Con las 3 técnicas y el análisis del árbol genealógico se logró hacer la detección de:

- a) 10 varones deficientes (6 propositus y 4 más sin antecedentes de haber presentado anemia hemolítica).
- b) 7 portadoras obligadas.
- c) 3 portadoras posibles.
- d) 37 familiares femeninos y masculinos normales.

Concluyendo que el diagnóstico de los varones deficientes de G6PD es factible en el 100% con cualquiera de las 3 técnicas.

Para portadoras con la técnica de reducción de metahemoglobina de Brewer sólo se detectó el 30%, con actividad enzimática de G6PD en eritrocitos el 100% y con la técnica citoquímica de actividad de G6PD en eritrocitos ligados a MTT-tetrazolium el 90%, mostrando que no todas las portadoras pueden ser detectadas con un sólo método de laboratorio, sino que requieren de la combinación de métodos específicos como la de actividad enzimática y la ligada de MTT-tetrazolium para la determinación de la enzima de G6PD junto con el análisis del árbol genealógico.

El significado de los polimorfismos genéticos, clínicos y bioquímicos de las anemias hemolíticas o enfermedades potencialmente hemolíticas debidas a errores metabólicos del eritrocito se han incrementado cada vez con mayor frecuencia.

Estas enfermedades se caracterizan por anemia hemolítica congénita no esferocítica o por hemólisis inducida por drogas (Virgil, et., al., 1969). Dentro de este grupo la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) representa la enzimopatía más común del ciclo de las pentosas, y mejor caracterizadas en el humano, de la que hasta el presente se han identificado a más de 180 variantes (Beutler y Yoshida, 1973) y cuyo gen estructural está localizado en los brazos largos del cromosoma X (Xq,28) mostrando un patrón de transmisión hereditario recesivo ligado al cromosoma X, por lo que la expresión clínica de la enfermedad se presenta en los varones (hemocigotos) con transmisión del gen anormal a través de mujeres asintomáticas (heterocigotas o portadoras) y en muy raras ocasiones a través de mujeres homocigotas (Mckusik, 1986).

Para la identificación de los varones afectados, se cuenta con múltiples pruebas de diagnóstico específicas disponibles y de uso en laboratorios clínicos generales, las que incluyen, pruebas cualitativas simples de tamizaje, métodos semicuantitativos y los enzimáticos cuantitativos (Herz, et., al., 1970) permitiendo la detección del 100% de varones afectados, debido a que en ellos la actividad de la enzima (G6PD) no excede el 15% del valor medio normal (Yoshida, 1973). No así en el caso de las mujeres heterocigotas, ya que como se sabe, representan un

mosaico para el cromosoma X, por lo que su sangre contiene una mezcla de eritrocitos normales y deficientes de G6PD, lo que -- dificulta su estudio, debido a que dependiendo del porcentaje de eritrocitos deficientes, los valores de actividad enzimática pueden ser normales, intermedios o bajos (Beutler, et.al., 1962).

La naturaleza y severidad de las manifestaciones clínicas en los hemocigotos, están determinadas en gran parte por el tipo de variante enzimática, aunque en general la hemólisis es -- episódica, puede ocurrir bajo condiciones de estrés, con la administración de fármacos, infecciones en el período neonatal y en ciertos individuos con la ingestión de habas (Beutler, et. al, 1974).

La anemia hemolítica debida a deficiencia de G6PD puede ser severa y aún poner en peligro la vida, por lo que es importante el diagnóstico preciso de esta deficiencia, en pacientes pediátricos de sexo masculino para diferenciarlo de muchos padecimientos hematológicos y genéticos que se manifiestan con hemólisis, lo que permitirá un manejo adecuado del paciente y su familia.

II METABOLISMO DEL ERITROCITO.

A) ORIGEN, ESTRUCTURA Y FUNCION.

En la médula ósea del individuo adulto el hemocitoblasto constituye a la célula madre pluripotencial, o "stem cell" a partir de la cual derivan las diferentes líneas celulares que dan origen a la formación de eritrocitos, granulocitos y monocitos.

En la célula madre la serie eritropoyética unipotencial responde al estímulo de la eritropoyetina, diferenciándose a pronormoblasto, célula que mide entre 20 a 25 μ cuyo núcleo -- ocupa el 80% de su área y en su citoplasma se desarrollan organelos especializados tales como mitocondrias, y aparato de -- golgi, así como polirribosomas, esta célula se caracteriza por una gran actividad metabólica, la que se manifiesta en la síntesis de hemoglobina, protoporfirina, receptores de membrana, antígenos, sistemas enzimáticos, etc. El pronormoblasto entra en un proceso de maduración y amplificación a través de tres fases arbitrariamente definidas: a) el normoblasto basófilo -- que mide de 16 a 18 μ y caracterizado por la presencia de numerosos polirribosomas citoplasmáticos; b) el normoblasto poli cromatofílico I y II que mide entre 12 y 15 μ con abundante he meglobina y siderocina en su citoplasma, esta célula se caracteriza porque pierde sunucleolo, al mismo tiempo que su núcleo disminuye de tamaño y c) el normoblasto ortocromático que mide entre 10 y 12 μ en el que los polirribosomas se han dispersado en mono y dirribosomas, las mitocondrias disminuyen en número a medida que el núcleo continúa disminuyendo de tamaño y el vo

lúmen citoplasmático se incrementa a expensas de la hemoglobina transformándose en reticulocito, célula anucleada que pasa al torrente circulatorio donde realiza la última etapa de su diferenciación durante el cual sintetiza el 20% restante de la hemoglobina y por un proceso de autofagia elimina a los componentes innecesarios como son; mitocondrias, ribosomas y receptores de transferrina de manera que al transformarse en eritrocito maduro (hematíe o normocíto) solo conserva las vías metabólicas de la glucólisis anaeróbica, la vía de las pentosas fosfato y la gluconeogénesis (Murphy, 1960).

Todo este proceso de maduración y amplificación se realiza a través de cuatro divisiones por mitosis en un período de 72 horas, en el que a partir de un pronormoblasto se desarrollan 16 eritrocitos maduros.

Los eritrocitos maduros son discos bicóncavos con un diámetro promedio de 8μ , su concentración en la sangre periférica depende del : sexo, edad y la altura sobre el nivel del mar, pero en promedio en el hombre se encuentran $5,200,000 \pm 300,000/\text{mm}^3$ y en la mujer $4,700,000 \pm 300,000/\text{mm}^3$ (William, et.al., 1983).

La membrana citoplásmica del eritrocito desempeña dos funciones principales: a) mantiene a la hemoglobina aislada en un medio interno globular independiente del plasmático y b) -- permite el paso del hematíe a través de espacios inferiores a su diámetro (capilares hísticos). Su ultraestructura bioquímica esta constituida por una bicapa fosfolipídica casi continua en la cual se hayan incluidos los complejos de proteínas con una disposición de mosaico (De Robertis y De Robertis, 1980). En la parte más externa de la membrana se localizan --

los mucopolisacáridos integrantes los grupos sanguíneos y hacia la parte interna una proteína filamentososa con propiedades contráctiles, la espectrina (Wintrobe, et.al., 1974).

La permeabilidad de la membrana es muy selectiva para ciertos cationes debido a la bomba de Sodio-ATP-dependiente. El principal constituyente intracorporal es una proteína tetramérica; la hemoglobina, constituida por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas o dímeros de globina (grupo protéico) cada una de las cuales se une a un grupo heme (grupo prostético) formado a su vez por un átomo de hierro y una protoporfirina IX. Cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas se une a un grupo heme. El átomo de hierro ocupa la posición central en el plano del anillo de la porfirina y es exacovalente una de sus valencias que estabiliza la unión con el oxígeno cuando se encuentra en estado ferroso; la superficie externa de la hemoglobina esta recubierta por residuos hidrofílicos, a los que se deben en parte su elevada solubilidad en agua. Las zonas internas son ricas en aminoácidos hidrófobos, los que impiden la penetración de agua y por lo tanto evitan la oxidación del átomo de hierro (Lehninger, 1982).

La fisiología del eritrocito maduro es más simple que la de sus precursores nucleados permitiendo varias funciones; mantenimiento de la forma, estructura y función de la membrana, regulación del transporte de oxígeno y la producción de un potencial de reducción adecuado para que la hemoglobina se mantenga en estado funcional durante el tiempo en que el eritrocito se encuentra en la circulación.

Su carencia de mitocondrias, limita la fosforilación oxidativa a través del ciclo de Krebs o sistema citocromo.

En el eritrocito recién formado se encuentran muchas enzimas las que permiten alcanzar los 120 días que permanece en la circulación: la deficiencia inicial o la prematura degradación de algún componente de su dotación enzimática puede dar como resultados el acortamiento de su sobrevivencia (Wintrobe, et. al. 1974).

B) VIAS METABOLICAS.

La glucosa es la fuente de energía para el eritrocito. Después de su fosforilación hacia glucosa-6-fosfato (G6P) catalizada por la hexoquinasa, dos vías alternativas son posibles:

a) La glicólisis anaerobia o ciclo de Embden Meyerhof y b) La glicólisis aeróbica o ciclo de las pentosas fosfato (Brewer, 1969).

- a) Glicólisis anaeróbica o ciclo de Embden Meyerhof: es la vía principal en la que el 90% de la glucosa es consumida por el eritrocito, obteniéndose como producto neto a partir de una molécula de glucosa, dos moléculas de lactato y dos moléculas de Adenosín-trifosfato (ATP), este proceso se realiza a través de varios pasos intermediarios catalizados por sus enzimas correspondientes, las que se encuentran adheridas en la membrana del eritrocito y como cofactores (Mg), Nicotinadenin-dinucleótido (NAD) como aceptor de hidrógeno y Nicotín-adenin-dinucleótido reducido (NADH) como donador de hidrógeno. El aporte de ATP de la glicólisis anaeróbica es utilizada por el eritrocito para el transporte activo de iones para la fosforilación de las proteínas; el NADH también formado es el cofactor

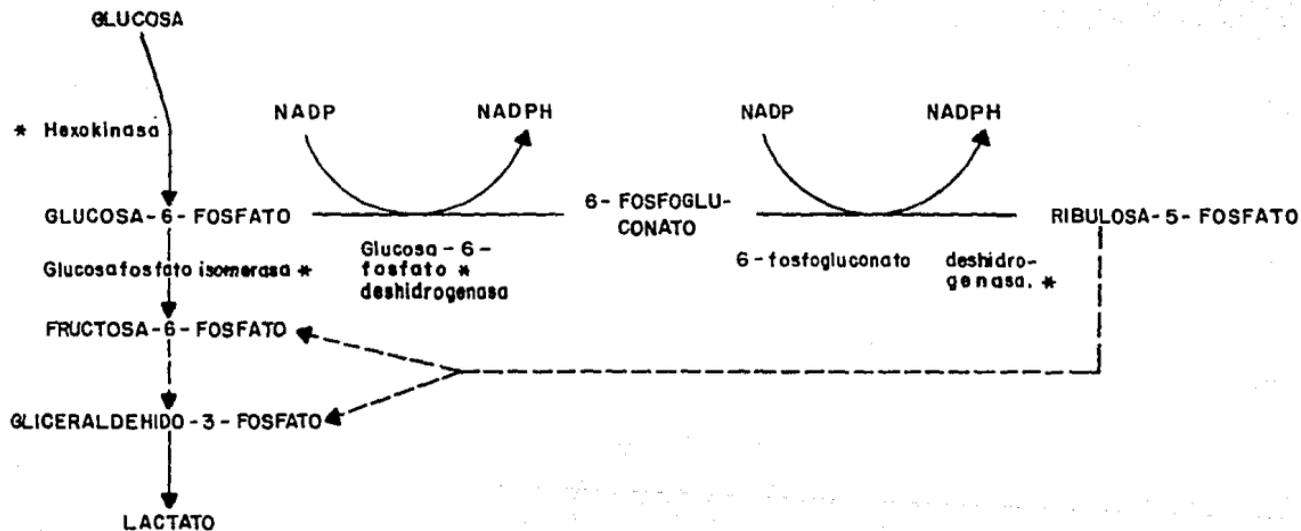
principal de la metahemoglobina-reductasa, enzima encargada de mantener el átomo de hierro de la hemoglobina en estado reducido; también se forma 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) importante modulador que va unido a la hemoglobina (Murphy, 1960).

b) Glicólisis aeróbica o ciclo de las pentosas fosfato:

Fig. 1, en el eritrocito maduro aproximadamente el 10% de la glucosa -6-fosfato (G6P) es metabolizada por esta vía. La G6P es oxidada a 6-fosfoglucoactona, la que se hidroliza espontáneamente a 6-fosfogluconato, reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y como factor el NADP reduciéndolo a NADPH, posteriormente el 6-fosfogluconato se transforma a ribulosa-5-fosfato con participación de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y como cofactor NADP, reduciéndolo a NADPH: las reacciones incluyen la insomerización de ribulosa-5-fosfato y Xilulosa-5-fosfato en una serie de arreglos intermoleculares catalizados por transcetolasas y transaldolasas, formándose finalmente, - - fructuosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, para formar glucosamida y NADP necesario en la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides (Kirkman, 1962).

En la glicólisis aeróbica, la G6PD es la enzima clave debido a que constituye el sistema generador del potencial reductor eritrocitario en el que participan varios mecanismos para mantener al glutatión en estado reducido (GSH).

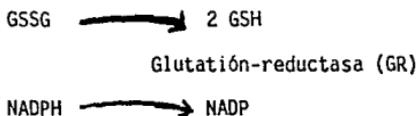
Fig. 1 GLICOLISIS AEROBICA EN ERITROCITOS



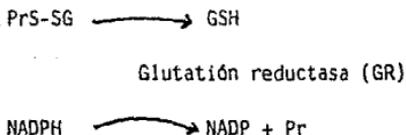
* DEFICIENCIAS ENZIMATICAS CONGENITAS

Cambios en los niveles de GSH, inducen anemia hemolítica, asociada a la deficiencia de G6PD, debido a esto es importante considerar con detalle el metabolismo del glutatión en los eritrocitos (Szeinberg y Marks, 1961).

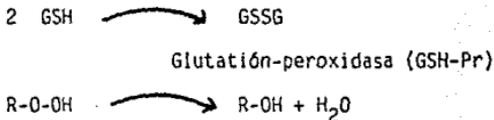
El glutatión es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina, en la unión de los dos primeros aminoácidos participa el grupo α -carboxilo del ácido glutámico. Dos funciones se le han asignado al glutatión en el eritrocito: la función relacionada con sus grupos sulfidrilos libres y la otra con la unión α -glutamil (Niv, et. al., 1966). a) los grupos sulfidrilo (SH) no proteínicos de los eritrocitos están en forma de GSH en un 99.8% y solamente como glutatión oxidado (GSSG) el 0.2%. El centro activo de GSH es el grupo -SH del residuo de cisteína y su función principal es la protección de los grupos -SH de las proteínas contra la oxidación, así como del grupo sulfidrilo expuesto en la cadena Beta de la hemoglobina en la posición B-93 contra agentes oxidantes: esto se realiza por acción directa de disulfuros mixtos (proteína-S-SG) o por la reducción de los -SH oxidados. En cualquiera de los dos eventos el GSH es convertido a GSSG, dímero que rápidamente por acción de la glutatión reductasa (GR) y utilizando como cofactor el NADH se convierte a GSH:



Probablemente esta sea la función más importante del NADPH en los eritrocitos, aunque también se ha descrito que participa en la reducción de disulfuros mixtos de glutatión y proteínas (Pr) particularmente de la hemoglobina:

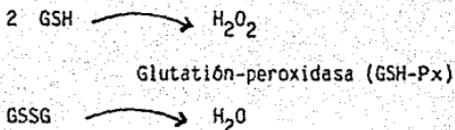


De la manera inversa el GSSG y los disulfuros de proteínas -S-SG son los principales oxidantes de NADPH en los eritrocitos importantes reguladores del ciclo de las pentosas fosfato. El --GSH de los eritrocitos es constantemente oxidado por la acción de la glutatión peroxidasa (GSH-Pr):



muchas drogas oxidantes son capaces de dañar el eritrocito al producir H_2O_2 libres y algunos otros peróxidos orgánicos como la peroxihemoglobina formada por la reacción de la hemoglobina con las drogas.

El GSH puede descomponer el H_2O_2 por acción de la glutatión peroxidasa:



Estudios *in vitro* han demostrado que la primaquina, fenilhidracina y el 3cido asc3rbico en los eritrocitos normales estimulan el ciclo de las pentosas fosfato, aumentando la conversi3n de GSH o GSSG, probablemente generando per3xidos (Hardisty y Weatherall, 1974).

La disponibilidad de GSSG como sustrato y con la acci3n de la glutati3n reductasa se forma NADP.

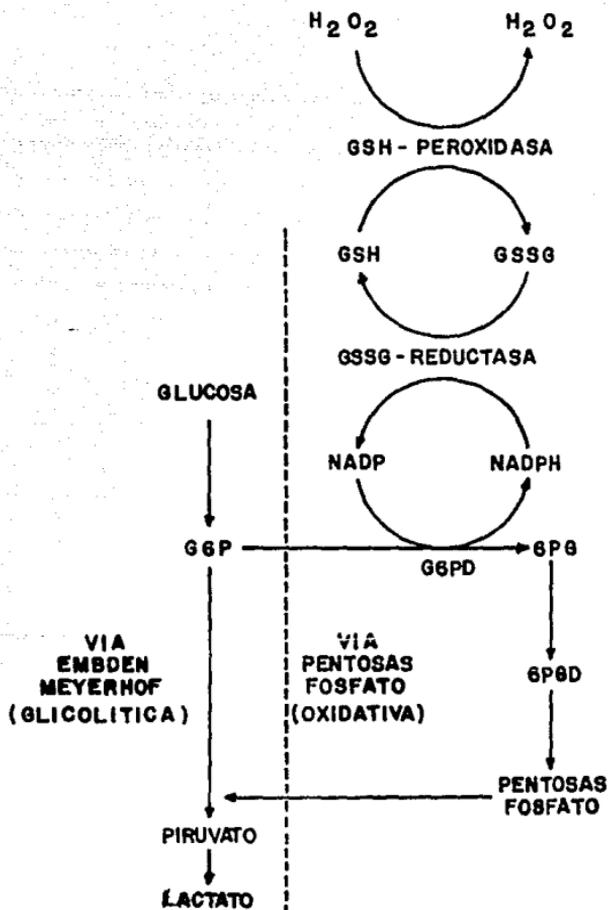
Al disminuir el NADP e incrementar el NADPH, la G6PD se estimula, por lo que aumenta la oxidaci3n de la glucosa-6-fosfato (G6P). En la oxidaci3n del NADPH en los eritrocitos tambi3n participa otra enzima, la NADP-diaforasa cuando se dispone de algunas sales reductoras como el azul de metileno; la oxidaci3n del NADPH reduce a estas sales, las que a su vez -- reducen la metahemoglobina a hemoglobina, proceso que se encuentra disminuido en las personas con deficiencia de G6PD -- (Cohen y Hochstein, 1961).

En la sangre venosa normal solamente el 1% de la hemoglobina se encuentra en forma de metahemoglobina la que es reducida por acci3n del ascorbato o del GSH y por acci3n enzim3tica de NADPH y NADPH-ligasa a metahemoglobina-reductasa, a este sistema se le ha llamado de la "diaforasa". Durante la reducci3n de la metahemoglobina por esta v3a, se acumula piruvato debido a que el NADP es la coenzima en las dos reacciones alternativas siguientes:



Todas estas vías de óxido-reducción en el eritrocito se resumen en la Fig. 2

Fig. 2. PARTICIPACION DE G6PD PARA MANTENER AL GLUTATION EN ESTADO REDUCIDO



III CLASIFICACION DE ANEMIAS.

Desde un punto de vista fisiopatológico, la anemia se define como: una reducción en la capacidad normal de la sangre para transportar oxígeno (William, et. al., 1983).

Las manifestaciones clínicas de la anemia hasta cierto punto están determinadas por la etiología específica, algunos signos y síntomas son comunes como: disminución en los niveles de hemoglobina, hematocrito y eritrocitos, aunque el mecanismo de su etiología puede ser único o múltiple siempre existe una patogenia preferente. La anemia aparecerá siempre que exista un desequilibrio entre las necesidades periféricas del eritrocito (destrucción y/o pérdidas al exterior) y su formación a nivel medular, la cual en definitiva depende de la función de la propia médula y del estímulo eritropoyético (Keitt, 1982).

En base a la masa eritrocitaria, las anemias se clasifican en:

- A) Anemias relativas: a este tipo no se les considera -- como transtorno hematológico, sino como un defecto en la regulación del volumen plasmático.
- B) Anemias absolutas: en este tipo el volumen eritrocitario se encuentra disminuido y se clasifican de acuerdo a criterios morfológicos y fisiopatológicos; en este trabajo se utilizará este último criterio, ya que se basa en aspectos bioquímicos y dinámicos en relación a su etiología.

La clasificación fisiopatológica divide a las anemias en:

I.- Anemias por disminución en la producción eritrocitaria medular.

I.1- Anemias por alteración en la proliferación y diferenciación de la "stem cell" (célula madre).

1.1A Alteración de la "stem cell" multipotencial (Anemia aplásica).

1.1B Alteración de la "stem Cell" unipotencial (eritroblastopenia selectiva, endocrinopatías e insuficiencia renal crónica).

I.2- Anemias por alteración en la proliferación y diferenciación de elementos medulares ya diferenciados en la serie eritroide.

1.2A Alteraciones en la multiplicación celular (síntesis adecuada de ADN, anemia megaloblástica -- por deficiencia de ácido fólico o B₁₂).

1.2B Alteraciones en la maduración citoplasmática -- (síntesis inadecuada del heme o de la globina como las hemoglobinopatías y talasemias).

II.- Anemias por disminución en la vida eritrocitaria.

II.1 Anemias por pérdida aguda de sangre.

II.2 Anemias por aumento en la destrucción periférica -- de eritrocitos: anemias hemolíticas.

II.2A Anemias por anomalías intrínsecas de eritrocito.

II.2Aa Por defectos de membrana del eritrocito (mi croesferocitosis hereditaria, eliptocitosis

hereditaria, acantocitosis, estematositosis, hemo-
globinuria paroxística nocturna).

II.2Ab Por defectos en los sistemas generadores de ener-
gía y de cuerpos reductores intraeritrocitario.

- Anemias hemolíticas por alteraciones enzimáti-
cas del ciclo de Embden Meyerhof.
- Anemias hemolíticas por alteraciones enzimáticas
del ciclo de las pentosas y del glutatión.
- Anemias hemolíticas por alteraciones enzimáti -
cas del metabolismo de nucleótidos, ver Fig.3

II.2Ac Por defectos estructurales en la molécula de hemo-
globina (anemia de células falciformes, hemoglobi-
nopatías inestables).

II.2B Anemias por anomalías extrínsecas del eritrocito
(infecciones, mecánicas, químicas, inmunológicas
o por secuestro recitulo endotelial) (Matthay and
Mentzer, 1981).

Fig. 3. DEFICIENCIAS ENZIMATICAS EN ERITROCITOS

DEFECTO	ABREVIACION COMUN	1 ^o REPORTE	HEMOLISIS	TIPO DE AUTOHEMOLISIS
VIA EDGEN MEYERHOF				
HEXOKINASA	HX	1967	+	I
GLUCOSA 6 FOSFATO ISOMERASA	GPI	1967	+	I
FOSFOFRUCTOKINASA	PFK	1969	+	-
TRISFOSFATO ISOMERASA	TPI	1968	+	I
2,3 DIFOSFOLICEROMUTASA	2,3 DPase	1959	+	I
FOSFOLICERATO KINASA	PK	1969	+	II
PERUVATO - KINASA	PK	1961	+	USUALMENTE II
VIA DE LA PENTOSA				
GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA	G6PD	1958	±	NORMAL o I
6 - FOSFOLUCONATO DESHIDROGENASA	G6PD	1964	±	-
GLUTATION REDUCTASA	GR	1962	+	II
GLUTATION SINTETASA	GSH	1961	+	
GLUTATION PEROXIDASA	GSH-Px	1967	+	
MISCELANEO				
NADH-LIGADO A METAHEMOGLOBINA REDUCTASA	DIAFORASA or MR	1948	-	NORMAL
NADPH-LIGADO A METAHEMOGLOBINA REDUCTASA	-	1967	-	-
CATALASA	-	1947	-	
ADENOSIN TRIFOSFATASA	ATPase	1964	±	I

IV BIOQUIMICA DE LA DEFICIENCIA DE G6PD.

La importancia de G6PD en el metabolismo normal de los eritrocitos fue resultado de las investigaciones acerca del efecto hemolítico de un fármaco antipalúdico, la primaquina, llevadas a cabo a principios de los años cincuenta (Beutler, 1959). Por primera vez se reportó anemia hemolítica, como resultado de la administración de 8-aminoquinoleína otro antipalúdico, en ciertos individuos susceptibles en Panamá. Durante la guerra de Corea, con el desarrollo de un antipalúdico más efectivo la 8-aminoquinoleína-primaquina, fué posible estudiar la reacción hemolítica bajo condiciones más controladas marcando a los eritrocitos como cromo radioactivo (^{51}Cr) demostrando que la sensibilidad al efecto hemolítico del fármaco se debía a una anomalía intrínseca del eritrocito (Dern, et.al., 1954). Al mismo tiempo se observó que la anemia hemolítica inducida por la primaquina era autolimitada: después de un episodio hemolítico inicial a nivel de hemoglobina volvía a la normalidad a pesar de seguir administrando la misma dosis del medicamento (Sears, et.al., 1969). Beutler y colaboradores marcando hematíes con hierro radioactivo (^{59}Fe) demostraron que la sensibilidad hemolítica -- del fármaco estaba en función a la edad del eritrocito, este hallazgo orientó la atención hacia el metabolismo de esta célula, ya que se sabía que la actividad de ciertas enzimas y procesos metabólicos declinaban a medida que los eritrocitos envejecían (Beutler, et.al. 1954).

También se encontró que el nivel de glutatión reducido - (GSH) en los eritrocitos sensibles a la primaquina estaba disminuido y que eran incapaces de proteger al GSH existente contra el estrés oxidativo (Cohen y Hochstein, 1964).

Carson y colaboradores estudiando las vías de reducción de GSH en eritrocitos sensibles a la primaquina demostraron que --- eran deficientes de una enzima de la vía metabólica del ciclo -- de las pentosas, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (Carson, et.al., 1956).

Posteriormente se observó que la deficiencia de G6PD era muy heterogénea, Marks y colaboradores, encontraron que los epí sodios hemolíticos eran más severos entre pacientes de la cuenca mediterránea, que entre los negros americanos y que esto era resultado de deficiencias significativas en las propiedades bio químicas de la enzima (Marks y Gross, 1959). Además se encontró que algunos individuos con anemia hemolítica congénita no esférica, también eran deficientes de G6PD (Kirkman, et.al. 1960).

El gen estructural que codifica para G6PD está localizado en el cromosoma X, con una secuencia de 1650 nucleótidos (Pérrico, et.al., 1981). La heterogeneidad genética de G6PD en humanos es muy extensa: en la actualidad se han reportado más de -- 180 variantes debidas a mutaciones en diferentes loci, los que afectan la estructura molecular de la enzima y con manifestaciones clínicas variables (Kirkman y Hendrickson, 1963).

La G6PD ha sido purificada y caracterizada de diferentes orígenes, la G6PD de mamíferos está formada por un homodímero o un homotetrámero, con subunidades o monómeros constituidos -- por una cadena de 450 aminoácidos, con un peso molecular de 58,000 daltons. Se ha reportado que un residuo de histidina es la que participa en la actividad catalítica de la enzima (Yoshida, 1968). La forma funcional predominante es dimérica asociada a NADP o NADPH, con 18 grupos sulfidrilo, de los que algunos se encuentran en forma expuesta y participan en la acti-

vidad de G6PD (Yoshida, 1973b).

Las variantes de G6PD se han establecido en base a:

- a) la actividad de la enzima en los eritrocitos.
 - b) movilidad electroforética.
 - c) constante de Michaelis para sus sustratos G6P y NADP
 - d) estabilidad al calor.
 - e) pH óptimo.
 - f) movilidad cromatográfica.
 - g) sensibilidad a ácidos en cultivo de tejidos.
- (De Mars, 1968).

La deficiencia en la actividad de G6PD puede ocurrir por alguna de las siguientes causas:

- a) producción disminuida en moléculas de la enzima.
- b) formación de moléculas con actividad catalítica disminuida.
- c) producción de moléculas con estabilidad reducida.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto la estandarización en la nomenclatura y en los estudios de laboratorio de la enzima, asignando el símbolo G6PD para la enzima completa y Gd para su genotipo, la enzima normal se designa Gd^B o Gd^{B+} el signo (+) indica actividad enzimática normal - (65 a 150%) esta es la enzima más común encontrada en todos - los grupos de población estudiados.

Otra variante normal común es la Gd^{A+} con alta prevalencia en negros. La variante Gd^{A-} es la forma anormal más frecuentemente encontrada en negros, el signo (-) indica actividad enzimática disminuida en menos del 25% (Porter, et.al.1964).

El resto de las variantes se designan por el área geográ-

fica o por nombres tribiales, por ejemplo: entre los caucásicos la variante Gd mediterranea es la más común; entre los chinos la Gd Cantón, otras variantes comunes son la Gd markham en Nueva Guinea, Gd unión en Filipinas, la Gd Campelbur en Pakistan, la Gd Debrouse en Arabia, etc. En México se han -- descrito cuatro nuevas variantes, la Gd México con movilidad electroforética anormal y ausencia de hemólisis (Vaca, et. al, 1981), la Gd Guadalajara (Vaca, 1982), la Gd Jalisco y Gd Morelia con Km aumentada (Vaca, 1985).

La deficiencia de G6PD se ha reportado en el 13% de los negros americanos, el 8.3% en los negros brasileños y el 3% en los hombres de Bantú. Probablemente el 20% de las mujeres negras americanas sean heterocigotas. En Sardinia se encontró una incidencia de 14.5% en contraste con una frecuencia baja de 0.5% en la Península Italiana. En el norte de Europa la frecuencia de G6PD es muy elevada, siendo entre los judíos curdos el 50%, manifestándose también en los sefaraditas y en los orientales (Wintrobe, et.al., 1974).

La deficiencia de G6PD también se ha observado en árabes, chinos y tailandeses. En México se ha reportado principalmente en las zonas costeras del sureste hacia donde los negros han emigrado (Lisker, 1976).

Algunas de las principales variantes su origen, propiedades y frecuencia se muestran en la Fig. 4.

Algunas variantes están asociadas con anemia hemolítica no esferocítica, otras requieren de algunos compuestos químicos oxidantes o de infecciones por virus o bacterias que desencadenen episodios hemolíticos agudos, otras más presentan niveles bajos de actividad enzimática sin manifestaciones --

Fig. 4. ALGUNAS VARIANTES DE GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA

GRUPO	ORIGEN	VARIANTE	ACTIVIDAD	ELECTROFORESIS	PROPIEDADES	FRECUENCIA	
			ENZIMATICA (% NORMAL)	MOBILIDAD (% NORMAL)			
NORMAL	DIVERSO	B	100	100	NORMAL	USUAL	
DEFICIENCIA SEVERA EN CNHA *	EUROPEOS DEL OESTE	OKLAHOMA	4-10	100	ANORMAL	RARA	
DEFICIENCIA SEVERA	EUROPEOS DEL OESTE	GHICAGO	9-26	100	ANORMAL	RARA	
DEFICIENCIA SEVERA	MEDITERRANEOS	MEDITERRANEA	0-7	100	ANORMAL	COMUN	
DEFICIENCIA MODERADA	NEGROS	A ⁺	8-20	RAPIDA 110	NORMAL	COMUN	
	GALES	}	SEATTLE	8-21	LENTA	ANORMAL	RARA
	ESCOCESES			90			
	GRIEGOS						
	CHINOS	CANTON	4-24	RAPIDA 105	ANORMAL	COMUN	
DEFICIENCIA MEDIA	SEFARADITAS	TEL HASHOMER	25-40	LENTA 60-70	ANORMAL	RARA	
MEDIA O SIN DEFICIENCIA	NEGROS	A	80-100	RAPIDA 110	NORMAL	MUY COMUN	
AUMENTADA	BLANCOS U.S.	HEKTOEN	300-400	RAPIDA	NORMAL	RARA	

* ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA NO ESFEROCITICA

clínicas, por ejemplo: en la deficiencia de G6PDA⁻, la producción de la enzima en las células parece ser normal sin embargo, con estudios electroforéticos de la enzima purificada, estudios de fluorescencia utilizando NADPH e investigaciones inmunológicas, se ha establecido que el número de moléculas formadas en la enzima es tan disminuídas y que estas son más sensibles a la oxidación que las normales. En ausencia de estrés, la sobrevida de los eritrocitos en esta variante es normal o cerca de lo normal, aunque los eritrocitos viejos contengan niveles bajos de la enzima.

En la variante mediterránea el defecto enzimático se debe a una cantidad disminuída con actividad catalítica también disminuída en los eritrocitos. En esta variante se ha descrito disminución en la Km para NADP y G6P con una sobrevida de los eritrocitos casi normal, en esta variante la hemólisis es muy severa.

Algunas variantes por ejemplo la Manchester es anormalmente sensible a los efectos inhibidores de NADPH, algunas otras como la Oklahoma muestra acentuada disminución en la afinidad para los sustratos G6P y NADP. Pueden ocurrir varias combinaciones de estas propiedades, por lo que ya se han descrito más de 180 variantes (Beutler y Yoshida, 1973).

Con el desarrollo de nuevos métodos de purificación de G6PD ha sido posible la caracterización de algunas variantes, por ejemplo: comparando la huella de las variantes normales Gd^B y Gd^{A-} se ha encontrado solamente la sustitución del aminoácido asparagina por ácido aspártico (Yoshida, 1967) y en la variante Hektoen, la sustitución del aminoácido es histidina por tirosina (Yoshida, 1970).

La incubación de los eritrocitos deficientes de G6PD con -- primaquina, fenilhidracina, acetilfenilhidracina, nitrofurantoina

ácido ascórbico, alfa y beta naftoquinona, producen pérdida de GSH e incrementa el GSSG, debido a que estos agentes oxidan al GSH en presencia de oxihemoglobina formando radicales libres o peróxido de hidrógeno. Cuando se administra primaquina, habas o sulfamidas a individuos deficientes de G6PD A⁻ solamente -- los eritrocitos viejos y los más severos deficientes de la enzima son destruidos y el nivel de GSH disminuye rápidamente, -- posteriormente la hemólisis es acompañada de la recuperación de los niveles normales de GSH cuando las células destruidas son eliminadas de la circulación.

Los eritrocitos normales reducen GSSG por medio del -- NADPH con participación de la enzima glutatión reductasa, -- mientras que los eritrocitos deficientes de G6PD carecen de -- esta capacidad.

La reducción de metahemoglobina en presencia de azul de metileno como un proceso ligado a NADPH esta disminuido en -- los eritrocitos deficientes de G6PD. En ausencia de estas sales, el rango de reducción de metahemoglobina es normal. Los eritrocitos deficientes en la variante A⁻ son capaces de oxidar la glucosa en un rango normal, cuando el nivel de oxidación de NADPH se incrementa por adición de azul de metileno -- o por oxidación de NADPH, los eritrocitos son incapaces de incrementar la producción de glucosa y CO₂.

Se han postulado diversos mecanismos de destrucción de -- los eritrocitos deficientes de G6PD, por ejemplo: la hemólisis inducida por primaquina se inicia con la formación de -- cuerpos de Heinz, que son hemicromos derivados de la desnaturalización de la hemoglobina, verdoglobina y coleoglobina, en este mecanismo la desnaturalización oxidativa de la hemoglobin

na es consecuencia de la oxidación de la Cisteína B-93, con el subsecuente desdoblamiento de la molécula de hemoglobina y la oxidación de los grupos sulfidrilo (Stanbury, et.al., 1972).

Los mecanismos de hemólisis después de la ingestión de habas, se ha postulado una interferencia en la glicólisis con disminución de la enzima directamente por la droga, un segundo defecto genético adicional y otro más relacionado con el contenido de L-dopa de las habas (Beutler, 1970).

En el caso de infecciones el mecanismo de hemólisis, es desconocido, se ha propuesto que la generación de peróxidos de hidrógeno en leucocitos que han fagocitado bacterias sean la causa de daño en los eritrocitos deficientes de G6PD.

La causa de ictericia y anemia neonatal en deficientes de G6PD es desconocida. Las actividades de algunas enzimas como NADH diaforasa, catalasa y glutatiión peroxidasa se encuentran -- disminuidas en los eritrocitos del recién nacido, estas enzimas protectoras probablemente trastornen a los eritrocitos más vulnerables a la influencia destructiva del peróxido de hidrógeno el cual se genera espontáneamente in vivo (Ross, 1963).

V GENETICA DE LA DEFICIENCIA DE G6PD.

En 1956 Tjio y Levan, con el desarrollo de técnicas adecuadas para el estudio de los cromosomas, comprobaron que el número de estos en la especie humana es de 46, a partir de este momento la genética se ha desarrollado con gran rapidez (Tjio y Levan, 1956).

Los cromosomas de las células humanas forman 23 pares, -- cada progenitor proporciona a su descendencia 23 cromosomas, o sea un miembro de cada par. La célula formada de la fertilización del óvulo por el espermatozoide (cigoto) posee 23 pares -- de cromosomas al que se denomina número diploide ($2n=46$) (de diplos=doble), en contraposición cada célula sexual sea óvulo o espermatozoide (gametos) los cuales como resultado de la -- meiosis presentan una cifra cromosómica haploide ($n=23$) (de haplos=sencillo).

Los miembros de cada par de cromosomas homólogos coinciden en cuanto a la información genética que cada uno contiene; es decir, presentan la misma secuencia de locus (lugar que ocupa cada gen en un cromosoma) y cada locus puede portar el mismo o diferente alelo (forma alternativa de un gen localizado -- en el mismo locus de cromosomas homólogos).

Cuando ambos miembros de un par de alelos o genes son -- idénticos se les denomina "homocigotos" y si son diferentes -- "heterocigotos" (Thompson y Thompson 1975).

Se denomina alelo dominante cuando este se expresa en el fenotipo (manifestación de un rasgo físico, bioquímico o fisiológico en el individuo) en dosis simple o sea un heterocigoto y es recesivo cuando un alelo se manifiesta en el fenotipo so-

lamente en condición "homocigota".

De acuerdo con el tipo de genes que porten los cromosomas, se han dividido en autosomas (22 pares) y cromosomas sexuales o gonosomas (XX en la mujer y XY en el hombre) por lo tanto el complemento cromosómico normal en la mujer es 46XX y en el hombre 46XY, de aquí que existan dos tipos de herencia: la ligada a los cromosomas sexuales (ligadas al X) y la ligada a los autosomas (autosómica) (Hamerton, 1971).

Los patrones seguidos por los caracteres genéticos heredados dentro de las familias dependen de si el carácter es dominante o recesivo, si el gen es autosómico o ligado al sexo. De acuerdo con estos criterios los tipos de herencia en los que intervienen un solo par de genes puede ser:

- a) autosómica dominante.
- b) autosómica recesiva.
- c) Ligada al cromosoma X dominante.
- d) Ligada al cromosoma X recesivo.

Debido a que el gen estructural que codifica para la molécula de G6PD está localizado en los brazos largos del cromosoma X (Xq,28) Fig. 5, con patrón de transmisión hereditaria recesiva ligada a este cromosoma, solamente se tratarán los criterios relacionados a este tipo de herencia.

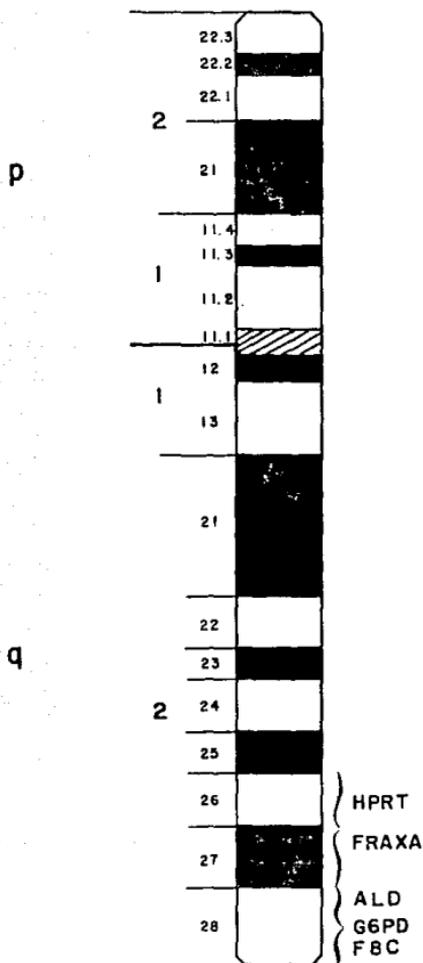
Las enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X se caracterizan porque:

- a) Los varones portadores de este gen están afectados clínicamente y las mujeres heterocigotas son sanas.
- b) No hay transmisión de la enfermedad directamente de varón a varón.

Fig. 5. MAPA-CROMOSOMA X

Incluye 120 Loci

31



HPRT HIPOXANTINA FOSFORIBISILTRANSFERASA
 FRAXA SITIO FRAGIL Xq 27.3
 ALD ADRENOLEUCODISTROFIA
 G6PD GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA
 F8C FACTOR VIII COAGULACION

c) En promedio, el 50% de los hijos varones de mujeres portadoras (heterocigotas) están afectadas, y el 50% de las hijas serán portadoras. Fig. 6.

La razón por la que los varones manifiestan la enfermedad a pesar de que tengan un solo gen anormal, es que por estar situado en el cromosoma X, se encuentra en estado hemicigoto y no tiene su alelo homólogo que lo equilibre fenómeno conocido como hemicigocidad.

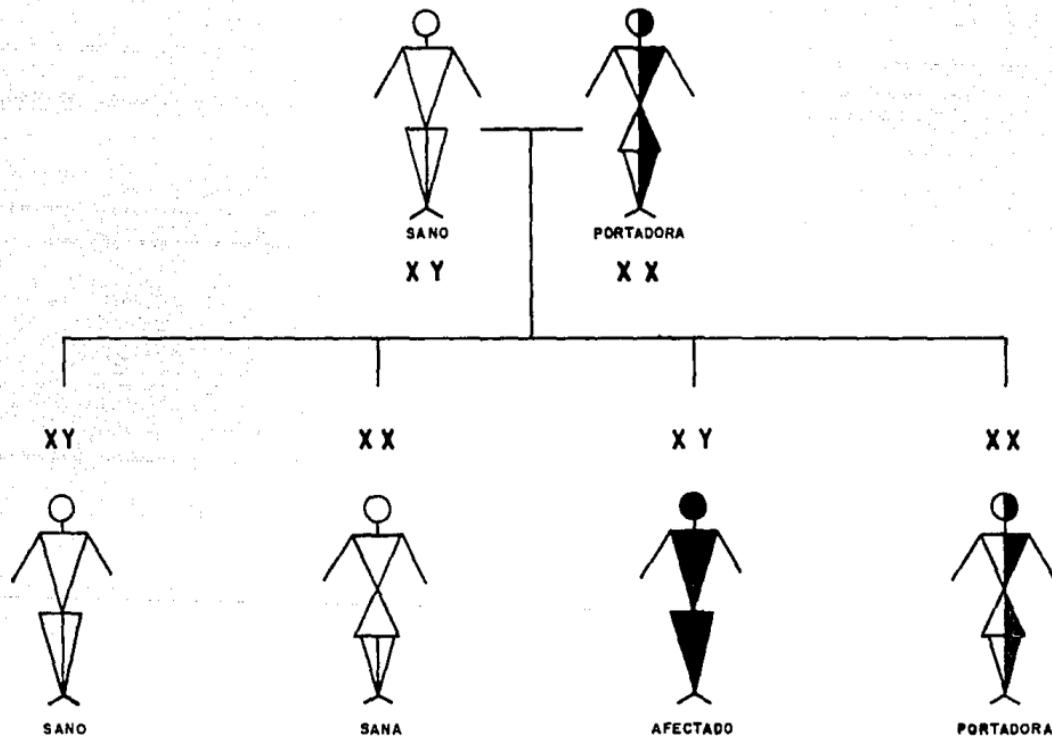
Las mujeres pueden padecer este tipo de enfermedad solamente cuando sean homocigotas para el gen recesivo anormal, lo más frecuente es que sean portadoras del gen en condición heterocigota, o sea que del par de alelos, solo uno sea normal.

Durante mucho tiempo la acción de los genes ligados al -- sexo representó una incógnita para los genetistas, de como era posible que las hembras, con 2 representantes de cada gen del - cromosoma X, formaran igual cantidad del producto de estos genes (enzima), que los varones hemicigotos con un solo cromosoma X, y porque las hembras homocigotas para un gen mutante ligado al cromosoma X no estaban más gravemente afectadas que los varones hemicigotos. Parecía existir cierto mecanismo de compensación de dosis, basadas en las observaciones de Ohno y Haschuka (Ohno, 1967).

Grupos de investigadores, llegaron independientemente a una hipótesis que explicaba la compensación de dosis a base de un único cromosoma X activo, ahora conocida como "hipótesis de Lyon", la que establece que:

- a) en las células somáticas de las hembras de mamíferos sólo un cromosoma X es activo. El segundo cromosoma

Fig. 6 HERENCIA RECESIVA LIGADA A X



X es heteropcnótico y permanece condensado, observándose en las células en interfase como cromatina sexual.

- b) La condensación se origina al comienzo de la vida embrionaria (décimo sexto día de gestación).
- c) el cromosoma condensado puede ser indistintamente un X paterno o materno, en células diferentes de un mismo individuo; en algunos casos más de los cromosomas X, de derivación materna pueden inactivarse y en - - otros casos de origen paterno.

La hipótesis de Lyon se traduce en tres consecuencias genéticas principales:

- A) Compensación de dosis: el volúmen del producto de genes ligados al cromosoma X, como la G6PD es equivalente en ambos sexos, la condensación al azar del -- cromosoma X, explica satisfactoriamente el fenómeno.
- B) Variabilidad de expresión de heterocigotas: dado que la condensación es al azar, las hembras heterocigotas para genes ligados al cromosoma X, deberían presentar proporciones variables de las células con actividad de un alelo particular, es decir, entre estas mujeres debería haber una considerable variabilidad fenotípica.
Nance demostró este fenómeno en hembras humanas en relación a la deficiencia de G6PD en 30 mujeres heterocigotas en las que demostró una amplia variación en la actividad enzimática (Nance, 1964).
- C) Mosaicismo: Las mujeres heterocigotas para genes ligados al cromosoma X, poseen efectivamente 2 pobla--

ciones de células; una con el X activo y la otra con el X inactivo. Davison y col., en estudios realizados en cultivo de fibroblastos de mujeres heterocigotas para dos alelos distintos de G6PD demostraron mosaicismos en el que consistió en dos poblaciones clonales distintos, las que variaban en relación al alelo de G6PD funcionante (Thompson, 1965).

Los procesos de inactivación del cromosoma X son ampliamente aplicables al locus de G6PD en eritrocitos humanos de heterocigotas, encontrándose una amplia variación en la actividad enzimática de las heterocigotas, dependiendo de la proporción de precursores de la serie eritroide en las que el cromosoma X normal o portador de la mutación es inactivo, por lo tanto los niveles enzimáticos en las heterocigotas pueden ser normales, intermedios o bajos.

En el primer caso, la proporción de cromosomas X normales o portadores de la deficiencia debe ser cercano al 20%, en las heterocigotas con niveles intermedios o bajos, una proporción mayor de cromosomas X normales se habrán inactivado en la serie eritroide. Este fenómeno ha sido confirmado con diferentes técnicas de laboratorio, como la técnica de reducción de metahemoglobina, elución de metahemoglobina, microespectrofotometría, con la técnica citoquímica de MTT-tetrazolium que miden actividad enzimática de G6PD en eritrocitos individuales (Piomelli et.al., 1972).

VI MANIFESTACIONES CLINICAS.

La Única manifestación clínica de la deficiencia de G6PD es la anemia hemolítica. Generalmente la anemia hemolítica es epidémica, pero en algunas de las variantes poco frecuentes - de G6PD pueden causar anemia hemolítica congénita no esferocítica. En condiciones normales los individuos no presentan anemia, aunque en ellos puede demostrarse acortamiento de la vida media de los eritrocitos compensada por la hiperregeneración medular.

En general, la hemólisis está asociada con el estrés muy particularmente con la administración de fármacos, las infecciones, en el período neonatal y en ciertos individuos a la exposición a las habas (Beutler, 1966).

ANEMIA HEMOLITICA INDUCIDA POR FARMACOS.

En relación a fármacos y productos químicos que tienen capacidad de desencadenar reacciones hemolíticas en individuos deficientes de G6PD se muestran en la siguiente tabla:

Analgésicos:

- Acetanilida +
- Acido acetilsalicílico +
- Acetofenetidina (fenacetidina) +

Sulfamidas y sulfonas:

- Sulfanilamida
- Sulfapiridina
- Diafenilsulfona
- N-acetilsulfanilamida
- Sulfisoxazol (Gantrisin) +

Tiazulfona
Salicilazosulfapiridina (Azulfadina)
Sulfoxona
Sulfametoxipiridina (Kynex)

Antipalúdicos:

Primaquina
Pamaquina
Pentaquina
Quinidina
Quinacrina

Agentes antimicrobianos no sulfamídicos:

Furazolidina
Nitrofurantoina (Furadantina)
Cloramfenicol

Diversos:

Naftaleno
Trinitrotolueno
Azúl de metileno +
Fenilhidracina
Quinina ++
Quinidina ++
Acido ascórbico +++
+ Ligeramente hemolítico en deficientes de G6PD A⁻ en dosis elevadas.
++ Hemolítico en deficientes de G6PD mediterraneo pero no en deficientes de G6PD A⁻
+++ En dosis elevadas.

Las manifestaciones clínicas de la hemólisis inducida por primaquina han sido bien estudiadas en la variante A⁻ observándose que la hemólisis afecta en general a los eritrocitos viejos (mayores de 50 días), por el contrario en la variante mediterránea, algunas drogas o después de la ingestión de habas, la hemólisis afecta a los eritrocitos de todas las edades (Sears, et.al., 1969). Algunos investigadores han demostrado variaciones importantes en el grado de hemólisis y el tipo de droga -- potencialmente hemolítica, en general, un episodio de hemólisis inducido por fármacos en individuos deficientes de G6PD, comienza de 1 a 3 días después del inicio de su administración. Aparecen cuerpos de heinz en los eritrocitos y la hemoglobina declina rápidamente, a medida que la hemólisis avanza, los cuerpos de heinz desaparecen de la circulación, probablemente porque los eritrocitos que los forman son eliminados de la circulación por el bazo. En casos graves puede haber dolor abdominal o lumbar, la orina puede volverse oscura y en un lapso de 4 a 6 días hay un incremento importante de reticulocitos.

En los deficientes de G6PD A⁻ la anemia hemolítica es -- autolimitada debido a que los eritrocitos jóvenes producidos -- en respuesta a la hemólisis tienen niveles prácticamente normales de G6PD, y son relativamente resistentes a la hemólisis. En la variante G6PD mediterránea, la deficiencia es mas severa y la hemólisis no es autolimitada, ya que se destruyen eritrocitos viejos y jóvenes.

ANEMIA HEMOLITICA EN EL CURSO DE UNA INFECCION.

En los individuos con deficiencia de G6PD se ha encontrado con bastante frecuencia anemia hemolítica a los pocos días de haberse iniciado una enfermedad febril, con descenso en la

-- concentración de hemoglobina hasta de 3 a 4g/100 ml: la ictericia no es frecuente excepto cuando se asocia a la hepatitis infecciosa.

FAVISMO.

El favismo es una de las consecuencias más graves en la variante mediterránea, el comienzo de la hemólisis suele ser brusco y se ha descrito que puede surgir en las primeras horas después de la ingestión de habas (Vicia fava) la orina se torna oscura y en casos más graves se puede presentar shock.

ICTERICIA NEONATAL.

La ictericia neonatal se puede presentar sin ningún signo de incompatibilidad inmunológica en algunos niños con deficiencia de G6PD. Frecuentemente en las variantes mediterránea, orientales y en algunos niños con G6PD A⁻, la ictericia puede ser muy intensa y si no se trata adecuadamente puede conducir a un Kerníctero.

ANEMIA HEMOLITICA NO ESFEROCITICA.

Algunas variantes como la mediterránea ocasionalmente se han asociado con anemia hemolítica congénita no esferocítica, aunque no se ha esclarecido el mecanismo por el cual esta variante, presenta hemólisis crónica. Inicialmente se manifiesta en la primera y segunda infancia, y en algunos casos se ha asociado a ictericia neonatal. Frecuentemente la hemólisis se exacerba en enfermedades febriles o con administración de fármacos oxidantes. En la mayoría de los casos la anemia hemolítica no es grave, pero en algunos se ha requerido de transfusiones frecuentes (Beutler, et.al., 1968).

VII METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA DEFICIENCIA DE G6PD.

Para propósitos clínicos cuando se requiere del diagnóstico preciso de la deficiencia de G6PD se cuenta con múltiples procedimientos de laboratorio confiables, los que incluyen --- pruebas de tamizaje y cuantitativas.

Las dificultades surgen en establecer el diagnóstico de un afectado con la variante G6PD A⁻ inmediatamente después -- de un episodio hemolítico, ya que al ser eliminados los eritrocitos viejos de la circulación, los niveles enzimáticos -- pueden ser normales. En este caso es conveniente realizar estudios familiares y esperar a que los eritrocitos circulantes envejeczan lo suficiente, para que la deficiencia enzimática se pueda hacer evidente.

La detección de heterocigotas presenta serios problemas por la presencia de una población de eritrocitos normales coexistiendo con otra de deficientes, por lo que cuando se emplean pruebas exploradoras, la deficiencia puede pasar desapercibida, incluso los ensayos enzimáticos se pueden encontrar dentro de los valores normales, si la proporción de eritrocitos deficientes es pequeña. Los métodos histoquímicos -- que tienen capacidad de medir actividad enzimática en eritrocitos individuales son de mayor utilidad para estos propósitos.

I.- Pruebas exploradoras o de tamizaje.

- a) formación de cuerpos de heinz: cuando los eritrocitos deficientes de G6PD se incuban con agentes -- reductores (ácido ascórbico, fenilhidrazina, primaquina, etc.) el patrón de formación de cuerpos -

de heinz observados difiere de las células normales bajo las mismas condiciones. Esta técnica tiene el inconveniente de ser poco específica.

- b) Prueba del glutatión reducido (GSH); La incubación de eritrocitos con acetilfenilhidracina y la medición de la estabilidad de GSH, es un método de ayuda en la detección de las células deficientes de G6PD sensibles a las drogas. Este método permite la detección de los varones hemicigotos, pero no a las portadoras; se han obtenido falsos positivos en los casos de hemoglobina B-Talasemia, probablemente por la participación de -- la hemoglobina en la destrucción de GSH, por lo que es poco específica.
- c) Métodos de tamizaje ligados a sales: la reducción de NADP, se mide indirectamente por la reducción de una sal, la cual absorbe en el espectro visible la deco -- loración de azul brillante de cresilo, la más amplia -- mente utilizada; otras sales que se utilizan como -- agentes reductores son el dicloroindofenol y el MTT-tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-1-2)-2,5-difenil - tetrazolium bromo) estos métodos de tinción citoquí -- mica son específicos para la identificación de va -- rriaciones cuantitativas de G6PD en eritrocitos indi -- viduales, por lo que son de utilidad en la detección de portadoras.
- d) Prueba de reducción de metahemoglobina de Brewer; esta prueba tiene la ventaja de que la hemoglobi -- na en presencia de azul de metileno, estimula la

vía de las pentosas fosfato cuando los eritrocitos deficientes de G6PD son tratados por este método, el rango de reducción de metahemoglobina disminuye y puede ser medido por espectrofotometría. Este método es económico pero requiere de muestras frescas.

- e) Método de cianuro-ascorbato: en los eritrocitos deficientes de G6PD, la incubación con ascorbato produce una desnaturalización de la hemoglobina cuando la catalasa es inhibida por el cianuro, los resultados pueden interpretarse por un cambio de color, es económica, requiere de sangre fresca, pero se han reportado resultados falsos positivos.
- f) Prueba fluorescente de Beutler: se basa en el hecho de que los nucleótidos de piridina reducidos fluorescen y los oxidados no, al observarse las muestras bajo luz ultravioleta de onda larga. Esta prueba es ampliamente recomendada para la detección de hemocigotos ya que requiere de un pequeño volumen de sangre y se realiza en muestras impregnadas en papel filtro las que pueden guardarse incluso por varios meses. La ventaja que presenta es que tiene un alto grado de precisión.

II.- Métodos enzimáticos cuantitativos.

La actividad de G6PD se mide en un lisado de eritrocitos cuantificando el rango de reducción de NADP en presencia de glucosa-6-fosfato en espectrofotómetro a 340nm, éste método no mide solamente la actividad de G6PD, sino también el ácido-6-foglucónico, por lo que se resta la actividad de esta enzima --

para dar el valor exacto de la actividad de G6PD.

III.- Para la caracterización de las variantes por subtipos (A⁺, mediterranea, cantón, etc.) se requiere de técnicas bioquímicas complicadas, donde la enzima pueda ser parcialmente -- purificada y posteriormente determinar su Km para NADP y G6P así como la utilización de métodos electroforéticos, cromatografía y curvas de actividad a pH diferentes (Stanbury, et.al.1972) .

VIII OBJETIVOS.

- Provar, evaluar y seleccionar entre las técnicas: reducción de metahemoglobina de Brewer, actividad enzimática de G6PD en eritrocitos y la citotóxicidad de G6PD en eritrocitos ligada a MTT-tetrazolium, la que detecte al 100% de afectados (hemicigotos) de G6PD.

- Provar, evaluar y seleccionar entre las técnicas: reducción de metahemoglobina de Brewer, actividad enzimática de G6PD en eritrocitos y la citotóxicidad de G6PD en eritrocitos ligada a MTT-tetrazolium las que junto con el análisis del árbol genealógico, detecte al 100% de portadoras de la deficiencia de G6PD.

IX MATERIAL Y METODOS

Para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo en relación al diagnóstico preciso de varones deficientes y portadoras de G6PD, los estudios bioquímicos se realizaron en dos etapas:

PRIMERA ETAPA: Estandarización de la metodología utilizando muestras obtenidas de 16 donadores del Banco Central de Sangre del Hospital General, Centro Médico "La Raza", I.M.S.S., de sexo masculino sin antecedentes de anemias hemolíticas y con edad promedio de 32.7 ± 9.0 años.

De cada individuo se obtuvo 7.0 ml de sangre anticoagulada con 0.7 ml de ACD (ácido cítrico, citrato de sodio, dextrosa) como anticoagulante. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta su procesamiento, el que se realizó durante las 48 horas posteriores, desechándose las muestras con evidencia de -- hemólisis y/o hematocrito bajo.

Las muestras de sangre se distribuyeron de la siguiente manera:

- 1.- Se llenaron dos capilares heparinizados para hematocrito.
- 2.- 4.0 ml para la prueba de reducción de metahemoglobina.
- 3.- 2.0 ml para la prueba citoquímica de MTT-tetrazolium.
- 4.- 0.1 ml para la técnica de actividad enzimática de G6PD

SEGUNDA ETAPA. Estudio de la población muestra.

6 propositus (varones afectados) de la clínica de anemias hemolíticas del Departamento de Hematología Pediátrica del Hospital General, Centro Médico "La Raza", I.M.S.S., los que clíni-

camente y con la técnica de reducción de metahemoglobina de Brewer habían sido diagnosticados como deficientes de G6PD se derivaron a la sección de Bioquímica del Departamento de Genética para estudio familiar.

El procedimiento genético y bioquímico de las 6 familias de los propositus fue el siguiente:

1.- Elaboración del árbol genealógico, el cual se analizó con los criterios genéticos establecidos para portadoras (Thompson y Thompson, 1975).

A) Portadora obligada:

- Madre con hijo afectado y otro familiar masculino por rama materna.
- Madre con dos hijos afectados.

B) Portadora posible:

- Madre con hijo afectado.
- Familiar femenino, hija de un varón deficiente.
- Hija de una mujer homocigota y padre normal.

Se tomó como grupo control a 14 varones con las mismas características a los utilizados por la estandarización de la metodología y el procesamiento de las muestras fue la misma que -- la descrita en la Etapa I y las técnicas se describen a continuación.

REDUCCION DE METAHEMOGLOBINA DE BREWER (Brewer, et.al., 1962).**PRINCIPIO.**

Los glóbulos rojos se tratan con nitrito de sodio para -- convertir su oxihemoglobina a metahemoglobina, la cuál en presencia de G6PD y azul de metileno es transformada nuevamente a oxihemoglobina, esto ocurre por la estimulación del ciclo de las pentosas y activación de la metahemoglobina-TPNH reductasa. Si existe deficiencia de G6PD al nivel de la metahemoglobina -- permanece elevado.

REACTIVOS.

- 1.- Cloruro de sodio 0.85%
- 2.- Nitrito de sodio 0.18 %
- 3.- Glucosa 0.28 M.
- 4.- Azul de metileno cloruro 4×10^{-4} M
- 5.- Solución de fosfatos M/15 pH6.6: 4.26 g. de fosfato -- de sodio dibásico anhidro con 5.44 g de fosfato de potasio monobásico en 1000 ml de agua desionizada.
- 6.- Solución reguladora de fosfatos M/60 pH 6.6: de la solución de fosfatos M/15, se toman 2.5 ml con 7.5ml de agua desionizada.
- 7.- Solución de ferricianuro de potasio 20%
- 8.- Solución de cianuro de sodio al 10%
- 9.- Solución de ácido acético al 12%

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Tomar 5 ml de sangre, dejar reposar a 4° C, 30 min.
- 2.- Rotular 5 tubos de 13 x 100 en la forma siguiente:

PS problema sin reactivos.

PC problema con reactivos.

NC normal sin reactivos.

NC normal con reactivos

TP testigo positivo.

- 3.- Agregar a cada uno de los tubos 2 ml. de sangre correspondiente.
- 4.- Agregar a cada uno de los tubos PC, NC en el orden siguiente:
 - a) 0.2 ml de solución de glucosa al 5%
 - b) 0.1 ml. de solución de nitrito de sodio 0.18 M
 - c) 0.1 ml de solución de azul de metileno en NaCl.
- 5.- Agregar a los tubos PS, NS:
 - a) 0.4 ml de cloruro de sodio 0.85%
- 6.- Agregar al tubo TP:
 - a) 0.1 ml de nitrito de sodio 0.18 M
 - b) 0.3 ml de cloruro de sodio 0.85 %
- 7.- Mezclar los tubos por inversión.
- 9.- Agitar suavemente con una pipeta a los 60 y 120 min. de incubación.
- 8.- Incubar en baño de agua a 37° C
- 10.- Congelar después de los 180 min. de incubación en -- hielo seco.
- 11.- Descongelar los tubos y en el hemolizado determinar la metahemoglobina residual en forma colorimétrica.
- 12.- Escoger 12 tubos de 18 x 20 de la misma densidad óptica para usarlos como celdillas en la forma siguiente:

SERIE I	BK	PS	PC	NS	NC	TP
SERIE II	BK	PS	PC	NS	NC	TP

- 13.- Colocar 10 ml de regulador de fosfatos M/60 en cada uno de los tubos de la serie I y 8 ml de regulador de fosfatos M/15 a los tubos de la serie II.
- 14.- Agregar a los tubos de la serie I, 0.2 ml del hemolizado problema y normal a los tubos correspondientes.
- 15.- Mezclar todos los tubos y leer en D.O. a 635 nm, utilizando el blanco de reactivos para ajustar a cero. - Estas lecturas se designarán L-1
- 16.- Agregar a estos mismos tubos, incluyendo al blanco, - una gota de cianuro de sodio, mezclar y dejar reposar 2 min y leer en D.O. a 635 nm. Estas lecturas se designarán L-2
- 17.- Pasar 2 ml de cada uno de los tubos de la serie I a cada uno de los tubos de la serie II y una gota de -- ferricianuro de potasio, mezclar y dejar reposar 2 min
- 18.- Agregar a cada tubo una gota de cianuro de sodio para convertir la metahemoglobina a cianometahemoglobina y así poder determinar la cantidad total de hemoglobina Mezclar y dejar reposar 2 min y leer en D.O. a 540 nm ajustando a cero con el blanco de reactivos. Estas lecturas se asignarán L-3.

CALCULAR.

$$\frac{D.O. (L-1) - (L-2)}{D.O. (L-3) \times F} \times 100 = \% \text{ de metahemoglobina}$$

F = factor de dilución.

Valores normales: Sin reactivos = menos de 2 %

Con reactivos = menos de 5 %

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

PRINCIPIO.

El nivel de la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en eritrocitos lizados, se calculan al medir el incremento -- en absorción a 340 nm D.O. por la reducción de NADPH, ésta coenzima contiene una absorción específica a 340 nm D.O.

REACTIVOS.

- 1.- Buffer TRIS-HCL 0.3 M pH 8.0
- 2.- 6-fosfogluconato 18 nM
- 3.- Glucosa-6-fosfato 18 nM
- 4.- Cloruro de magnesio 0.1 M
- 5.- NADP 6 nM

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Preparar el hemolizado 1:50 en agua destilada.
- 2.- Mezclar y dejar reposar 10 min.
- 3.- Centrifugar a 2000 rpm 10 min.
- 4.- Usar el sobrenadante claro.
- 5.- Preparar la mezcla de reacción de la siguiente manera:

	CUBA 1	CUBA 2	CUBA 3
TRIS-HCL pH 8.0	-----	1.0 ml	1.0 ml
MgCl 0.1 M	-----	0.3 ml	0.3 ml
6-PG 18 nM	-----	0.1 ml	0.1 ml
G6P 18 nM	-----	-----	0.1 ml
agua destilada	1.5 ml	1.0 ml	0.9 ml
Hemolizado	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Mezclar por inversión			
NADP 6 nM	-----	0.1 ml	0.1 ml
mezclar por inversión y dejar reposar 2 minutos.			

- 6.- Medir en espectrofotómetro a 340 nm de D.O. a intervalos de un minuto en un lapso de 5 a 10 min.
- 7.- Medir la hemoglobina a 540 nm de D.O. empleando agua destilada como blanco.
- 8.- Graficar los resultados del coeficiente de extensión de las dos celdillas.
- 9.- Los valores de G6PD y 6PG se obtienen multiplicando -- 138 que es un factor de corrección por el valor de la pendiente obtenida de la gráfica entre el valor en -- gramos de la hemoglobina.

INTERPRETACION.

Valores normales:	G6PD	5.13 ± 1.3 UI/g Hb.
	6PG	5.10 ± 2.4 UI/g Hb

PRUEBA CITOQUIMICA DE ACTIVIDAD DE G6PD EN ERITROCITOS.
(Virgil, et.al., 1968).

PRINCIPIO.

La precipitación de gránulos de formazán en eritrocitos -- se realiza cuando la hemoglobina es expuesta a las sales reductoras de tetrazolium, lo que indica la presencia o ausencia de las enzimas que participan en el ciclo de las pentosas.

La metahemoglobina formada por oxidación con nitrato de -- sodio se reduce a hemoglobina formada por la incubación de los eritrocitos que contienen la enzima, glucosa, NADP, y las sales indicadoras de MTT, la actividad se calcula por el número de -- gránulos de formazán formados.

REACTIVOS.

- 1.- Nitrito de sodio 0.18 M
- 2.- Mezcla de incubación: combinar;
 - 4 ml de 0.85% de cloruro de sodio
 - 1 ml de glucosa al 5%
 - 2 ml de buffer fosfato 0.3 M pH 7.0
 - 1 ml de azul de nilo "A" 11 mg/100 ml
 - 2 ml de agua desionizada
- 3.- Solución salina (NaCl) al 0.85 %
- 4.- MTT-tetrazolium 5 mg/1 ml de solución salina 0.85%
- 5.- Solución salina (NaCl) al 0.6%

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Tomar 2 ml de sangre, se refrigera a 4^o C hasta que -- la prueba se realice (no más de una semana).
- 2.- Centrifugar la muestra durante 10 min a 2000 rpm y -- eliminar el sobrenadante.

- 3.- 0.5 ml del paquete de eritrocitos son transferidos a - 9.0 ml de solución salina isotónica y 0.5 ml de nitrato de sodio 0.18 M, incubar sin mover a 37° C por -- 20 min.
- 4.- Centrifugar a 4° C por 15 min a 2000 rpm, desechar el sobrenadante.
- 5.- Lavar el paquete 3 veces con 9.0 ml de solución salina isotónica.
- 6.- Transferir 0.05 ml del paquete de eritrocitos a un mililitro de la mezcla de incubación, e incubar durante 30 minutos a 37° C.
- 7.- Adicionar 0.2 ml de MTT-tetrazolium a la mezcla, e -- incubar 60 minutos a 37° C con agitación periódica.
- 8.- Resuspender las células y colocar sobre un portaobje-- tos una gota de la mezcla y una gota de solución salina 0.6% colocar un cubreobjetos y observar al micros - copio con el objetivo de inmersión.
- 9.- Contar los gránulos en 100 células de la siguiente -- manera:

células sin gránulos	0
células con 1-3 gránulos	1+
células con 4-6 gránulos	2+
células con mas de 7 gránulos	3+
- 10.- Multiplicar el número de células de cada rango por su valor asignado, sumar el total de los productos de las 100 células.

INTERPETACION.

La cuenta total de gránulos en 100 células en personas normales es de 265 a 300, en portadoras de 200 a 225 y en afectados menos de 50.

X RESULTADOS.

Los valores obtenidos para la estandarización de las técnicas de reducción de metahemoglobina de Brewer, actividad enzimática de G6PD y la citoquímica de actividad de G6PD ligada a MTT-tetrazolium, utilizando para esto la prueba estadística de t-student y su comparación con los reportados en la literatura se muestran en la Tabla I, observándose que no hubo diferencia estadísticamente significativa.

Los valores de hematocrito obtenidos, variaron de 42 a 51% siendo los valores reportados en la literatura de 45 a 60%.

La medida aritmética (\bar{X}) y la desviación estandar (S) de los valores obtenidos con las tres técnicas, reducción de metahemoglobina de Brewer, actividad enzimática de G6PD en eritrocitos y la citoquímica de actividad de G6PD en eritrocitos ligada a MTT-tetrazolium, se estableció para los controles, deficientes, portadoras obligadas, portadoras posibles y normales.

El análisis estadístico se realizó aplicando t-student entre el grupo control y los cuatro restantes de las familias con cada una de las tres técnicas.

Con los resultados del estudio de 57 miembros entre las 6 familias y el análisis de árbol genealógico se logró realizar el diagnóstico de:

- 1.- 10 varones deficientes.
- 2.- 7 mujeres portadoras obligadas.
- 3.- 3 mujeres portadoras posibles.
- 4.- 37 familiares femeninos y masculinos normales.

TABLA I

COMPARACION DE LOS VALORES DE REFERENCIA

METODO	VALORES DE REFERENCIA EN LA LITERATURA	VALORES DE REFERENCIA EN ESTE ESTUDIO
REDUCCION METANEMOGLOBINA DE BREWER	< 5 %	< 5 %
ACTIVIDAD ENZIMATICA G-6-PD EN ERITROCITOS	4.18 ± 0.92 UI / g Hb	5.7 ± 1.3 UI / g Hb
PRUEBA CITOQUIMICA ACTIVIDAD DE G-6-PD M.T.T. TETRAZOLIUM	265 a 300 GRANULOS / 100 CELULAS	270 a 300 GRANULOS / 100 CELULAS

En la Tabla II se muestra la comparación del grupo control con los 37 individuos normales de la 6 familias con las tres técnicas, donde se observa que no hubo diferencia estadísticamente significativa.

En la Tabla III se muestra la comparación del grupo control con los 10 varones deficientes, como puede observarse en las tres técnicas hubo diferencia estadísticamente significativa, con valor de $p < 0.001$.

En la Tabla IV se muestra la comparación del grupo control con las portadoras obligadas observándose que con la técnica de --reducción de metahemoglobina de Brewer, no hubo diferencia estadísticamente significativa, mientras que con la de actividad enzimática ($t=5.36$ y $p < 0.001$) y la citotóxica de MTT-tetrazolium ($t=6.44$ y $p < 0.001$) sí hubo diferencias significativas.

Por otro lado en la Tabla V se comparó al grupo control -- con las portadoras posibles, observándose que con la técnica de reducción de metahemoglobina no hubo diferencia en los resultados, no así al aplicar la metodología para actividad enzimática ($t=4.46$ y $p < 0.001$) y la citotóxica de MTT-tetrazolium ($t=5.28$ y $p < 0.001$).

En la Fig.7 se muestran los resultados de la técnica de reducción de metahemoglobina de Brewer, observándose la diferencia que existe entre los valores obtenidos para deficientes, portadoras obligadas, portadoras posibles, familiares normales y controles y los familiares de las 6 familias, encontrándose que los controles y los familiares normales cayeron en el rango designado para normales de 0.00 a 5.0% de metahemoglobina, mientras que las portadoras obligadas y posibles presentaron valores normales altos quedando 3 de -- estas en el rango para deficientes, aunque como...

se observa no alcanzan los valores de más de 15% de metahemoglobina, como la mayoría de los varones deficientes.

En la Fig. 8 se muestran los resultados de la técnica de actividad enzimática de G6PD en eritrocitos, donde se observa la diferencia que existe entre los deficientes, portadoras o obligadas, portadoras posibles, familiares normales y controles de las 6 familias, donde debido a que la actividad enzimática de G6PD de los varones afectados no excede el 15%, todos los deficientes quedaron en el rango designado de 0.0 a 2.0% de actividad enzimática, las portadoras obligadas y posibles cayeron en el rango de los valores intermedios de 1.3 a 4.0%, los familiares y controles quedaron en el rango normal mayor de 4.0% de actividad enzimática de G6PD.

En la Fig. 9 se muestran los resultados de la prueba citológica de actividad de G6PD en eritrocitos ligados a MTT-tetrazolium, para deficientes, portadoras obligadas, portadoras posibles, familiares normales y controles de las 6 familias, -- los deficientes quedaron en un rango de 0.0 a 30 gránulos de formazán/100 células, las portadoras obligadas y posibles quedaron en el rango de valores intermedios de 100 a 260 gránulos de formazán/100 células a excepción de una portadora posible y una obligada que cayeron en el rango de valores normales, mientras que los controles y los familiares normales quedaron en el rango normal de 265 a 300 células de formazán/100 células.

Al aplicar esta metodología se logró establecer el diagnóstico de:

1.- 10 varones deficientes:

- en la familia 1, el varón III-10 y III-7
- En la familia 2, el varón IV-2 y IV-3

- en la familia 3, el varón III-3 y III-7
- en la familia 4, el varón II-1 y III-4
- en la familia 5, el varón III-3
- en la familia 6, el varón III-7

2.- 7 portadoras obligadas:

- en la familia 1, la mujer II-6
- en la familia 2, la mujer III-1 y II-2
- en la familia 3, la mujer II-12 y II-10
- en la familia 4, la mujer II-2 y I-2

3.- 3 portadoras posibles:

- en la familia 1, la mujer II-5
- en la familia 4, la mujer III-1
- en la familia 5, la mujer II-4

37 familiares femeninos y masculinos normales en las 6 familias.

En el árbol genealógico y los resultados individuales para cada una de las familias se muestran a continuación. (Fig. 10 a 15).

TABLA II COMPARACION DEL GRUPO CONTROL
CON EL NORMAL EN LAS TRES TECNICAS

	REDUCCION META - HEMOGLOBINA	ACTIVIDAD ENZIMATICA	CITOQUIMICA TETRAZOLIUM
CONTROLES	\bar{X} 3.584 S 1.219	A 5.843 B 1.316	C 281.71 10.61
NORMALES	\bar{X} 4.02 S 1.578	a 5.757 b 2.17	c 287.13 21.74
t STUDENT P	0.86 —	0.197 —	0.868 —

* NO EXISTE DIFERENCIA ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVA
EN LAS TRES TECNICAS.

TABLA III COMPARACION DEL GRUPO CONTROL
CON EL DEFICIENTE

	REDUCCION META - HEMOGLOBINA	ACTIVIDAD ENZIMATICA	CITOQUIMICA TETRAZOLIUM
CONTROLES \bar{X}	3.584	5.643	281.71
S	1.219	1.316	10.61
DEFICIENTES \bar{X}	17.46	0.888	43.1
S	5.19	0.576	20.0
t STUDENT	8.94	10.66	37.34
P	< 0.001 *	< 0.001 *	< 0.001 *

* EXISTE DIFERENCIA ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVA CON
LAS TRES TECNICAS.

TABLA IV COMPARACION DEL GRUPO CONTROL
CON LAS PORTADORAS OBLIGADAS

	REDUCCION META - HEMOGLOBINA	ACTIVIDAD ENZIMATICA	CITOQUIMICA TETRAZOLIUM
CONTROLES \bar{X}	3.584	5.643	281.71
S	1.219	1.316	10.61
PORTADORAS \bar{X}	5.0	2.64	197.86
OBLIGADAS S	2.24	0.93	47.534
t STUDENT	1.80	5.36	6.44
P	—	< 0.001*	< 0.001*

* EXISTE DIFERENCIA ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVA EN
ACTIVIDAD ENZIMATICA Y CITOQUIMICA - TETRAZOLIUM.

TABLA V COMPARACION DEL GRUPO CONTROL
CON LAS PORTADORAS POSIBLES

		REDUCCION META - HEMOGLOBINA	ACTIVIDAD ENZIMATICA	CITOQUIMICA TETRAZOLIUM
CONTROL	\bar{x}	3.584	5.643	281.71
	S	1.219	1.316	10.61
PORTADORAS POSIBLES	\bar{x}	4.55	2.16	210.0
	S	2.19	0.15	51.73
t STUDENT		0.95	4.46	5.28
P		—	< 0.001 *	< 0.001 *

* EXISTE DIFERENCIA ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVA EN
ACTIVIDAD ENZIMATICA Y CITOQUIMICA - TETRAZOLIUM.

TABLA VI

	PORCIENTO (%) DE RESULTADOS ANORMALES REPORTADOS EN LA BIBLIOGRAFIA		PORCIENTO (%) DE RESULTADOS ANORMALES EN ESTE ESTUDIO	
	VARONES DEFICIENTES HEMICIGOTOS	MUJERES PORTADORAS HETEROCIGOTAS	VARONES DEFICIENTES HEMICIGOTOS	MUJERES PORTADORAS HETEROCIGOTAS
M E T O D O				
REDUCCION DE METAHEMOGLOBINA DE BREWER	100	—	100	30
ACTIVIDAD ENZIMATICA EN ERITROCITOS	100	80	100	100
PRUEBA CITOQUIMICA EN ERITROCITOS MTT.-TETRAZOLIUM	100	80-100	100	86

Fig. 7 REDUCCION DE METAHEMOGLOBINA DE BREWER

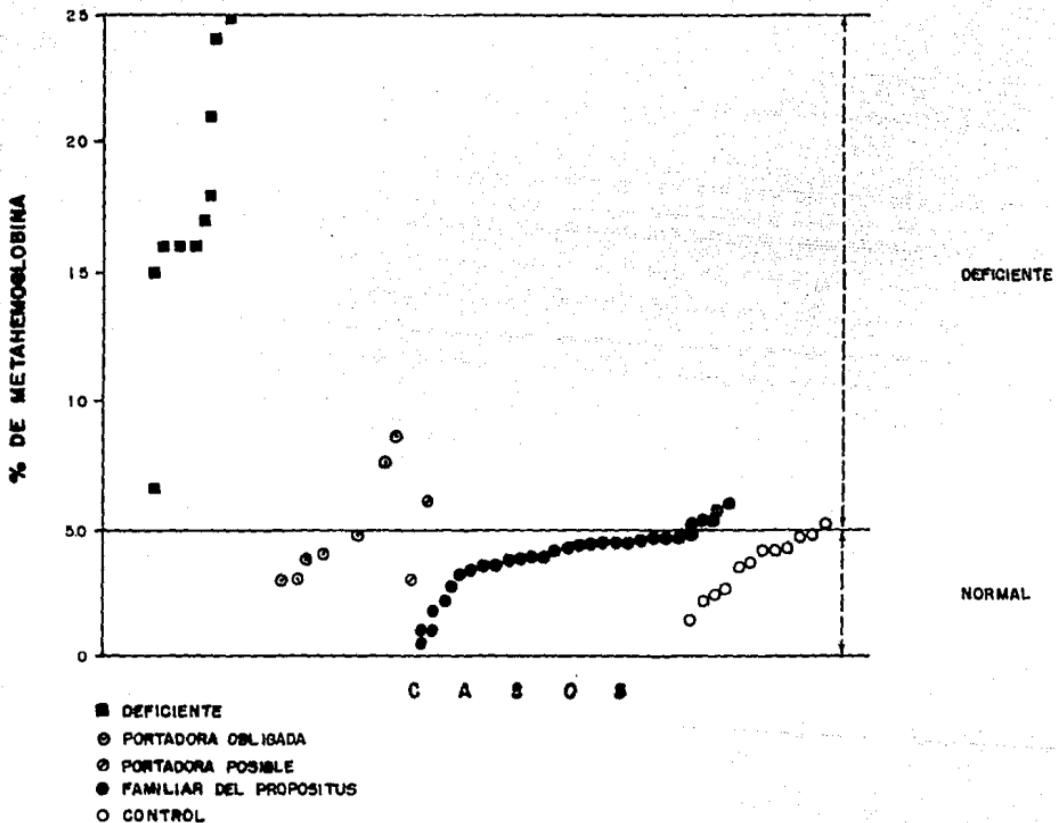
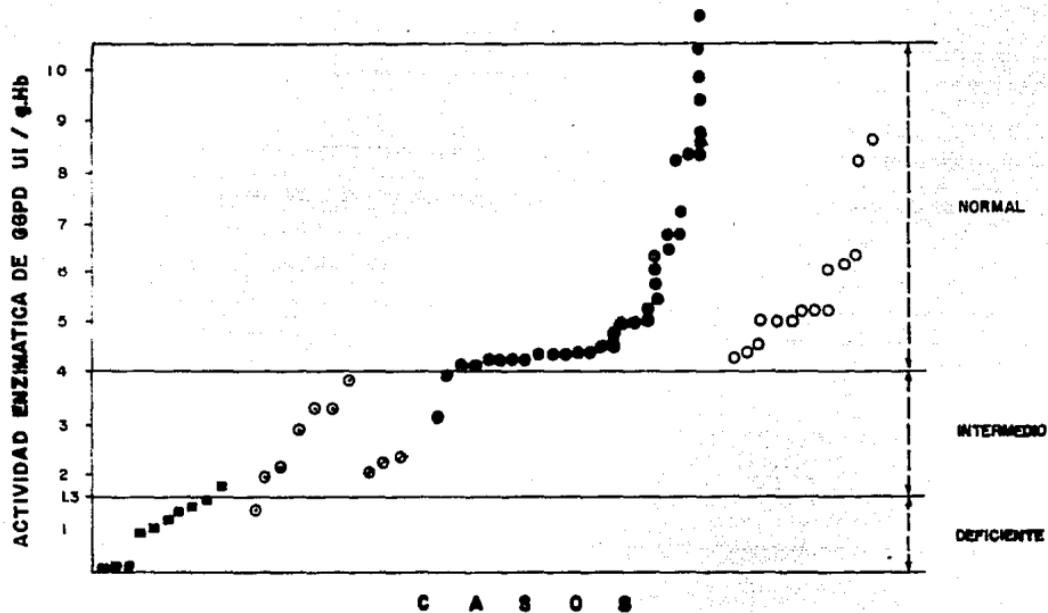


Fig. 8 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE G6PD EN ERITROCITOS



- DEFICIENTE
- ◐ PORTADORA OBLIGADA
- ◑ PORTADORA POSIBLE
- FAMILIAR DEL PROPOSITUS
- CONTROL

Fig. 9 PRUEBA CITOQUIMICA DE ACTIVIDAD DE G6PD EN ERITROCITOS
M.T.T.- TETRAZOLIUM

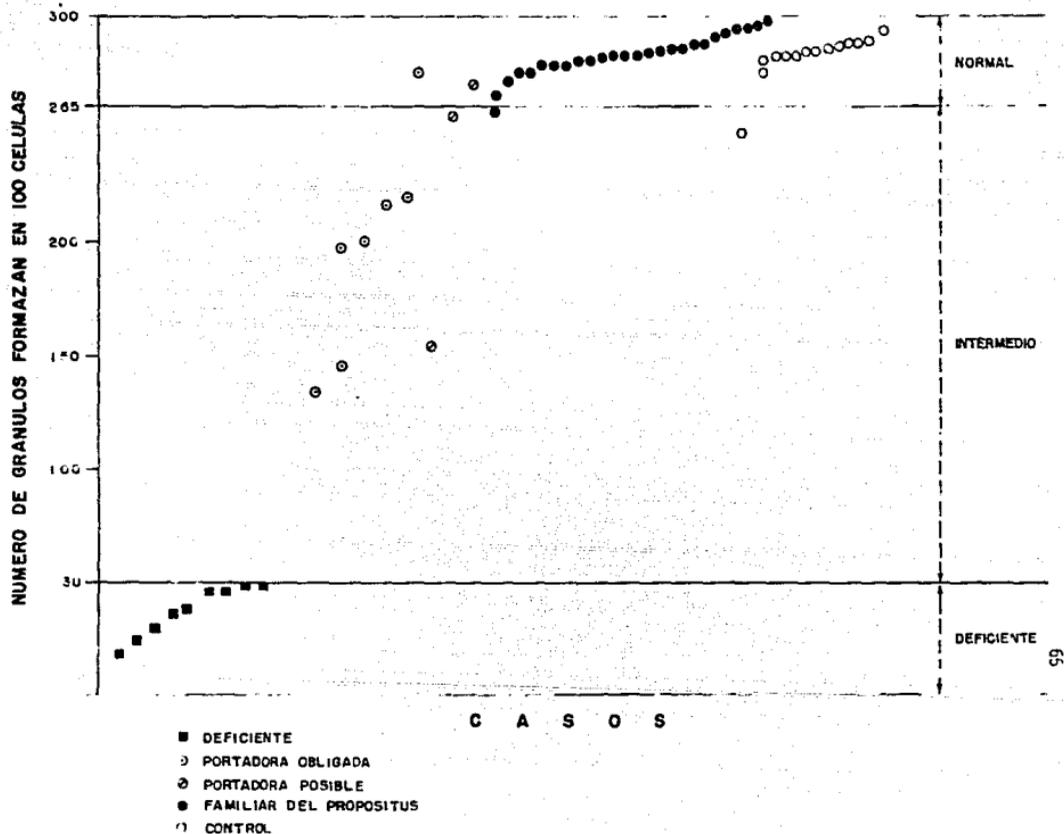
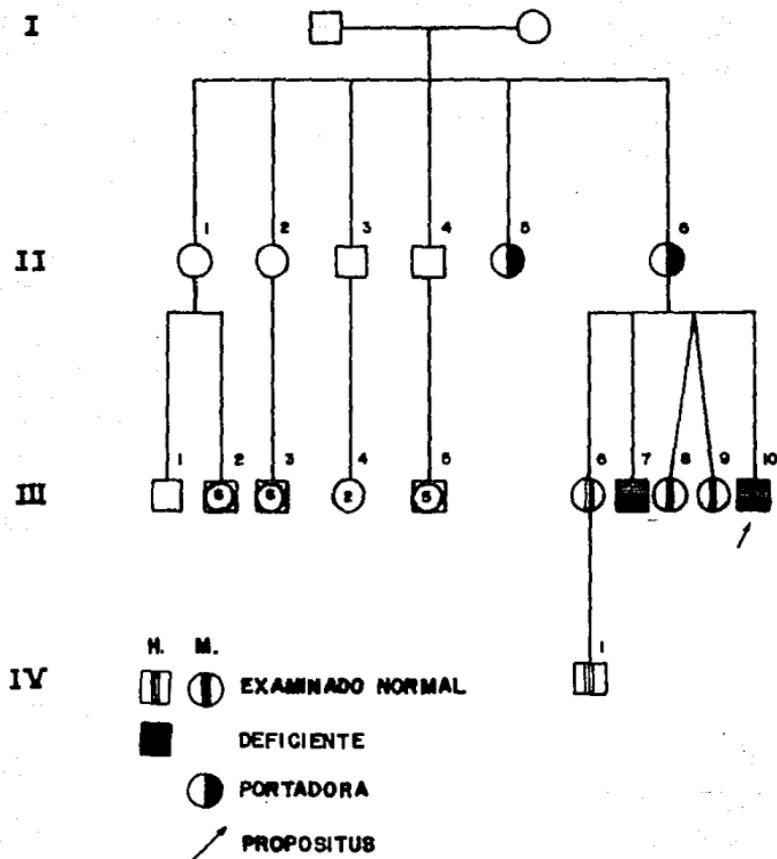
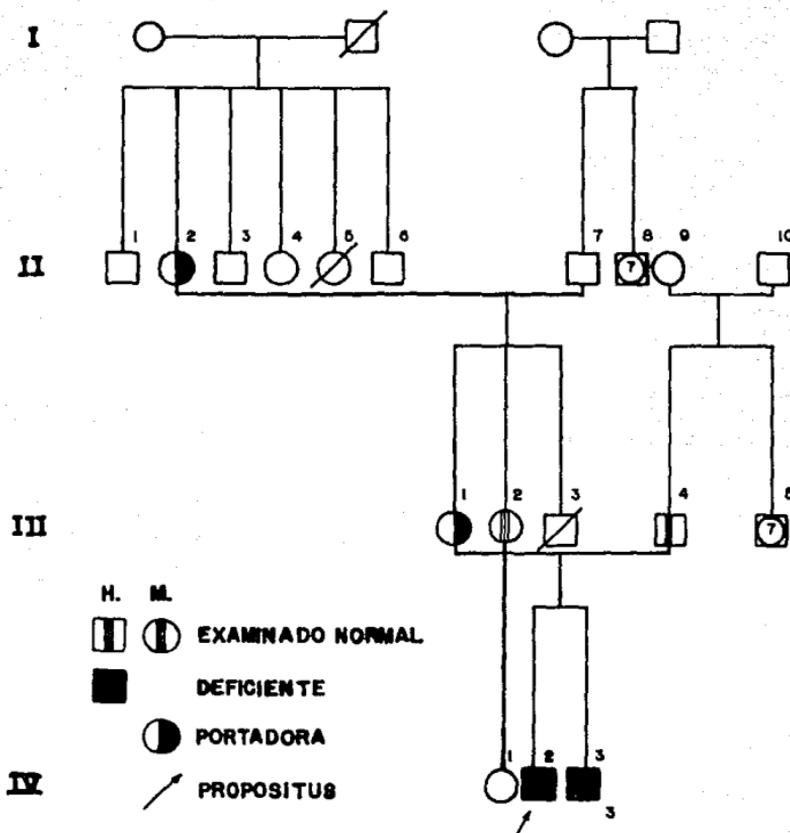


Fig. 10 FAMILIA I



Resultados de Laboratorio

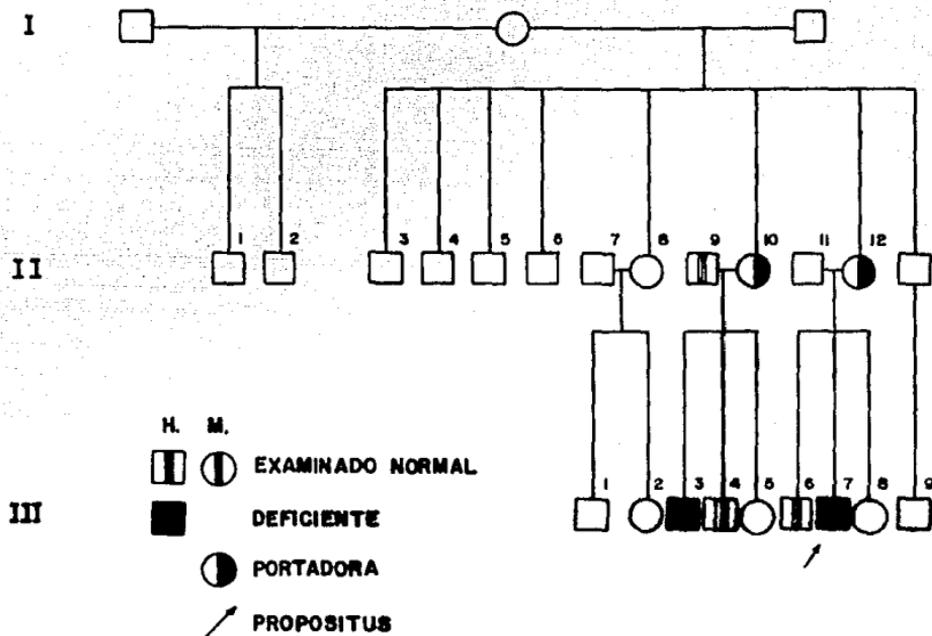
	Edad	Sexo	Hto	Retis	Red. Met.	Act. Enz.	MTT. tetrazolium
III-10 propositus	17a	M	7.4 ↓	25.0 ↑	25.0 ↑	0.98 ↓	36 ↓
III-7 hermano	21a	M	50.0	--	6.6 ↑	1.3 ↓	50 ↓
II-6 madre	50a	F	42.0	--	5.0 ↑	1.2 ↓	134 ↓
II-5 tía	52a	F	39.0	--	6.1 ↑	2.2 ↓	256 ↓
III-6 hermana	23a	F	42.0	--	4.8	6.6	---
III-8 hermana	15a	F	52.0	--	3.2	3.3	---
III-9 hermana	15a	F	47.0	--	5.7	6.9	260
IV-1 sobrino	1a	M	31.0	--	---	8.6	282



Resultados de Laboratorio

		Edad	Sexo	Hto.	Retis.	Red. Met.	Act. Enz.	MTT Tetrazolium
IV-2	propositus	8a	M	30	11.0 ↑	16.0 ↑	0.8 ↓	60 ↓
IV-3	hermano	9a	M	38	---	18.0 ↑	1.2 ↓	29 ↓
III-1	madre	30a	F	39	---	3.0	3.8 ↓	216 ↓
II-2	abuela	60a	F	42	---	3.0	3.3 ↓	220 ↓
III-2	tía	28a	F	39	---	4.0	4.4	282
III-4	padre	32a	M	50	---	0.5	5.0	---

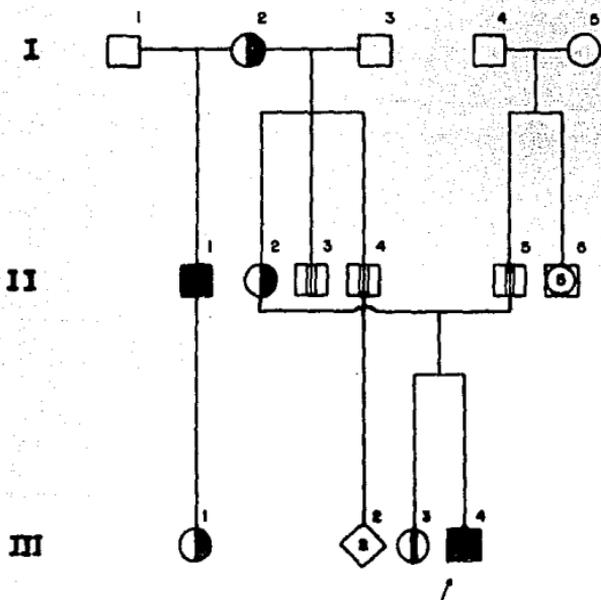
Fig. 12 FAMILIA 3



Resultados de Laboratorio.

		Edad	Sexo	Hto	Retis	Red. Met.	Act. Enz.	MTT. tetrazolium
III-7	propositus	4a	M	16.4	16.0 ↑	21.4 ↑	0.2 ↓	48 ↓
III-3	primo	7a	M	36.0	---	16.0 ↑	0.0 ↓	48 ↓
II-12	madre	26a	F	46.0	---	7.0 ↑	3.3 ↓	146 ↓
II-10	tía	28a	F	40.0	---	4.0	2.9 ↓	194 ↓
II-9	tío	34a	M	45.0	---	3.1	4.5	280
III-4	primo	5a	M	37.0	---	4.2	4.3	257
III-6	hermano	7a	M	46.0	---	4.3	4.3	227

Fig.13 FAMILIA 4

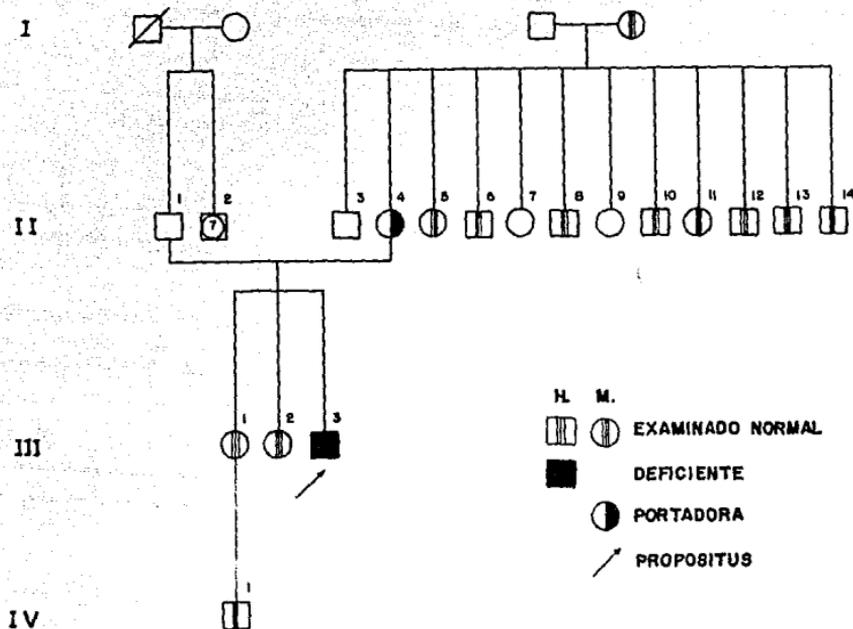


Resultados de Laboratorio.		Edad	Sexo	Hto.	Retis	Red. Met.	Act. Enz.	MTT tetrazolium
III-4	propositus	14a	M	32	15.0 ↑	15.0 ↑	1.4 ↓	38 ↓
II-1	tío	45a	M	44	---	17.0 ↑	1.1 ↓	18 ↓
II-2	madre	35a	F	30	---	8.6 ↑	1.9 ↓	143 ↓
III-1	prima	8a	F	40	---	---	2.3 ↓	220 ↓
I-2	abuela	60a	F	42	---	3.8	2.1 ↓	200 ↓
II-3	tío	38a	M	49	---	1.1	6.7	285
II-4	tía		F	50	---	3.3	4.4	281
II-5	padre	40a	M	48	---	3.8	6.2	283
III-3	hermana		F	48	---	3.3	4.2	282

Fig. 14

FAMILIA 5

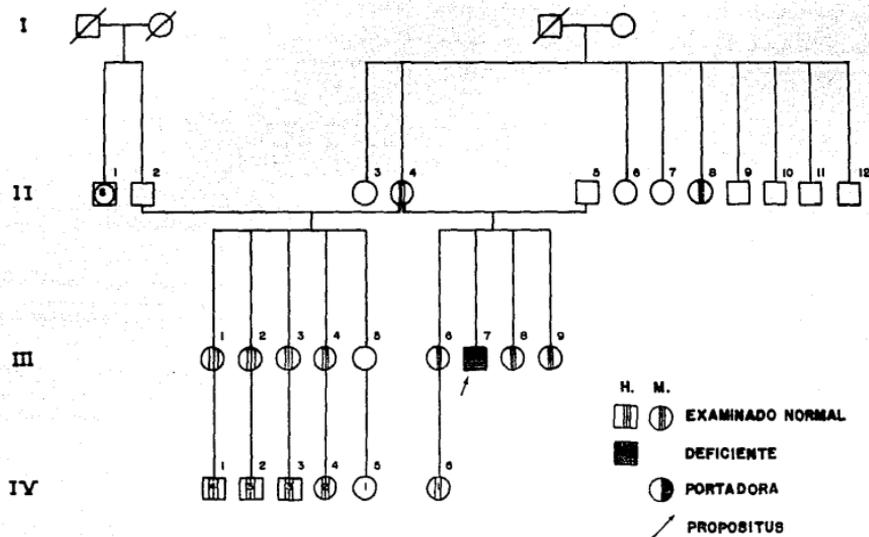
70



Resultados de Laboratorio

		Edad	Sexo	Hto	Retis	Red. Met	Act. Enz.	MTT tetrazolium
III-3	propositus	13a	M	33.0	7.0 ↑	21.0 ↑	0.2 ↓	24 ↓
II-4	madre	30a	F	39.0	---	2.0	2.0 ↓	154 ↓
II-5	tía		F	31.0	---	4.8	4.2	240
II-6	tío		M	44.0	---	3.5	4.1	267
II-8	tío		M	48.0	---	5.0	5.7	271
II-10	tío		M	46.0	---	4.0	4.9	296
II-11	tía		F	42.0	---	5.1	4.2	285
II-12	tío	24a	M	48.0	---	1.2	4.6	288
II-13	tío	28a	M	47.0	---	---	3.6	260
II-14	tío		M	43.0	---	4.7	2.8	230
I-4	abuela		F				4.5	265
III-1	Hermana		F	34.0	---	5.0	4.3	239
III-2	hermana		F	31.0	---	4.8	4.2	240
IV-1	sobrino		M	---	---	---	7.2	282

Fig. 16 FAMILIA 6



H. M.
 [shaded square] [shaded circle] EXAMINADO NORMAL
 [solid square] [solid circle] DEFICIENTE
 [half-shaded circle] PORTADORA
 / PROPOSITUS

Resultados de Laboratorio.

		Edad	Sexo	Hto	Retis	Red. Met	Act. Enz.	MTT. tetrazolium
III-7	propositus	16a	M	21.0	34.2 ↑	16.0 ↑	1.7 ↓	50 ↓
II-4	madre		F	43.0	---	4.7	4.9	275
II-8	tía	34a	F	40.0	---	4.3	6.7	278
III-1	hermana		F	49.0	---	4.6	5.5	300
III-2	hermana		F	42.0	---	4.3	---	278
III-3	hermana		F	39.0	---	---	4.9	275
III-4	hermana		F	46.0	---	5.3	5.2	282
III-6	hermana	17a	F	43.0	---	3.9	---	284
III-8	hermana	26a	F	36.0	---	6.4	2.8	278
III-9	hermana		F	43.0	---	0.47	---	291
IV-1	sobrino		M	33.0	---	1.8	11.2	291
IV-2	sobrino		M	46.0	---	2.2	---	298
IV-3	sobrino		M	42	---	1.2	---	278
IV-4	sobrina	2a	F	40.0	---	3.9	4.2	281
IV-6	sobrina	2a	F	38.0	---	3.1	3.3	279

En la Tabla VI se muestra la comparación del porciento - de los resultados en las tres técnicas utilizadas en el estudio para deficientes y portadoras, con los reportados en la bibliografía. Encontrándose que la detección de los varones deficientes (hemicigotos) en el estudio y los reportados fué del 100%; mientras que para la detección de portadoras, en la técnica de reducción de metahemoglobina, en el estudio se logró determinar el - 30% de estas, bibliográficamente no hay dato. Con la técnica -- de actividad enzimática de G6PD en eritrocitos en el estudio, se logró hacer la detección del 100% y bibliográficamente se -- reporta el 80%, de esto puede deberse a que la población de portadoras con la que se trabajó fue muy baja. Con la técnica ci--toquímica de G6PD en eritrocitos ligada a MTT-tetrazolium en el estudio coincidió con el porciento reportado en la literatura - que es del 80 al 100%.

XI DISCUSION.

La aplicación de los estudios bioquímicos y el análisis - del árbol genealógico es importante para establecer el diagnóstico de afectados y portadoras de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), recesiva ligada al cromosoma X.

Con los resultados de los estudios de laboratorio y el - análisis del árbol genealógico para posibilidades de heterocigosidad se confirma una vez más la utilidad de dichos procedimientos en 6 familias en las que fue posible estudiar a 57 individuos donde se logró identificar a:

- 1.- 10 varones deficientes: un varón en cada familia con antecedentes de anemia hemolítica inducida por fármacos y a 4 varones más, sin antecedentes de haber presentado anemia hemolítica (en la familia I, el individuo III-7; en la familia 2, el IV-3 y al III-3; en la familia 4, al II-1).

Con la técnica de reducción de metahemoglobina de Brewer, en los 10 varones deficientes, los resultados fueron de 6.6 a 25% de reducción de metahemoglobina y $\bar{X} = 17.46\%$ (valores normales menor a 5% de reducción de metahemoglobina) debido a que cuando existe deficiencia de la enzima G6PD la metahemoglobina permanece elevada. En esta técnica aunque no mide directamente a la G6PD permitió el diagnóstico del 100% de los afectados.

Con la técnica de actividad enzimática de G6PD en eritrocitos, los valores en los 10 varones deficientes fueron de 0.0 a 1.3 UI/g Hb y $\bar{X} = 0.88$ UI/g Hb (valores normales 5.17 ± 1.3 UI/g Hb) lo que permitió el diagnóstico del 100% de estos deficientes.

Con la técnica citoquímica ligada a MTT-tetrazolium en los 10 varones deficientes, los resultados encontrados fueron de 18 a 50 gránulos de forazán/100 células y una \bar{X} = 43.1 (normales -- 265 a 300 gránulos de farmazán/100 células) la presencia de la - formación de gránulos en los eritrocitos se realizan cuando la - hemoglobina es expuesta a sales reductoras de MTT-tetrazolium y en presencia de G6PD; así también se logró identificar al 100% de los varones deficientes.

Los resultados obtenidos con las tres técnicas en la de-- tección de los 10 varones deficientes en este estudio, corres-- ponden a los reportados en la literatura en relación a que su - diagnóstico es relativamente simple, debido a que la actividad de la enzima en sus eritrocitos es inferior al 15% del valor -- medio normal.

2.- 37 individuos normales: De los 57 miembros que se lo-- garon estudiar en las 6 familias, 37 fueron normales por los - estudios bioquímicos realizados en el análisis del árbol genea-- lógico.

La técnica de reducción de metahemoglobina de Brewer se - logró realizar en 31 de ellos, en 6 casos no fué posible por -- tratarse de menores de un año y para esta técnica se requiere - de por lo menos 4.0 ml de sangre total. En los 31 casos estudia-- dos, los valores variaron de 1.2 a 5.0% de metahemoglobina con \bar{X} = 4.2 a excepción de la III-9 de la familia I en la que se ob-- tuvo un valor anormal de 5.7% de metahemoglobina, en la que se descartó como portadora de G6PD por obtenerse valores normales con las otras técnicas, por lo que pudo tratarse de un error -- en la metodología.

Con la técnica de actividad enzimática: en los 37 indivi-- duos normales, los valores se encontraron de 4.2 a 9.4 UI/ g Hb

y \bar{X} = 5.75, a excepción del varón II-12 de la familia 5, en el que se obtuvo valores intermedios de 3.1 UI/g Hb, en este caso se descartó la posibilidad de ser un deficiente debido a que los valores no son tan bajos como los encontrados para afectados y no tiene antecedentes de haber tenido anemia.

La técnica citoquímica de MTT-tetrazolium se logró realizar en 26 miembros normales de las 6 familias, los valores encontrados fueron de 265 a 300 gránulos de formazán/100 células. Los valores obtenidos con esta metodología se encontraron en los valores esperados para individuos normales.

3.- 10 heterocigotas (7 obligadas y 3 posibles): con la técnica de reducción de metahemoglobina de Brewer, los resultados obtenidos fueron de 3.0 a 8.6% de metahemoglobina y \bar{X} = 5.0 con esta técnica solamente fue posible detectar al 30% de estos, en la familia 1, la mujer III-5 con un valor de 6.5%, en la familia 4 a la mujer II-2 con un valor de 7.6%, y en la familia 5 a la mujer II-8 con un valor de 8.6%, esto es debido a que esta técnica no es lo suficientemente específica para detectar heterocigotas ya que se sabe que las técnicas que determinan actividad de G6PD en lisados de eritrocitos son poco específicas para la detección de portadoras.

Con la técnica de actividad enzimática de G6PD se logró la detección de las 10 portadoras con valores de 1.2 a 3.8 UI/g Hb y \bar{X} = 2.64. En la familia 1, la portadora II-6 se encontró con valores tan bajos como de deficiente; probablemente en este caso la serie eritroide en su mayoría puede estar constituida por células portadoras del gen mutante.

Con la técnica citoquímica ligada a MTT-tetrazolium en las 10 heterocigotas, los valores variaron de 134 a 252 gránulos

los de formazán/100 células). En la familia I, la portadora -- obligada II-6 se encontró normal con valor de 275 gránulos de formazán, aunque se han reportado que los métodos de tinción -- citoquímica como la ligada a MTT-tetrazolium son muy específicos porque tienen la capacidad de medir a la enzima en eritrocitos individuales, probablemente este sea un caso que por razones metodológicas escape a su detección. Virgil y colaboradores lograron detectar del 80 al 100% de portadoras de G6PD (Virgil, et.al., 1968). aunque el grupo de heterocigotas en este estudio es reducido, se logró hacer la detección del 90% de éstas.

De aquí que los problemas que presentan las portadoras -- para su detección es la gran variación en la expresión de su -- actividad enzimática, dependiendo de la relación entre células de un progenitor con un cromosoma X deficiente o normal, tomando en cuenta la hipótesis de Lyon de la inactivación al azar -- de los cromosomas; tanto de derivación paterna o materna que -- puedan escapar a la inactivación.

Un cromosoma inactivo se replica en cada división celular, pero permanece inactivo durante la interfase de manera que en las mujeres heterocigotas el alelo normal se expresa en algunas células y el deficiente en otras, por lo que varias posibilidades se pueden presentar:

- a) Heterocigotas con valores muy bajos de actividad enzimática de G6PD; en este caso se supone que en la serie eritroide la inactivación puede haber ocurrido en la mayoría de las células portadoras del gen normal.
- b) Heterocigotas con valores intermedios de actividad de G6PD, en este caso se supone que la inactivación

pudo haber ocurrido en proporciones iguales entre -- células portadoras del gen mutante y portadoras del gen normal.

- c) Heterocigotas con valores normales de actividad de G6PD, en este caso se supone que la inactivación -- pudo haber ocurrido en la mayoría de las células -- portadoras del gen mutante.

Entonces de las tres técnicas metodológicas aquí empleadas junto con el análisis del árbol genealógico la más recomendable para el diagnóstico de las portadoras de la deficiencia de G6PD son las técnicas de actividad enzimática de G6PD en -- eritrocitos y la citoquímica de actividad de G6PD en eritrocitos ligada a MTT-tetrazolium.

Es conveniente contar con métodos sensibles para la identificación de deficientes de G6PD, portadoras y familiares -- quienes nunca han presentado antecedentes de anemia hemolítica para asesoría genética y prevención en relación a la ingestión de drogas que puedan inducir hemólisis en este tipo de individuos.

XII CONCLUSIONES.

El diagnóstico de los varones deficientes de G6PD se logró realizar en el 100% con cualquiera de las tres técnicas empleadas en este estudio, aunque se recomienda actividad enzimática de G6PD en eritrocitos ya que utiliza un mínimo de muestra de sangre 0.1 ml y se realiza en un periodo de tiempo de 30 min.

La detección de heterocigotas de G6PD, con la técnica -- de reducción de metahemoglobina de Brewer sólo se logró el 30% de estas; con la de actividad enzimática de G6PD en eritrocitos el 100% y con la citoquímica de actividad de G6PD en eritrocitos ligada a MTT-tetrazolium el 90%, mostrando que no todas las portadoras pueden ser detectadas por uno solo de los métodos disponibles en el laboratorio, por lo que se recomienda un análisis del árbol genealógico para posibilidades de heterocigocidad en combinación con métodos específicos para la determinación en la enzima G6PD, como la de actividad enzimática de G6PD y la citoquímica ligada a MTT-tetrazolium que mide dos poblaciones de eritrocitos coexistiendo en las heterocigotas.

La detección de hemicigotas y portadoras es importante para fines de asesoría genética en relación a riesgos de recurrencia del padecimiento con fines preventivos en cuanto a la ingesta de drogas potencialmente hemolíticas en individuos -- afectados de G6PD.

XIII REFERENCIAS.

- Beutler, E. Dern, R. y Alving, A. 1954. The hemolytic effect of primaquine.IV. The relationship of cell age to hemolysis. J.Lab.Clin.Med. 44:439
- Beutler, E. 1959. The hemolytic effect of primaquine and related comoun. Blood. 14:103-107.
- Beutler, E. Yeh, M. y Fairbanks, V. 1962. The normal human females as a mosaic of X-chromosome activity: studies using the gene for G6PD deficiency an a marker. Proc.Natl.Acad. Sci.USA. 48:9-15.
- Beutler, E. y Baluda, M. 1964. The separation of glucosa-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes from the blood of heterocygotes for glucosa-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Lancet. 1:184-196.
- Beutler, E. 1966. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency In the metabolic basis of inherited disease. Stanbury, J. Wyngaarden, J. y Fredrickson, J. McGraw Hill. 1980. New York 1060.
- Beutler, E. Mathai, C. y Smith, J. 1968. Biochemical variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. Blood. 31:131-142.
- Beutler, E. 1970. L-Dopa y Favismo. Blood. 36:523-530.
- Beutler, E. y Yoshida, A. 1973. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. Ann. Hum. Genet. 37:151-154.
- Beutler, E. Jhonson, C. Powars, D. y West, C. 1974. Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in sickle cell disease. N. Engl. J. Med. 290:826-829.

- Brewer, G. Alving, R. Army, V. y Alving, S. 1962. The methemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. *J.A.M.A.* 50:386-388.
- Brewer, G. 1969. Erythrocyte metabolism and function: hexokinase inhibition by 2-3-diphosphoglycerate and interaction with ATP and Mg^{+2} . *Biochem. Biophys. Acta.* 192:157-167.
- Carson, P. Flanagan, C. Lakes, C. y Alving, A. 1956. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 124: 484-489.
- Cohen, G. y Hochstein, P. 1961. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Science.* 134:1756-1762.
- Cohen, G. y Hochstein, P. 1964. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. *Biochemistry.* 3: 845-848.
- De Mars, R. 1968. A temperature sensitive glucose-6-phosphate dehydrogenase in mutant cultured human cells. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 61:562-569.
- Dern, R. Beutler, E. y Alving, A. 1954. The hemolytic effect of primaquine. *J. Lab. Clin. Med.* 43:303-308
- De Robertis y De Robertis, 1980. Biología Celular y Molecular. 10a. Edición. ATENEO. Argentina. Buenos Aires. 613.
- Hamerton, J. 1971. Human cytogenetics. Academic Press Inc. New York. 2485.
- Hardisty, R. y Weatherall, D. 1974. Blood an its disorders. Blackwell Scientific publications. Melbourne. 526.

- Hers, P. Kaplan, E. y Scheye, E. 1970. Diagnosis of erythrocytes glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency negro male despiste hemolytic crisis. *Blood*. 35: 90-93.
- Keitt, A. 1982. Diagnostic strategy in a suspected red cell enzymopathy. *Clin. Haematology*. 10: 3-30
- Kirkman, H. Riley, H. y Crowell, B. 1960. Different enzymatic expresions of mutants of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 46:938-950.
- Kirkman, H. 1962. Glucose-6-phosphate from human erythrocytes Furter purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 237: 2365-2370.
- Kirkman, H. y Hendrickson, E. 1963. Sex-linked electrophoretic difference in glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Amer. J. Human Genet.* 15:241-251.
- Lehninger, A. 1982. Bioquímica. 2a. Edición. Omega. Barcelona pp.1117.
- Lisker, R. 1976. Aspectos hereditarios y epidemiológicos de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa eritrocitaria en México. *Gaceta Médica. Mex.* 3:454-458.
- Marks, P. y Gross, R. 1959. Erythrocytes glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Evidence of differences between negroes and caucasians with respect to this genetically determined trait. *J. Clin. Invest.* 38:2253-2258.
- Matthay, K. y Mentzer, W. 1981. Erythrocyte enzymopathies in the new born. *Clin. Haematology*. 10:31-35.
- Mckusik, V. 1986. Mendelian inheritance in man. The Jones Hopkins University Press. Baltimore and London. pp 1740.

- Murphy, J. 1960. Erythrocyte metabolism. Glucose metabolism and pathways. J. Lab. Clin. Med. 55:286-302.
- Nance, A. 1964. Two red cell populations in human females heterozygous for G6PD deficiency. Lancet. I:329-238.
- Niv, J. Hochberg, A. y Dimaut, E. 1966. The metabolism of glutathione of human blood. Biochem. Biophys. Acta. 127:26-40.
- Ohno, S. 1967. Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer Verlag. New York. pp 1397.
- Persico, M. Toniolo, D. Nobile, C. y Luzzatto, L. 1981. cDNA sequences of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in PBR₃₂₂. Nature. 294:778-804
- Piomelli, S. Reindorf, C. Arzanian, M. y Corash, L. 1972. Clinical and biochemical interactions of glucose-6-phosphate deficiency and sickle-cell anemia. New Englan. J. Med. 287: 214-220.
- Porter, I. Boyer, S. Watson, W. Adam, A. y Simiscalco, M. 1964. Variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in different population. Lancet. 12:895-899.
- Ross, J. 1963. Deficiency activity of DPNH-depend methemoglobin diaphorase in cord blood erythrocytes. Blood. 21:51-52.
- Sears, D. George, J. McCurdy, P. y Couradm, M. 1969. Primaquine sensitivity in caucasians: hemolytic induced by primaquine in G6PD deficiency subjets. J. Lab. Clin. Med. 70:80-86.
- Stanbury, J. Wyngarden, J. y Fredrickson D. 1972. In the metabolic basis of inherited Disease. McGraw-Hill, New York, 1080.
- Szeinberg, A. y Marks, P. 1961. Substances stimulating gluco-

- se catabolism by the oxidative reactions of the pentose phosphate pathway in human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 40: 914-920.
- Thompson, M. 1965. Genetic consequences of heteropyknosis of an X-chromosome. *Canad. J. Genet. Cytol.* 7:202-213
 - Thompson, M. and Thompson, W. 1975. *Genética Médica*. 2a. Ed. Salvat. España. pp 393.
 - Tjio, J. y Levan, A. 1956. The chromosome number in man. *Hereditas*. 42:1-6.
 - Vaca, G. Ibarra, B. Hernández, A. Olivares, N. Medina, C. Sánchez, J. Wunsch, C. Godínez, B. Cantó, J. 1981. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and abnormal hemoglobins in Mexican newborns with jaundice. *Rev. Invest. Clin. (Mex)* 33:259-61.
 - Vaca, G. 1982. Variante Guadalajara de G6PD. *Human Genet.* 71: 82-85.
 - Vaca, G. 1985. G6PD Morelia. G6PD Jalisco, 2 nuevas variantes mexicanas. *Human Genet.* 61: 175-176.
 - Virgil, F. Fairbanks, M. y Lampe, L. 1968. A tetrazolium-linked cytochemical method for estimation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes: applications in the study of heterocigotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood*. 31:589-612.
 - Virgil, F. Fairbanks, M. y Fernández, M. 1969. The identification of metabolic errors associated with hemolytic anemia. *J.A.M.A.* 208:316-320.
 - Wayne, W. 1980. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa. Mex. pp.485.

- William, J. Beutler, E. Erslev, J. y Wayne, R. 1983. Hematología. 2a. Ed. Salvat. Mex. pp 1976.
- Wintrobe, M. Lee, G. Boggs, D. Birthelli, T. Athens, J. y Foerster, J. 1974. Clinica hematológica. 7a. Ed. Lea an Febiger. Philadelphia. pp 1986.
- Yoshida, A. 1967. A single aminoácido substitución (asparagine to aspartic acid) betwen normal (B^+) and common negro variant (A^+) of human G6PD. Science. 57:835-840.
- Yoshida, A. 1968. Subunit structure of human G6PD and its genetic implications. Biochem. Genet. 2: 237-242.
- Yoshida, A. 1970. Aminoacid substitucion (Histidine to tirosine in a glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Hectoen) associated with overproduction. J. Bol. Biol. 52:483-485.
- Yoshida, A. 1973. a. Change of activity and substrate specificity of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by oxidation. Biochem. Biophys. 159:82-99.
- Yoshida, A. 1973.b. Hemolytic anemia and G6PD deficiency. Blood. 41:877-885.