

N.º 70
DEL



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"TRASTORNOS METABOLICOS EN LA VIA
HEXOSA MONOFOSFATO EN ERITROCITO"

TRABAJO ESCRITO

Que para obtener el Titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

ROSARIO HERNANDEZ MURILLO



1992

FALLA DE ORIGEN



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

	Página
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	2
I. VIA HEXOSA MONOFOSFATO	5
II. PANORAMICA DE TRASTORNOS QUE INVOLUCRAN ESTA RUTA	15
III. DEFICIENCIA DE GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA. ANTECEDENTES HISTORICOS	19
IV. TRASTORNOS DE LA SINTESIS DEL GLUTATION	36
V. DEFICIENCIA DE LA METAHEMOGLOBINA REDUCTASA	38
VI. METODOS	42
VII. CONCLUSIONES	51
VIII. BIBLIOGRAFIA	52

INTRODUCCION.

En el metabolismo del eritrocito la vía hexosa monofosfato es muy importante, debido a que su función principal es la reducción del NADP^+ (fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido oxidado), ya que es evidente que la cantidad de glucosa que entra en esta vía se regula por la cantidad de NADP^+ que resulta de la oxidación del NADPH (fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido). El NADPH se utiliza en la reducción del glutatión oxidado (GSSG), que se forma al reducir los componentes oxidados del eritrocito, como metahemoglobina, proteínas y además el peróxido de hidrógeno, por lo tanto también la síntesis y el metabolismo del glutatión están relacionados con ésta vía. Otra enzima importante en la reducción de la metahemoglobina es la metahemoglobina reductasa, llamada también NADH-diaforasa (nicotinamida-adenín-dinucleótido-diaforasa).

Un grupo diverso de anemias hemolíticas congénitas depende de deficiencias enzimáticas intraeritrocíticas. El prototipo de estas anemias y la más frecuente es la causada por deficiencia funcional de G6PD. El gen de la G6PD está situado en el cromosoma X y hay polimorfismo importante en este locus. Este trastorno permanece asintomático a menos que los eritrocitos se sometan a lesión oxidante por exposición a determinados fármacos, infecciones o algunos alimentos o trastornos metabólicos. El efecto principal de estos agentes causales es oxidar la hemoglobina a metahemoglobina, la cual precipita dentro del eritrocito en forma de inclusiones llamados cuerpos de Heinz, haciéndolo menos deformable y más susceptible de

ser fagocitado por el sistema mononuclear fagocítico, produciendo el cuadro de anemia hemolítica. En la variante G6PD A(-), que es la más común, los eritrocitos viejos son los más susceptibles a la lisis. Conforme la médula ósea compensa la pérdida por reproducción de eritrocitos jóvenes, la hemólisis tiende a ceder, incluso si continúa la exposición medicamentosa.

En algunos casos, las deficiencias enzimáticas eritrocíticas o las posibles anomalías enzimáticas o no se acompañan con seguridad de anemia hemolítica o bien no causan claramente síndromes hemolíticos significativos. Por ejemplo, la metahemoglobinemia, que puede originarse como resultado de una deficiencia hereditaria de NADH-diaforasa, referida como metahemoglobinemia congénita debida a deficiencia de NADH-diaforasa.

GENERALIDADES.

La vida media del eritrocito es de 120 ± 6 días, durante este tiempo efectúa 1.7×10^5 ciclos circulatorios. En cada ciclo el eritrocito pasa a través de regiones de alta turbulencia, capilares y ranuras esplénicas muy estrechas, donde son verificados por los macrófagos esplénicos cuidadosamente, célula por célula, la identidad y aptitud de cada eritrocito. En este tiempo el eritrocito va envejeciendo gradualmente, perdiendo sus propiedades de elasticidad y deformabilidad debido a que disminuye la actividad de las enzimas alterándose el metabolismo del eritrocito, en estas condiciones, él es atrapado por el sistema mononuclear fagocítico.

Metabolismo del eritrocito.- El paso de la glucosa al interior del eritrocito a través de la membrana no es contra un gradiente de concentración, ni requiere de energía, ni depende de la insulina sino que al parecer sólo requiere de un transportador de membrana, el cual se puede combinar con la glucosa y otros azúcares de forma reversible. Como la síntesis y la utilización del glucógeno está balanceada, no hay acumulación importante de glucógeno dentro de la célula.

El eritrocito no posee mitocondrias, por lo que no se efectúa el ciclo del ácido cítrico, ni la fosforilación oxidativa. La energía la obtiene de la glucólisis anaerobia principalmente.

Para el metabolismo de la glucosa el eritrocito cuenta con

dos vías metabólicas principalmente:

1.- La vía anaeróbica de Embden-Meyerhof, con producción neta de dos moléculas de ATP, el cual es necesario para las reacciones celulares que requieren energía: a) Mantener el hierro de la hemoglobina en la forma divalente, b) El transporte activo de los cationes Na^+ y K^+ a través de la membrana, c) los grupos sulfhidrilos de las enzimas eritrocíticas y de la hemoglobina en la forma activa, es decir, en la forma reducida, d) El mantenimiento de la deformabilidad de la membrana y la preservación de la forma bicóncava de la célula. (Fig. 1).

2.- La otra vía metabólica es la vía oxidativa directa, vía del ácido fosfogluconico, la vía de la pentosa fosfato o vía de la hexosa monofosfato.

La importancia de esta vía radica en que se obtienen equivalentes reductores, necesarios para proteger al eritrocito del daño oxidativo que puede ocasionar cambios en la estructura y función de la hemoglobina, cambios que pueden ser irreversibles.

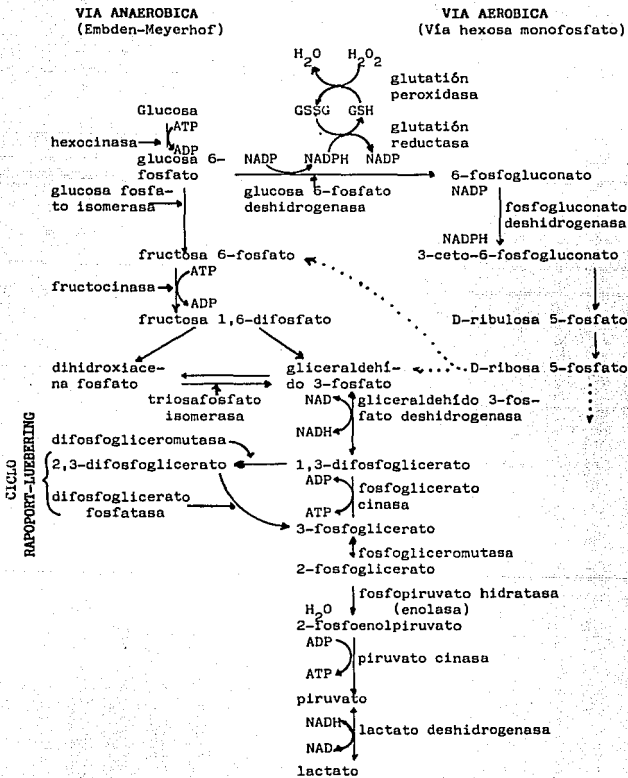


Fig. 1. Vías principales del metabolismo de la glucosa en los eritrocitos..

I. VIA HEXOSA MONOFOSFATO.

Normalmente se metaboliza en forma aeróbica aproximadamente un 10% de la glucosa eritrocitaria. En este proceso tres moléculas de glucosa 6-fosfato dan origen a tres moléculas de CO_2 y tres residuos de cinco carbonos, éstos se vuelven a reestructurar para regenerar dos moléculas de glucosa 6-fosfato y una de gliceraldehído 3-fosfato. Dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato pueden formar una molécula de glucosa 6-fosfato por reacciones que son esencialmente una reversión de la glucólisis.

La vía hexosa monofosfato puede responder de la oxidación completa de la glucosa. En esta vía el aceptor de hidrógeno es el fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido (NADP^+) generándose el fosfato de nicotinamida-adenín dinucleótido reducido (NADPH), lo cual ocurre en las dos primeras reacciones por medio de las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, con la producción de CO_2 .

La vía hexosa monofosfato se puede dividir en dos fases, en la primera fase se produce la pentosa ribulosa 5-fosfato por deshidrogenación y descarboxilación de la glucosa 6-fosfato (Fig. I.1).

La glucosa 6-fosfato se deshidrogena en el carbono 1 por acción de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) conocida también como "Zwischenferment", formándose la 6-fosfogluconolactona. Esta reacción se inhibe por ciertos fármacos como las sulfonamidas y la quinacrina.

La 6-fosfogluconolactona la hidroliza la enzima gluconolacto-

na hidrolasa formándose el 6-fosfogluconato.

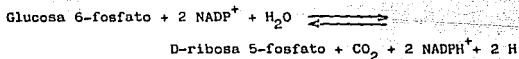
el equilibrio global de las dos reacciones se desplaza en la formación del NADPH.

En el siguiente paso oxidativo, el 6-fosfogluconato es deshidrogenado por acción de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa, la cual también requiere NADP^+ como aceptor de electrones y además iones Mg^{2+} , formándose la cetopentosa D-ribulosa 5-fosfato y otra molécula de NADPH.

En la segunda fase, la D-ribulosa 5-fosfato puede servir como sustrato para dos enzimas diferentes.

La ribosa fosfato isomerasa convierte la D-ribulosa 5-fosfato en la correspondiente aldopentosa, la D-ribosa 5-fosfato, reacción análoga a la interconversión de la fructosa 6-fosfato y la glucosa 6-fosfato en la vía de Embden-Meyerhof.

En algunas condiciones metabólicas, la ruta del fosfogluconato finaliza en este punto y la ecuación global se escribe como:



La otra enzima que puede actuar sobre la D-ribulosa 5-fosfato es la ribulosa fosfato-3-epimerasa formando otra cetopentosa, la D-xilulosa 5-fosfato.

La siguiente enzima de la vía hexosa monofosfato es la trans-cetolasa, que transfiere el grupo glicolaldehído ($\text{HO-CH}_2\text{-CO-}$), primero desde la D-xilulosa 5-fosfato al pirofosfato de tiamina, nece

sario como coenzima, formándose el glicolaldehído activo; además de esta coenzima se requieren iones Mg^{2+} , el radical glicolaldehído es transferido a la D-ribosa 5-fosfato para formar la D-sedoheptulosa 7-fosfato, fosfato de un azúcar de 7 carbonos; y el D-gliceraldehído 3-fosfato, que es un intermediario de la glucólisis.

Por lo tanto la transcetolasa transfiere la unidad de dos carbonos que contiene los carbonos 1 y 2 de una cetosa al carbono aldehídico de una aldosa, es decir, se transforma una cetosa en una aldosa con dos carbonos menos y una aldosa en una cetosa con dos carbonos más. Durante estas transformaciones no aparece glicolaldehído libre.

La transaldolasa es la siguiente enzima en esta vía, esta enzima transfiere el grupo dihidroxiacetona, carbonos 1, 2 y 3 de la D-sedoheptulosa 7-fosfato al D-gliceraldehído 3-fosfato, formándose D-fructosa 6-fosfato y quedando D-eritrosa 4-fosfato, una aldosa de 4 carbonos.

Una reacción importante es la que cataliza la transcetolasa en la cual la D-xilulosa 5-fosfato es el donador del grupo glicolaldehído y la D-eritrosa 4-fosfato formada anteriormente que actúa como aceptor, reaccionan para producir D-fructosa 6-fosfato y el D-gliceraldehído 3-fosfato. Dos intermediarios de la ruta del fosfogluconato pueden convertirse reversiblemente en dos intermediarios de la ruta glucolítica.

Debido a que la reacción que cataliza la enzima fosfogluconosa isomerasa es espontáneamente reversible, de tal manera que la fruc

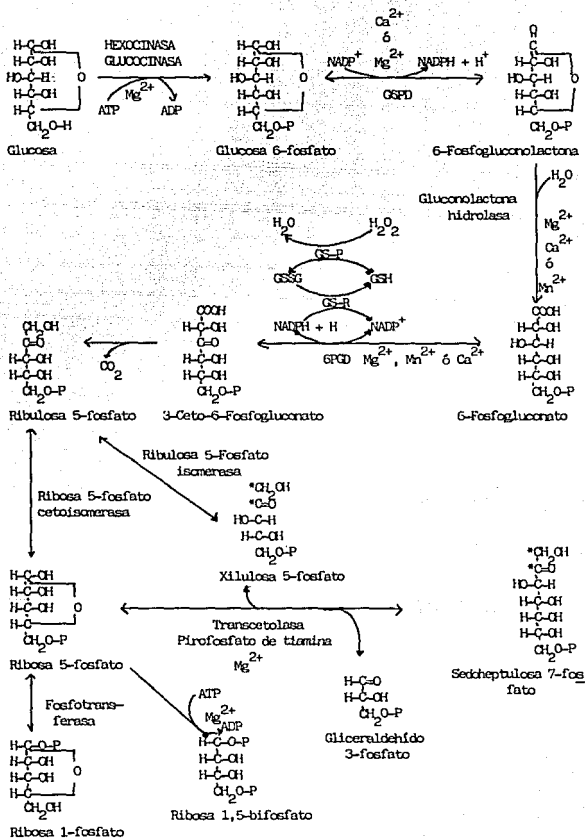


Fig. I-1. Via hexosa monofosfato

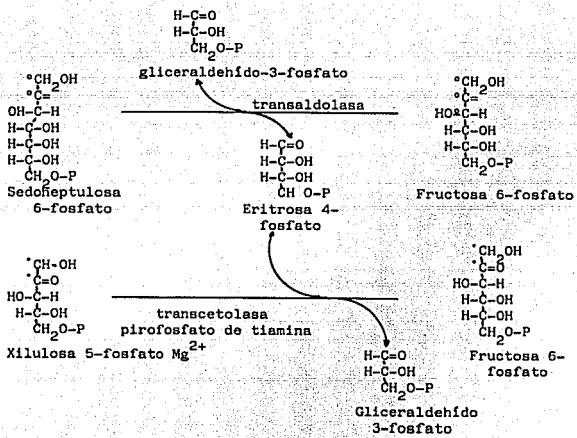


Fig. I-1. Via hexosa monofosfato (Cont.).

tosa 6-fosfato se puede convertir en glucosa 6-fosfato, resulta posible que se renueve el ciclo a través de la vía hexosa monofosfato.

La vía hexosa monofosfato no produce enlaces fosfato de alta energía. Su función principal parece ser la reducción del NADP^+ , por lo que la cantidad de glucosa que entra a la vía hexosa monofosfato, está regulada por la cantidad de NADP^+ que resulta de la oxidación del NADPH .

La enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la enzima que más se ha investigado. Esta cataliza la oxidación de la glucosa 6-fosfato (G6P) dando la 6-fosfogluconolactona que rápidamente se transforma en 6-fosfogluconato (6PG). Durante la reacción el NADP^+ se reduce a NADPH . La enzima se purifica en el estado cristalino, actualmente se dispone de amplia información respecto a la especificidad del sustrato, constante de Michaelis y curvas del pH óptimo. El peso molecular de la enzima altamente purificada es de 240 000 Daltons, pero en su estado natural es probablemente alrededor de 105 000 Daltons.

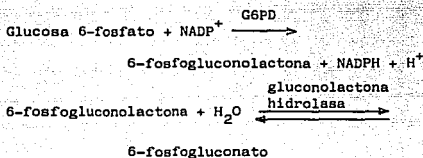
La G6PD se disocia en subunidades de tamaño pequeño (40 000 ó 50 000 Daltons) en la ausencia de NADP^+ . La enzima se inhibe fuertemente con cantidades fisiológicas de NADPH y en menor medida por ATP. Su actividad media normal es aproximadamente de 8.3 U.I./g de hemoglobina. ($V_{\text{máx}}$ a 37°C, pH 7.8).

Usando la prueba estándar de la OMS, donde las actividades de la G6PD y la 6PGD se miden juntas a 25°C, la actividad por término

medio normal es de 6.6 U.I./g de hemoglobina.

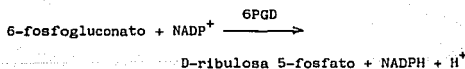
La enzima va perdiendo su actividad a medida que envejecen los eritrocitos. En presencia de su coenzima, el NADP^+ , la enzima se desplaza electroforéticamente como una banda principal única.

Se conocen muchas mutaciones que influyen sobre la actividad, estabilidad y propiedades cinéticas de la enzima.

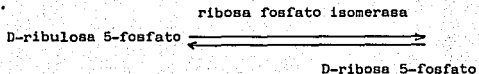


La enzima fosfogluconato deshidrogenasa cataliza la oxidación del fosfogluconato a ribulosa 5-fosfato con la liberación de CO_2 en presencia de NADP^+ que se reduce a NADPH. Tiene una actividad normal promedio aproximadamente de 8.8 U.I./g de hemoglobina.

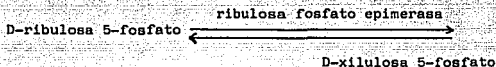
($V_{\text{máx.}}$ a 37°C , pH 7.8). Tiene movilidad electroforética variable.



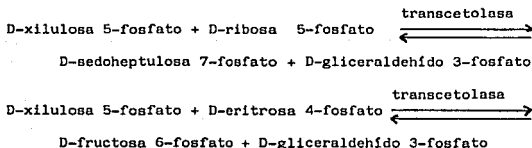
La ribosa fosfato isomerasa interconvierte la ribulosa 5-fosfato a ribosa 5-fosfato. Es una enzima muy dinámica, su actividad es de aproximadamente 200 U.I./g de hemoglobina. ($V_{\text{máx.}}$ a 37°C , pH 7.6).



La ribulosa fosfato epimerasa actúa sobre la ribulosa 5-fosfato para producir xilulosa 5-fosfato. No se ha elucidado exactamente la actividad de esta enzima, aunque parece menos activa que la ribosa fosfato isomerasa.

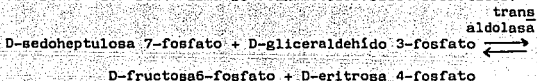


La transcetolasa transfiere dos átomos de carbono de la xilulosa 5-fosfato a la ribosa 5-fosfato, formándose un azúcar de tres carbonos, el gliceraldehído 3-fosfato y la sedoheptulosa 7-fosfato un azúcar de siete carbonos, además puede catalizar la reacción entre la eritrosa 4-fosfato y la xilulosa 5-fosfato produciendo fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, en presencia de la coenzima pirofosfato de tiamina. Tiene una actividad de 0.2 U.I./g de hemoglobina. ($V_{\text{máx.}}$ a 37°C, pH 7.6). Su actividad se utiliza como índice de una aportación adecuada de tiamina en la nutrición. Se estudia por métodos electroforéticos.



La transaldolasa cataliza la conversión de sedoheptulosa 7-fosfato y gliceraldehído 7-fosfato en eritrosa 4-fosfato y fructo-

sa 6-fosfato, lo cual proporciona otro medio para los ajustes moleculares que se llevan a cabo en la transformación del azúcar de cinco carbonos que se produce en el paso de la fosfogluconato deshidrogenasa hacia los intermediarios de la vía de Embden-Meyerhof. Para el estudio de esta enzima se usan métodos electroforéticos.



Parece ser que la actividad de la vía hexosa monofosfato está regulada por la concentración de glutatión oxidado (GSSG), ya que al aumentar la concentración de GSSG, se produce un aumento en la cantidad de glucosa que entra en la vía hexosa monofosfato, produciéndose NADPH, que va a reducir al GSSG, para obtenerse glutatión reducido (GSH), y a través de este mecanismo preservar las enzimas vitales y la hemoglobina. El GSH también reduce pequeñas cantidades de hemoglobina oxidada, la metahemoglobina. También aumenta la actividad de la vía hexosa monofosfato cuando el eritrocito se expone a una sustancia oxidante. Por lo tanto el GSH es un componente clave del sistema que se encarga de proteger a la hemoglobina, las enzimas y membrana del eritrocito de los efectos nocivos de la oxidación. Además del NADPH y el GSH, hay otros componentes como son: la G6PD, la glutatión reductasa (GSH-R), la glutatión peroxidasa (GSH-P), la glutatión sintetasa (GSH-S) y la metahemoglobina reductasa. De las enzimas anteriores, las de la síntesis y del metabolismo del glutatión, son esenciales para reciclar el NADPH a

NADP , generando así el cofactor que permita funcionar a las deshidrogenasas de la vía hexosa monofosfato.

II. PANORAMICA DE TRASTORNOS QUE INVOLUCRAN ESTA RUTA.

La vía hexosa monofosfato genera NADPH en las dos primeras fases, a través de las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa. La producción de NADPH está ligada a la reducción del glutatión y a través de este mecanismo a la preservación de las enzimas vitales y de la hemoglobina del eritrocito. Pequeñas cantidades de hemoglobina oxidada, metahemoglobina, son reducidas por el glutatión reducido. La actividad de la vía hexosa monofosfato aumenta cuando la célula se expone a una sustancia oxidante. Si en esta vía metabólica hay deficiencia de alguna de las enzimas que dan lugar al NADPH, el glutatión oxidado (GS₂), producido en la reducción de la metahemoglobina, no se puede reducir y la hemoglobina oxidada da como resultado una molécula desnaturalizada la cual precipita formando los cuerpos de Heinz que se adhieren a la membrana produciendo rigidez y tendencia a la hemólisis dando lugar a un cuadro hemolítico. La deficiencia moderada de alguna enzimaq de esta vía puede no asociarse con anemia, aunque, si los eritrocitos son expuestos a un agente oxidante, puede aparecer un episodio de anemia hemolítica aguda.

Los síndromes de anemia hemolítica pueden estar asociados con deficiencias a nivel enzimático tanto de la vía hexosa monofosfato como del metabolismo del glutatión.

Estas deficiencias enzimáticas pueden originar dos tipos de síndromes hemolíticos:

- 1). Los que su patogenia se debe en gran parte a la incapaci-

dad para proteger contra la desnaturalización oxidativa de la hemoglobina.

2). Los asociados con anemia hemolítica no esferocítica, sin desnaturalización de la hemoglobina como característica principal.

Aunque esta clasificación no es completa, en el primer grupo se incluyen las enzimopatías relacionadas con la vía hexosa monofosfato, el sistema $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, la destrucción de los peróxidos y la síntesis y reducción del glutati6n. (Fig. II-1).

Las enzimas claramente asociadas con anemia hemolítica esencial que se encuentran en la vía hexosa monofosfato y en el metabolismo del glutati6n son la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la glutati6n peroxidasa (GSH-P), la glutati6n reductasa (GSSG-R); la deficiencia de gama-glutamyl-cisteina sintetasa (γ -GC-S) y la glutati6n sintetasa (GSH-S), dan lugar a una deficiencia de GSH.

Las enzimas relacionadas con la vía hexosa monofosfato asociadas con anemia hemolítica esencial o su asociaci6n con deficiencia incierta son: la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) y la glutati6n peroxidasa (GSSG-P).

Por ensayo de eritrocitos, se encuentran deficiencias enzimáticas como NADH-metahemoglobina reductasa y NADPH-metahemoglobina reductasa.

A excepci6n de la deficiencia de G6PD, las enzimopatías restantes de la vía hexosa monofosfato y las del metabolismo del GSH, son excepcionales y su expresividad clínica suele ser superponible a la deficiencia de G6PD, es decir, se presenta hemólisis general-

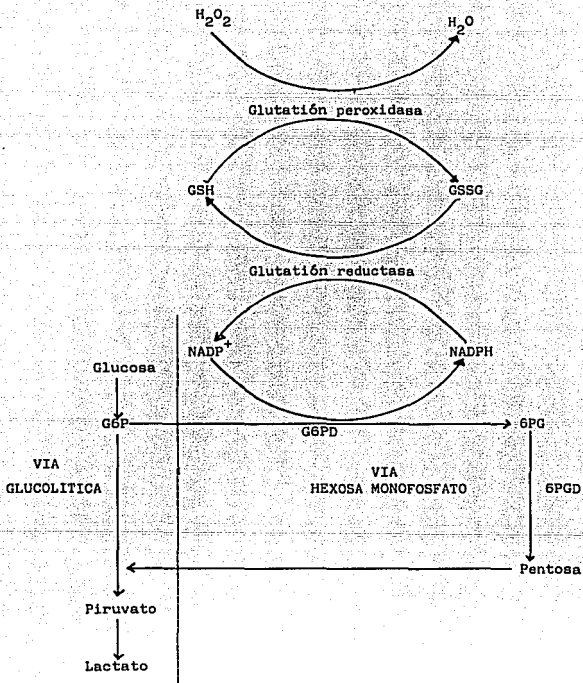


Fig. II-1. Papel de la G6PD en el mantenimiento del glutati6n en estado reducido, a trav6s de la reducci6n del NADP⁺, haciendo posible as6, la reducci6n del glutati6n oxidado (GSSG) y el papel del GSH en la conjugaci6n con la glutati6n peroxidasa en la detoxificaci6n del per6xido.

mente aguda, desencadenada por agentes oxidantes. No obstante, el síndrome hemolítico es casi siempre crónico y en algunos casos se acompaña de retraso mental y acidosis metabólica, con eliminación urinaria del ácido piroglutámico (oxoprolinuria). Aunque con ciertas variaciones de un paciente a otro, la anemia suele ser poco intensa y puede agravarse por efecto de sustancias oxidantes.

La deficiencia de GSSG-R, se observa relativamente frecuente en el curso de diversas enfermedades, ahora se sabe que en realidad se debe a una deficiencia de un cofactor de la enzima, el flavín-adenina-dinucleótido (FAD), el cual depende del metabolismo y aporte en la dieta de la riboflavina (Vitamina B₁₂); puede haber disminución de FAD en una variedad de estados patológicos e incluso en algunos sujetos aparentemente normales. Por esto, la medida de su actividad enzimática puede ser empleada en la práctica, como una forma indirecta de conocer la concentración de vitamina B₁₂ en el organismo.

III. DEFICIENCIA DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

ANTECEDENTES HISTORICOS.

Hace mucho tiempo ya se sabía que los componentes antipalúdicos de la 8-aminoquinoleína, producían anemia hemolítica en ciertos individuos susceptibles. Fué descrita por primera vez en trabajadores panameños de las plantaciones. Después, así como este caso, se observaron otros en todo el mundo.

Fuó hasta principios de 1950, que se hicieron investigaciones acerca del efecto hemolítico de un fármaco antipalúdico, la primaquina, dando como resultado la deficiencia de G6PD. Los intentos para determinar por qué sólo algunos individuos eran susceptibles al efecto hemolítico de estos fármacos, generalmente fueron infructuosos. Se pudo estudiar por primera vez esta reacción hemolítica en condiciones muy controladas, durante la guerra de Corea. Usando la nueva técnica de marcaje con cromo radiactivo (^{51}Cr), se demostró que la sensibilidad al fármaco era debida a una anomalía intrínseca del eritrocito y que la anemia hemolítica era autolimitada, es decir, que después del episodio hemolítico inicial el nivel de la hemoglobina volvía a la normalidad, aún si se continuaba administrando la misma dosis de primaquina que había provocado inicialmente la hemólisis. Si se transfundían hematíes de pacientes que habían sufrido una hemólisis y que continuaban recibiendo el fármaco, a un paciente sensible a la primaquina, estas células eran insensibles a la hemólisis; y al contrario, si se transfundían eritrocitos de un paciente sensible a la primaquina a un individuo

tratado previamente con este fármaco, estos eritrocitos se destruyan rápidamente. Por lo tanto, al parecer los eritrocitos de los individuos sensibles a la primaquina eran heterogéneos con respecto a la sensibilidad a los fármacos y estos eritrocitos se destruyan rápidamente después de la administración del fármaco, mientras persistía una población no sensible. Al marcar los eritrocitos con --hierro radiactivo (⁵⁹Fe) se demostró que esta sensibilidad estaba en función de la edad del eritrocito, lo que orientó los estudios hacia el metabolismo del eritrocito, ya que se sabía que la actividad de ciertas enzimas y procesos metabólicos disminuían a medida que envejecían los eritrocitos. Se encontró que las células sensibles a la primaquina tenían un nivel bajo de glutatión reducido, - que impedía a la célula protegerse del estrés oxidativo. Finalmente al estudiar las vías de reducción del glutatión del eritrocito, se encontró una deficiencia de la enzima G6PD.

Para hacer frente a todos los daños externos e internos a que está expuesto el eritrocito, éste tiene un metabolismo fuerte y simplificado que debe mantener y proteger la integridad y funcionalidad de la célula de agresores físicos y químicos, sobre todo, de la oxidación de los grupos sulfhidrilos, ya que muchas funciones bioquímicas dependen críticamente de un número pequeño de tioles esenciales.

Los eritrocitos utilizan casi exclusivamente el glutatión reducido, para neutralizar la tioloxidación. Como el glutatión oxidado es reducido metabólicamente por el fosfato de nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADPH), y la primera fuente principal de NADPH es la reacción que cataliza la enzima G6PD, por lo tanto esta enzima ocupa una posición importante para asegurar la estabilidad y viabilidad del eritrocito. Como muchas enzimas, la G6PD sólo utiliza un bajo porcentaje de su capacidad máxima de actividad, lo que explica por qué cuando las variantes bajan su actividad dando un bajo porcentaje del rango normal, el funcionamiento del eritrocito es casi normal y sólo en condiciones de estrés particular se puede afectar la viabilidad y/o funciones del eritrocito afectado.

Normalmente en las células jóvenes, la G6PD está más elevada que en las células viejas, por lo que en las personas con deficiencia en G6PD, las células más viejas son las que se destruyen.

La susceptibilidad hemolítica de las personas deficientes de G6PD puede aumentar considerablemente durante una enfermedad o a

consecuencia de la exposición a varios fármacos oxidantes como la primaquina, sulfamidas, nitrofurantoínas y aminoquinolonas.

La demanda aumentada de equivalentes reductores, como la inducida por estrés oxidativo, ya sea a nivel del sistema $NADP^+/NADPH$ o del sistema $GSH/GSSG$, elevaría la saturación de $G6PD$ por $NADP^+$, aumentando así la actividad intracelular de la $G6PD$ y el ciclo de la hexosa monofosfato. El fracaso de los eritrocitos deficientes de $G6PD$ para hacer frente al agotamiento agudo o crónico de equivalentes reductores, tales como $NADPH$ y GSH , representa el evento inicial que lleva al daño y destrucción del eritrocito.

La deficiencia de $G6PD$ es la enzimopatía más frecuente y por lo tanto la más estudiada, tanto clínica como molecularmente en un elevado número de grupos étnicos diferentes. Se ha encontrado en la raza blanca sobre todo en los sefarditas y otros grupos étnicos del litoral mediterráneo, indios americanos y orientales; con mayor frecuencia en la raza negra, alrededor del 10% de los negros varones de E. U. Esta carencia está extendida por el mundo entero, afecta del 2 - 3% de la población mundial y es responsable de casi un tercio de los casos de anemia hemolítica no esferocítica, crónica o recidivante. Se caracteriza por una concentración deficiente de $G6PD$ en eritrocitos, pero concentración normal en leucocitos y plaquetas.

Se puede presentar una forma más grave, cuando hay deficiencia de $G6PD$ en leucocitos y eritrocitos, lo cual ocasiona mayor anemia por sensibilidad a las habas y a diversos medicamentos; ade-

más se han encontrado diferencias en la gravedad de la enfermedad clínica y en el grado de depresión de los niveles enzimáticos en los eritrocitos y leucocitos.

La relación entre la deficiencia de G6PD y el paludismo endémico es un hecho bien conocido, siendo precisamente esta enfermedad la que ha ejercido una presión genética positiva en favor de la prevalencia de la enzimopatía. Esta elevada frecuencia del déficit de G6PD se acompaña además de un acusado pleomorfismo genético que es expresión de un gen situado en el cromosoma X. Su transmisión hereditaria se halla por tanto ligada al sexo y la expresividad clínica es completa en varones hemicigotos y mujeres homocigotas. En una mujer heterocigota hay una expresión parcial, tiene dos poblaciones de eritrocitos, una normal y otra deficiente.

Debido al fenómeno de inactivación cromosómica durante el desarrollo embrionario (fenómeno de Lyon), el mecanismo generalmente equilibrado (50% de actividad) de los sujetos heterocigotos, puede presentar un desequilibrio hacia el cromosoma X normal (100% de actividad) o hacia el portador de la mutación (0% de actividad). En el primer caso, la detección del déficit resulta totalmente imposible, a excepción de que el estudio familiar demuestre que se trata de un portador forzoso y en el segundo se observa un comportamiento clínico superponible al estado homocigoto.

Los estudios de caracterización molecular (propiedades cinéticas, electroforéticas o de estabilidad molecular) de las enzimas deficientes, han permitido identificar hasta la actualidad más de

300 variantes fenotípicas diferentes en las que la expresividad clínica se halla en general, íntimamente relacionada con un determinado comportamiento cinético. Sin embargo, la naturaleza de la mutación sólo se ha identificado en cuatro variantes, una de las cuales posee actividad superior a la normal (G6PD Hecktoen). Además, debido a la complejidad particular del gene G6PD y al mecanismo aparentemente heterogéneo de su expresión en diferentes tipos de células, todavía existen algunas dudas estructurales. A pesar de estos problemas, se han llegado a algunas conclusiones, la más importante parece ser la reciente identificación de las bases moleculares de la deficiencia de G6PD en un número de alelos G6PD-mutantes, de las cuales 4 están asociadas con manifestaciones clínicas, hemólisis en 3 e ictericia neonatal en 1. Así, se encontraron 6 variantes, incluyendo G6PD Mediterránea, que tienen un sólo punto de mutación. La enzima normal se designa como G6PD B(+), dos enzimas mutantes que predominan en negros americanos son G6PD A(+) y G6PD A(-), aunque al parecer se trata de la misma mutante estructural, en la cual la G6PD A(-) se deriva de la G6PD A(+) como resultado de una mutación adicional superpuesta, ya que la G6PD A(-) muestra dos puntos de mutaciones separados, uno de los cuales se encuentra también en la G6PD A(+).

La heterogeneidad genética es grande y se expresa en diferentes grupos como una variación en las propiedades electroforéticas y catalizadoras de las enzimas en el grado de la deficiencia en el tipo de células afectadas en el organismo, en el tipo de fármacos

oxidantes que producirán la hemólisis y en la susceptibilidad a una hemólisis crónica o a la ictericia neonatal.

MANIFESTACIONES CLINICAS.- La deficiencia de G6PD suele presentarse en forma de síndrome anémico agudo, generalmente intenso con cefalea, fiebre, ictericia y hemoglobinuria al poco tiempo después de la ingestión del agente oxidante, a veces 1 ó 2 días después, ya sea alimentos (habas entre otros) o medicamentos. Otros factores desencadenantes de la hemólisis aguda en la deficiencia de G6PD son las infecciones, en especial la neumonía bacteriana, la hepatitis aguda y también trastornos metabólicos diversos entre los que destaca la cetoacidosis diabética. Aparecen cuerpos de Heinz en los eritrocitos, empieza a disminuir rápidamente la concentración de hemoglobina. Conforme avanza la hemólisis, los cuerpos de Heinz desaparecen de la circulación, quizá eliminados por los macrófagos esplénicos. En casos graves se pueden presentar dolores abdominales o lumbares, se presenta hematuria. En el término de 4 a 6 días, generalmente aumenta el número de reticulocitos excepto en aquellos casos en los que el paciente recibe el fármaco en el tratamiento de una infección activa.

La ictericia neonatal a veces grave, es relativamente frecuente en la deficiencia de G6PD, especialmente en casos de variantes severas. Con mucha menor frecuencia, la deficiencia de G6PD puede cursar con un síndrome hemolítico crónico, cuyas características clínicas son superponibles con la deficiencia de piruvato cinasa (PK) y esferocitosis hereditaria (ictericia, esplenomegalia, tras-

tornos óseos y litiasis biliar). Estas variantes suelen caracterizarse por una actividad muy disminuida e intensas alteraciones de las propiedades moleculares. Debido a que la G6PD leucocitaria es codificada por el mismo gen que la G6PD eritrocitaria, en estos casos suelen observarse, junto con la anemia alteraciones funcionales de los leucocitos que en ocasiones producen un síndrome similar a la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), pero de menor intensidad.

Un hecho bien demostrado es que las características y gravedad del cuadro clínico, así como también la rapidez de la recuperación en caso de anemia hemolítica aguda, difieren según las propiedades moleculares de la enzima y en especial de su actividad eritrocitaria. De acuerdo con ello, Beutler ha clasificado clínicamente la deficiencia de G6PD en 5 grupos o clases diferentes (Tabla III.1). Los grupos más frecuentes son el II y el III y las variantes incluidas en ellos se caracterizan por ser asintomáticas hasta que el paciente entra en contacto con el agente oxidante. En este caso sobreviene una crisis hemolítica de intensidad variable, seguida de un proceso de recuperación rápido.

Las variantes del grupo II afectan preferentemente a los individuos que habitan el litoral mediterráneo y se caracterizan por una notable disminución de la actividad de la G6PD eritrocitaria (= 1%) y leucocitaria (20-26%). Una forma clínica peculiar muy frecuente dentro de las variantes de la raza blanca es el favismo o hemólisis aguda después de la ingesta de habas o de la inhalación del polen de habas. Es una de las consecuencias más graves en po-

tencia, de la deficiencia de G6PD. El favismo puede presentarse a cualquier edad e incluso después de haber tenido contacto previo sin reacción, con habas; aunque las personas más susceptibles son los niños de edad inferior a los 5 años. El inicio de la hemólisis suele ser muy brusco, puede ocurrir en las primeras horas después de la ingestión de habas. Por lo regular, se inicia gradualmente, y la hemólisis se puede apreciar al 1º ó 2º día después de ingerir las habas; se presenta también fiebre, postración, hemoglobinuria, en la cual la orina puede aparecer roja o francamente negra, anemia intensa y en algunos casos graves, puede surgir un shock en poco tiempo. El favismo presenta una relación muy clara con aquellas poblaciones en las que las habas constituyen un componente habitual de la dieta.

El mecanismo de la hemólisis en el favismo se atribuye al efecto que producen ciertos derivados de las habas sobre el GSH eritrocitario, entre los que sobresalen la divicina y el isouramilo, glucósidos muy abundantes en esta leguminosa. Dentro de este grupo destacan, por su frecuencia, la variante G6PD Mediterránea A(-) y otros de características moleculares similares. Estas variantes son especialmente frecuentes en Grecia, Italia y España y se caracteriza por su notable inestabilidad molecular.

Dos variantes del grupo III se diferencian de las anteriores por presentar mayor actividad de G6PD eritrocítica (5 - 15%) y una actividad de G6PD leucocitaria prácticamente normal. Por lo que la anemia es en general menos intensa que en las variantes del grupo

II y la recuperación del proceso mucho más rápida (carácter autolimitado de la deficiencia) a ello contribuye la actividad de la G6PD de los reticulocitos cuyo número aumenta notablemente después de la hemólisis.

Dentro de este grupo se halla la variante propia de la raza negra o G6PD A(-) y la más frecuente en España, la variante G6PD B(-), cuya manifestación es el favismo.

Finalmente, las variantes del grupo I son las más raras y junto a la deficiencia enzimática eritrocitaria se acompañan de una gran disminución de la actividad de la G6PD leucocitaria. Estas variantes se caracterizan por presentar propiedades cinéticas peculiares y con frecuencia se acompañan de anemia hemolítica crónica y disfunción granulocitaria, síndrome parecido a la enfermedad granulomatosa crónica.

DATOS DE LABORATORIO.- Cuando no hay hemólisis los eritrocitos se ven con microscopio óptico, morfológicamente normales. Sólo con microscopía electrónica, se observan diferencias de textura del estroma. Aún cuando se presentan episodios hemolíticos, los cambios morfológicos no son muy notables. Al administrar un fármaco hemolítico, se forman cuerpos de Heinz en los eritrocitos, inmediatamente antes de la hemólisis y en sus primeras fases.

Los cuerpos de Heinz son partículas de proteínas desnaturalizadas inicialmente hemoglobina, formados debido a una agresión química de niveles aumentados de H_2O_2 por defectos hereditarios de la vía hexosa monofosfato.

Tabla III.1.

CORRELACION CLINICOMOLECULAR DE LA G6PD				
Grupo o clase	Actividad Hemafies	Actividad Leucocitos	Expresividad clínica	Ejemplos
I	0	0	Anemia hemolítica crónica Infecciones de repetición	Variantes raras Gd(-) Barcelona
II	0-5	20-60	Asintomática o Anemia hemolítica aguda Medicamento _{sa} favismo	Variantes mediterráneas Gd(-) Mediterránea
III	5-15	60-90	Asintomática o Anemia hemolítica aguda Medicamentosa Favismo (raza blanca)	Variantes de la raza negra Gd(-)A Variantes de la raza blanca Gd(-)Bética
IV	100	100	Asintomática	Gd(+)B (raza blanca) Gd(+)A (raza negra)
V	≈130	≈150	Asintomática	Gd(++)Hecktoen

La hemoglobina desnaturalizada se fija a la membrana del eritrocito, alterando la permeabilidad catiónica, con pérdida de agua y de iones potasio, ganancia de iones sodio y disminución precoz de ATP. Algunas porciones de membrana lesionadas de esta manera, pueden desaparecer del eritrocito por microesferulación o fragmentación produciendo esferocitos.

Los cuerpos de Heinz miden de 0.3 a 2.0 micras de diámetro. - Al microscopio óptico aparecen como pequeñas inclusiones redondeadas o angulares. Después de la hemólisis persisten y aparecen adheridas a la membrana celular. Se demuestran fácilmente con la tinción supravital con cristal violeta, nuevo azul de metileno o azul de cresil brillante. Son invisibles en extensiones teñidas con el método de Wright. Con el microscopio electrónico se observan como mas densas que empiezan a formarse en el centro del eritrocito y luego se adhieren a la membrana celular. Al adherirse los cuerpos de Heinz, provocan una distorsión en la membrana celular del eritrocito, también las partículas asociadas a la membrana se reorganizan agregándose sobre la región de los cuerpos de Heinz.

Los cuerpos de Heinz no pueden atravesar las hendiduras del seno esplénico, por lo que al circular por ellos se quedan en la pulpa roja perisinusoide para ser fagocitados por los macrófagos.

Si la anemia hemolítica es muy grave, se podrán observar esferocitosis y fragmentación de los eritrocitos en el frotis teñido. Se puede presentar hiperbilirrubinemia en diferentes grados. Debido a la disminución de hemoglobina, aparece reticulocitosis y se

observa policromasia en la tinción.

El diagnóstico de la deficiencia de G6PD depende de la demostración de una actividad enzimática disminuida, puede ser por medio de un ensayo cuantitativo en el cual generalmente se mide el grado de reducción del NADP^+ a NADPH en un espectrofotómetro ultravioleta. También se pueden hacer pruebas exploradoras, las cuales son bastante aceptables y los reactivos que se utilizan para practicar éstos métodos se encuentran en el comercio ya preparados. Una de estas pruebas es el método fluorescente, que es probablemente la más satisfactoria. No hay problema para detectar deficiencia enzimática en un varón plenamente afectado (homocigoto) cuando no presenta crisis hemolítica, por medio del ensayo o de las pruebas exploradoras. Sin embargo, cuando un paciente con deficiencia de G6PD A(-) ha sufrido un episodio hemolítico, sí hay dificultades, ya que al destruirse las células más viejas, salen a la circulación células jóvenes, haciendo que las enzimas suban su nivel, incrementando así la actividad hacia la normalidad. En este caso, debe sospecharse deficiencia de G6PD, ya que la actividad enzimática debería estar aumentada debido al mayor número de reticulocitos. Si se centrifuga la sangre, se pueden estudiar los eritrocitos más densos, que son los más viejos, para detectar deficiencia de la G6PD del tipo A(-) en individuos que han sufrido hemólisis reciente. También puede esperarse a que los eritrocitos envejezcan lo suficiente para demostrar su deficiencia enzimática.

Es más difícil el diagnóstico de la deficiencia enzimática he

terocigota, ya que están presentes dos poblaciones de eritrocitos, una normal y otra deficiente, lo cual puede enmascarar la deficiencia enzimática si se usan pruebas exploradoras. En las mujeres heterocigotas, los resultados de los ensayos enzimáticos, generalmente caen dentro de los valores de referencia; en éstos casos conviene más los métodos que dependen de la demostración histoquímica de la actividad enzimática eritrocitaria. Una prueba que puede ser más sensible es la del cianuro de ascorbato, citada más adelante, ya que la exploración no se practica en un lisado de células, sino en una población intacta.

Para clasificar la deficiencia de G6PD en subtipos (Mediterránea, A(-), Cantón, etc.) se necesita el uso de técnicas bioquímicas relativamente complicadas. Se debe purificar parcialmente la enzima, después determinar su K_m para el $NADP^+$ y glucosa 6-fosfato, la utilización de sustratos análogos, pH óptimos y la movilidad electroforética en sistemas estándar. Esta clasificación es útil para valorar si la etiología de la anemia no esferocítica se debe a la deficiencia de G6PD. Por ejemplo, se tiene un paciente negro con hemólisis crónica, se le determina una variante de G6PD A(-), entonces la hemólisis se origina por otro padecimiento. Pero si se encuentra una variante rara termolábil, lo más probable es que la deficiencia de G6PD desempeñe un papel importante en la etiología del proceso hemolítico.

III. 4. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.

La anemia hemolítica inducida por fármacos, debida a la defi-

ciencia de G6PD, se parece a la anemia hemolítica inducida por fármacos asociada con hemoglobinas inestables en sus manifestaciones clínicas y en algunas de laboratorio. También otros defectos enzimáticos en la vía hexosa monofosfato como la deficiencia de GSH sintetasa, γ -glutamil cisteína sintetasa o quizá GSH reductasa, pueden simular deficiencia de G6PD. para descartar las hemoglobinopatías se puede practicar una prueba de estabilidad y electroforesis de hemoglobina, éstas son normales en la deficiencia de G6PD. En las hemoglobinopatías y en la deficiencia de G6PD, algunas de las pruebas exploradoras, sobre todo la del prusiato-ascorbato, pueden dar resultados positivos, las pruebas que serán solamente positivas en la deficiencia de G6PD son la prueba exploradora fluorescente o un ensayo de G6PD.

III. 5. TRATAMIENTO.

La deficiencia de G6PD carece de tratamiento causal y siempre debe ser paliativo, a base de transfusiones sanguíneas cuando la situación hematológica lo requiera, sobre todo cuando exista un compromiso hemodinámico. Una vez establecido el diagnóstico, debe procurarse evitar el contacto del paciente con todas aquellas sustancias capaces de desencadenar el cuadro hemolítico. En la Tabla III. 2. se detallan medicamentos de actividad hemolítica. En el caso de niños con ictericia neonatal, debida a deficiencia de G6PD, necesitan exanguinotransfusión. En las regiones donde se presenta con frecuencia este padecimiento, hay que cuidar de no transfundir sangre de sujetos con deficiencia de G6PD a estos niños. Se ha vis

to que la esplenectomía no es eficaz.

III.6. CURSO Y PRONOSTICO.

Aunque la mayoría de los pacientes con hemólisis inducida por fármacos o infección se recuperan sin mayores problemas, la anemia puede agravarse en algunos casos. El favismo se debe considerar como una enfermedad relativamente peligrosa.

Al estudiar una población numerosa, se observó que a medida que aumenta la edad de la población, disminuye la incidencia de la deficiencia de G6PD. En otro estudio de una sociedad americana de un sector de población débil económicamente se encontró una incidencia más alta de genes africanos y una vida media más corta, lo que causaría una disminución en la incidencia de la deficiencia de G6PD con el envejecimiento de los individuos, pero no habría una relación de causa-efecto entre la deficiencia de G6PD y la vida media. Aunque no se recomienda el estudio de la población a nivel comunitario, ya que los tipos comunes de deficiencia son benignos, podría ser útil estudiar la posible deficiencia de G6PD en todos los enfermos que ingresan al hospital.

Tabla III-2. Compuestos que se conocen por inducir hemólisis en eritrocitos deficientes en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Analgésicos:

Acetanilida
Acido acetilsalisílico^a
Acetofenetidina (fenacetidina)^a

Sulfamidas y sulfonas:

Sulfanilamida
Sulfapiridina
Diafenilsulfona
N-acetilsulfanilamida
Sulfisoxazol (Gantrisin)^a
Tiazolsulfona
Salicilazosulfapiridina (Azulfadina)
Sulfoxona
Sulfametoxipiridazina (Kynex)

Antipalúdicos:

Primaquina
Pamaquina

Agentes antibacterianos no sulfamídicos:

Furazolidona
Nitrofurantoina (Furadantina)
Cloramfenicol^b
Acido para-aminosalicílico

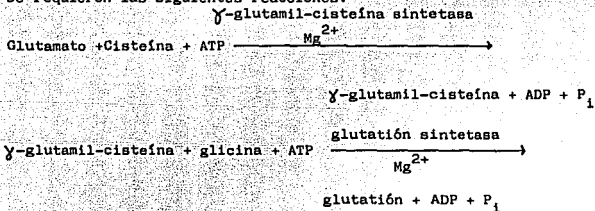
Diversos:

Naftaleno
Acido nalidixico
Azul de metileno^a
Fenilhidracina
Acido ascórbico^c

a Sólo ligeramente hemolítico en G6PD en dosis muy elevadas.
b Hemolítico en la G6PD Mediterránea pero no en A(-) o Cantón.
c En dosis masiva.

IV. TRASTORNOS EN LA SINTESIS DEL GLUTATIÓN.

El glutatión se encuentra en el eritrocito en cantidades elevadas, aproximadamente 2 mM del total de péptidos que contienen sulhidrilo, en su forma reducida (GSH). Este le sirve para proteger de los efectos de la oxidación a la hemoglobina, las enzimas y la membrana, para poder sobrevivir. La renovación del glutatión en el eritrocito parece ser que se lleva a cabo rápidamente, aproximadamente con un tiempo medio de 4 días. Para la síntesis del glutatión se requieren las siguientes reacciones:



Estas dos reacciones las catalizan los hemolizados de eritrocitos, ya que éstos contienen las enzimas y cofactores necesarios cuando son eritrocitos normales. La capacidad de los eritrocitos para sintetizar el glutatión es 150 veces más la velocidad de recambio.

Parece ser que la función principal del GSH en el eritrocito, es la detoxificación de los bajos niveles de H_2O_2 que se pueden formar espontáneamente o los producidos por la administración de ciertos fármacos. De cualquier modo se puede formar primero el ra-

dical superóxido, para que luego la superóxido dismutasa lo convierta en H_2O_2 ; la superóxido dismutasa es una enzima que contiene cobre. Enseguida la glutatión peroxidasa reduce el H_2O_2 a H_2O . Esta enzima contiene selenio. A mayores cantidades de peróxido, la catalasa proporciona protección adicional, debido a que es una proteína del hem que descompone el H_2O_2 en O_2 . En el proceso de reducción de los componentes oxidados del eritrocito, el GSH es convertido en glutatión oxidado o también puede formar disulfuros mixtos con los grupos sulfhidrilos titulables de la hemoglobina (a 93 °C proteína).

El eritrocito tiene además un mecanismo eficiente para reducir el GSSG a GSH, se trata de la enzima glutatión reductasa, la cual es una flavoproteína que contiene probablemente dos moléculas de flavín-adenín-dinucleótido (FAD), que cataliza la reducción del GSSG, con NADPH o NADH como donadores de hidrógeno. En la célula intacta parece ser que sólo funciona el sistema $NADP^+/NADPH$.

A pesar de que los estudios sugieren que es importante el control genético en la actividad de la glutatión reductasa, la riboflavina contenida en la dieta influye mucho en la actividad de esta enzima.

Como ciertos disulfuros, el GSSG inhibe la hexocinasa eritrocitaria, aunque al parecer, se necesitan niveles más altos que los fisiológicos.

V. DEFICIENCIA DE METAHEMOGLOBINA REDUCTASA.

La metahemoglobina es un derivado de la hemoglobina en el que el hierro ferroso se oxida a su forma férrica (hemina). Consta de cuatro cadenas polipeptídicas y cuatro moléculas de hemina. Forma parte de la hemoglobina "inactiva", es incapaz de combinarse de modo reversible con el O_2 y el CO_2 , desvía la curva de disociación del O_2 y entorpece su transporte desde la sangre a los tejidos. En cantidades anormales produce una "anemia" funcional con cianosis. El grado de cianosis no siempre está correlacionado con la concentración de metahemoglobina. La concentración normal puede ser hasta 0.24 g de metahemoglobina/100 ml de sangre, la concentración media normal es alrededor del 0.4% de la hemoglobina total, o alrededor de 0.06 g de metahemoglobina/100 ml de sangre.

Aunque constantemente se está formando una pequeña cantidad de metahemoglobina, ésta es reducida por los sistemas enzimáticos que se encuentran dentro del eritrocito que son por lo menos cuatro vías.

La más importante es el sistema de la NADH-metahemoglobina reductasa conocida también como NADH-diaforasa I, esta es una enzima flavínica a la cual corresponde el 90% de la capacidad reductora de la metahemoglobina del sistema ligado al NADH.

La NADH-diaforasa II es otra enzima que reduce la metahemoglobina. Es una enzima no flavínica, que explica el otro 10% restante de la capacidad reductora de la metahemoglobina ligada a NADH.

La NADH-diaforasa cataliza un paso en la vía principal para

la reducción de la metahemoglobina, reduciendo el citocromo b_5 , usando como donador de electrones el NADH. El citocromo b_5 produce y reduce la metahemoglobina a hemoglobina.

La metahemoglobina tiene un color pardo y tiene un máximo de absorción a 632 nm.

La metahemoglobina puede reducirse en forma no enzimática por otras formas que principalmente funcionan como sistema de reserva, son el ácido ascórbico, el glutatión y la metahemoglobina reductasa ligada al NADPH. Sin embargo, este último sistema sólo funciona en presencia de un transportador artificial de electrones, como por ejemplo, el azul de metileno. Cuando el ritmo de formación de metahemoglobina iguala al ritmo de su reducción ya sea por medio del sistema NADH-diaforasa o de mecanismos auxiliares como el ascorbato o GSH, se mantiene un nivel constante de metahemoglobina.

La acumulación de metahemoglobina se podrá deber a un aumento en la velocidad de formación de metahemoglobina, a deficiencia marcada de la NADH-diaforasa o una disminución acentuada de la actividad de esta enzima, como ocurre tras la exposición a fármacos o sustancias químicas oxidantes, a este tipo de metahemoglobinemia que es hereditaria se le llama metahemoglobinemia congénita debida a deficiencia de NADH-diaforasa, la cual se hereda como una característica autosómica recesiva. Los heterocigotos tienen niveles normales de metahemoglobina, pero niveles intermedios de la actividad de la NADH-diaforasa. El homocigoto tiene niveles del 10-15% de metahemoglobina de la hemoglobina total y es cianótico. Ocasio-

nalmente se ve una policitemia como mecanismo compensador. De 10 a 25% puede no haber síntomas aparentes; del 35-50% dan síntomas leves, como disnea de esfuerzo y dolor de cabeza; niveles superiores a 70% son probablemente letales. La terapia con azul de metileno en esta forma de metahemoglobinemia hereditaria, reducirá el nivel de metahemoglobinemia, al parecer por activación del sistema de la NADPH-metahemoglobina reductasa.

En el caso de que los sistemas reductores dentro del eritrocito son normales, pero la estructura molecular de la hemoglobina es anormal. Una alteración en la secuencia de aminoácidos de dos de las 4 cadenas polipeptídicas ($\alpha_2\beta_2$) produce una molécula de hemoglobina que tiene tendencia aumentada a la oxidación y una susceptibilidad disminuida a que la metahemoglobina formada sea reducida a hemoglobina.

Se han identificado 8 o más hemoglobinas aberrantes asociadas a la metahemoglobinemia, a las cuales se les denomina formas diversas de la hemoglobina M. Se heredan como genes dominantes autosómicos. Este tipo de hemoglobinopatía no responde a la terapia con azul de metileno.

La mayoría de las metahemoglobinemias se clasifican como secundaria o adquiridas. Proviene principalmente de la intoxicación por ingestión, inhalación o absorción a través de la piel, drogas o productos químicos, sobre todo los que contienen grupos nitrados o amínicos como la anilina y sus derivados, nitrato, nitritos y algunas sulfamidas. El sulfato ferroso produce metahemoglobinemia

después de la ingesta de una dosis muy grande.

En las metahemoglobinemias secundarias, el azul de metileno - es muy eficaz; su rápida acción no se basa en su propia capacidad reductora sino en su aceleración del mecanismo de reconversión celular.

La metahemoglobina se combina reversiblemente con varios productos químicos como: cianuros, sulfuros, peróxidos, fluoruros y ácidos. Por su gran afinidad con el cianuro, las intoxicaciones cianúricas deben tratarse con nitritos para formar metahemoglobina que luego se combina con el cianuro, así el cianuro libre (sumamente tóxico para las enzimas respiratorias celulares) se vuelve menos tóxico al transformarse en cianometahemoglobina.

Los síntomas de la metahemoglobinemia se deben a una captación disminuida de oxígeno causada por la inactivación de una gran parte de la hemoglobina.

El diagnóstico se basa en el antecedente de exposición a aguas de manantial o ingestión de fármacos. En la cianosis parda que es producida por la combinación de metahemoglobina parda y hemoglobina reducida de color rojo azulado y por último, en los hallazgos en la sangre de metahemoglobina en cantidades excesivas.

PRUEBA DE LOS CUERPOS DE HEINZ PARA ERITROCITOS DEFICIENTES
EN G6PD. (Beutler y cols., 1955)

Principio.- La acetilfenilhidracina, sustancia oxidante, se añade a la sangre del paciente y a la del control. Después de incubación a las 2 y 4 horas a 37°C, se examina la posible existencia de cuerpos de Heinz en cada una de las muestras.

Reactivos:

1.- Acetilfenilhidracina: Se disuelven 100 mg de acetilfenilhidracina en 100 ml de fosfato amortiguador 0.066 M a un pH de 7.6 a esto se le añaden 200 mg de glucosa.

2.- Violeta de metilo: Se disuelven 0.5 g de violeta de metilo o 2.0 g de cristal violeta por 100 ml de solución salina.

3.- Muestra de sangre: Puede emplearse como anticoagulante EDTA, oxalato doble o heparina, o bien sangre desfibrinada.

Método:

A 2 ml de solución de acetilfenilhidracina en un tubo de ensayo, se añaden 0.1 ml de sangre, se mezcla bien y se coloca a baño maría a 37°C. A las 2 hrs. se coloca una pequeña gota de la mezcla en un cubreobjetos que luego se invierte sobre una gota grande de violeta de metilo colocada en un portaobjetos. Se deja reposar y a los 10 minutos se investiga la presencia de cuerpos de Heinz en las preparaciones así obtenidas de la sangre del paciente y del control. Si es necesario se repite el exámen a las 4 horas.

Resultados:

Se determina el porcentaje de células con 5 ó más cuerpos de

Heinz, en la muestra control y la del paciente.

Control.- Entre 0 y 30%.

Paciente.- Si es un paciente con deficiencia de G6PD o del sistema del glutatión o posee hemoglobinas inestables, se encuentran más del 45% de células con 5 ó más cuerpos de Heinz.

PRUEBA DEL ASCORBATO DE CIANURO. (Jacob y Jandl, 1966).

Principio.- Se incuba la sangre con una solución de cianuro y ascorbato sódico, se genera H_2O_2 a partir de la oxidación conjunta del ascorbato y la hemoglobina. Como el cianuro inhibe a la catalasa, la hemoglobina se oxida por el H_2O_2 , y se demuestra el color oscuro de la metahemoglobina. Esto se manifiesta con mayor rapidez en las células deficientes de G6PD que en células normales.

Reactivos:

1.- Se añaden 10 mg de ascorbato sódico y 5 mg de glucosa en tubos de ensayo que se tapan y almacenan indefinidamente a 20°C.

2.- Se disuelven 500 mg de cianuro sódico en 50 ml de agua y se añaden 20 ml de amortiguador de fosfato isotónico pH 7.4. La solución se neutraliza a un pH de 7.0 con HCl y el volumen se aumenta hasta 100 ml añadiendo agua destilada. Esta solución es estable indefinidamente a temperatura ambiente.

3.- Sangre: Pueden emplearse como anticoagulante EDTA, ACD o heparina, pero no oxalato (la actividad de la vía hexosa monofosfato se inhibe con el oxalato). El almacenamiento de la sangre a 4°C durante 14 días con ACD no altera los resultados de la prueba.

Método:

Junto con la muestra problema se corre un control normal. Se oxigenan las muestras de sangre hasta obtener un color rojo brillante antes de añadir 2 ml a la mezcla de ascorbato y glucosa. Se añaden 2 gotas de solución de cianuro sódico y se incuba sin tapar en baño maría a 37°C, de preferencia con agitación. Se mezclan de

nuevo las suspensiones a las 2, 3 y 4 horas, observando cada vez - la coloración.

Resultado:

La sangre con deficiencia de G6PD, manifiesta color oscuro después de mezclarla, mientras que la sangre normal mantiene su color rojo.

En homocigotos o heterocigotos, ésto aparece al cabo de 1 ó 2 horas cuando se emplea EDTA como anticoagulante y a las 24 horas cuando se usa ACD o heparina. La sangre normal cambia lentamente de color en el transcurso de varias horas.

Interpretación:

No es específica, ya que la prueba es positiva en la deficiencia de piruvato cinasa, hemoglobinuria paroxística nocturna y en las hemoglobinas inestables. Es la más sensible de las pruebas, ya que se emplean células intactas y se puede detectar la deficiencia en varones negros durante los episodios hemolíticos y en heterocigotos.

PRUEBA CUANTITATIVA DE G6PD.

Los métodos actualmente en uso son presentados por Beutler (1971). Para la G6PD, la mayoría de las pruebas se basan, sobre todo en el ritmo de reducción del NADP^+ a NADPH, medido en espectrofotómetro a 340 nm, cuando un hemolisado se incuba con G6P. A menudo, una prueba para la actividad de la G6PD se lleva a cabo simultáneamente empleando fases apropiadas, debido a que se forma NADPH en las dos primeras reacciones de la vía hexosa monofosfato.

En heterocigotos o en la hemólisis aguda en individuos de raza negra con deficiencia de G6PD el diagnóstico puede ser obscuro, incluso con la prueba, debido al aumento del nivel de G6PD en los reticulocitos y eritrocitos jóvenes. Sin embargo, habitualmente, la prueba de investigación del cianuro de ascorbato será positiva en los casos indicados.

FLUORESCENCIA DEL NADPH. (Beutler, 1971).

Principio.- Se añade sangre completa a una mezcla de G6PD, NADP, saponina y amortiguador. Una muestra pequeña de esta mezcla se coloca en un papel filtro, observando su fluorescencia con luz ultravioleta. Si existe NADP^+ se convierte en NADPH. Dado que la fosfogluconato deshidrogenasa está presente en la mayor parte de los hemolisados, también hay conversión de NADP^+ a NADPH. El NADPH es fluorescente y el NADP^+ no lo es, por consiguiente la falta de fluorescencia indica una deficiencia de G6PD. Reoxidando pequeñas cantidades del NADPH formado, el glutatión oxidado (GSSG) facilita la capacidad de la prueba para detectar la deficiencia leve de G6PD.

Reactivos:

1.- Se prepara una mezcla de exámen con la composición siguiente: una parte de G6PD 0.01 M; una parte de NADP 7.5 M; dos partes de saponina (S) al 1%; tres partes de amortiguador de tria-HCl 750 mM, pH 7.8; una parte de GSSG, 8 mM y 2 partes de agua. Esta mezcla es estable en congelación durante varios meses, pero es obtenible en forma liofilizada de Hyland Laboratories, Costa Mesa, California.

2.- Papel filtro Whatman no. 1 (no fluorescente).

3.- Sangre en heparina, ACD o EDTA, que puede tener varias semanas de almacenamiento. También son adecuadas las manchas de sangre seca en papel filtro.

Método:

Se añaden 10 μ l de sangre a 100 μ l de la mezcla que ha de investigarse y se efectúa una mancha en papel filtro. Después de incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos, se realiza una segunda mancha. Se examinan las manchas con luz ultravioleta de onda larga.

Interpretación:

Control normal:

La primera mancha puede ser ligeramente fluorescente y la segunda puede mostrar una mayor fluorescencia.

Muestra problema:

Ninguna de las manchas presenta fluorescencia.

PRUEBA DE AUTOHEMOLISIS (Dacie y Lewis, 1968).

Principio.- Cuando la sangre desfibrinada estéril se incuba a 37°C, los eritrocitos sufren una serie compleja de cambios con una lenta hemólisis. Las células con deficiencias metabólicas o de membrana se hemolisan con mayor extensión que las normales.

Método:

Se colocan muestras de 1 ml en cuatro tubos de ensayo estériles con tapón de rosca y se añade a dos de los tubos 0.05 ml de una solución de glucosa al 10%. Los tubos se incuban a 37°C durante 24 horas y luego se mezclan suavemente por inversión, incubándolos 24 horas más.

Después de 48 horas de incubación se recoge la sangre en cada par de tubos mezclándose bien durante 10 min en un mezclador rotatorio a 15 r.p.m. Se utiliza una pequeña muestra para determinar la concentración de hemoglobina (dil. 1:200) en solución de Drabkin, y otra para averiguar el microhematocrito. Se centrifuga el resto de cada muestra y el suero se coloca en un tubo de ensayo limpio, se hace un dilución del suero 1:10 incubado con solución de Drabkin (si la hemólisis es grave se hace una dilución mayor); el blanco para la determinación de hemoglobina es una muestra de suero anterior a la incubación.

Cálculo:

$$\% \text{ de lisis} = \frac{R_t \frac{100 - Ht_t}{100} \times 100}{R_o \times \frac{\text{Dil. de san. tot.}}{\text{Dil. del suero}}} = \frac{R_t (100 - Ht_t)}{R_o \times \frac{200}{10}}$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

R_o = D.O. de la sangre total diluida.

R_t = D.O. del suero diluido a las 48 horas.

Ht_t = Hematocrito a las 48 horas.

Valores de referencia:

Sin glucosa 0.2 - 2.0%

Con glucosa 0 - 0.9%

Interpretación:

Esferocitosis hereditaria.- La lisis está casi siempre aumentada.

Con glucosa, la lisis está disminuida en grado variable.

En las anemias hereditarias no esferocíticas, Selwyn y Dacie encontraron dos tipos:

Tipo I.- Sin glucosa: Lisis de ligera a moderadamente aumentada.

Con glucosa: Hay cierta reducción de la lisis, pero menor que con la sangre normal. Este tipo de hemólisis se da en la deficiencia de G6PD.

Tipo II.- La lisis se ve aumentada pero no mejora con la adición de glucosa. A este tipo corresponde la deficiencia de piruvato cinasa.

VII. CONCLUSIONES.

El laboratorio es muy útil en el diagnóstico de deficiencias enzimáticas, por lo que deben realizarse los estudios adecuados siempre que haya un síndrome anémico hemolítico, el cual esté asociado con la ingesta de alimentos como el haba, fármacos oxidantes, infecciones como la hepatitis aguda, neumonía bacteriana o en la ictericia neonatal en la cual no haya antecedentes de incompatibilidad sanguínea.

Aunque en algunos casos la anemia es benigna, en otros como en el del favismo, puede presentarse además de la anemia, ictericia intensa, que es una de las consecuencias más graves, en potencia, por lo que el diagnóstico debe ser oportuno y correcto. Sobre todo, puede ser útil explorar la posible deficiencia de G6PD en todos los enfermos ingresados en el hospital a causa de un síndrome anémico hemolítico.

También es importante que se realicen los estudios en los bancos de sangre en forma rutinaria, ya que si se transfunde sangre con eritrocitos deficientes de G6PD a un paciente con el mismo problema o que esté con tratamiento a base de fármacos que inducen hemólisis en hematíes deficientes en G6PD, se pueden tener reacciones indeseables.

BIBLIOGRAFIA.

1. Williams. J. W., Beutler. E., Erslev. A. J. y Rundles. R. W.
"Hematología".
Salvat Editores, S. A., Barcelona, España. (1983). 2a. Edición.
2. Wintrobe. Maxwell M.
"Hematología Clínica".
Ed. Intermédica., Buenos Aires, Argentina. (1979). 4a. Edición.
3. Harper. H. A., Rodwell. V. W., Mayes. P. A.
"Manual de Química Fisiológica".
Ed. El Manual Moderno, S. A., México, D. F. (1978). 6a. Edición.
4. Todd-Sanford.
"Diagnóstico Clínico por el Laboratorio".
Salvat Editores, S. A., Barcelona, España. (1978). 6a. Edición.
5. Lynch. M. J., Raphael. S. A., Mellor. L. D., Sapare. P.D., Hills.
P., Inwood. M. J. H.
"Métodos de Laboratorio".
Nueva Editorial Interamericana, S. A. (1977). 2a. Edición.
6. Miale. J. B.
"Laboratory Medicine Hematology"
The C. V. Mosby Company. (1982). 6a. Edición.

7. Beutler. E., Michel. M.: Special modification of the fluorescent screening method for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 32:816-818,1968.
8. Beutler. E.: Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: In vivo and in vitro studies. *J. Clin. Invest.* 48:1957-1966,1969.
9. Brewer. G. J. and Dern. R. J.: A new inherited enzymatic deficiency of human erythrocytes: 6-phosphogluconate dehydrogenase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 16:472-476,1964.
10. Brewer. G. J. and Tarlov. A. R.: The methemoglobin reduction test for Primaquine-type sensitivity of erythrocytes. *J.A.M.A.* 180:386-388,1962.
11. Hirono. A., Beutler. E.: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 85,pp. 3951-3954,1988.
12. Jacob H. S. and Jandl. J. H.: A simple visual screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency employing ascorbate cyanide. *N. Engl. J. Med.* 274:1162-1167,1966.
13. Marstenin. S., Jellum. E., Halpern. Bl, Eldjarn. L. and Perry. T.

L.: Biochemical studies of erythrocytes in a patient with pyroglutamic acidemia (5-oxoprolinemia). N. Engl. J. Med. 295:406-412,1976.

14. Mohler. D. N., Majerus. P. W., Minnich. V., Hess. C. E. and Garric. M. D.: Glutathione syntetase deficiency as a cause of hereditary hemolytic disease. N. Engl. J. Med. 283:1253-1256,1970.

15. Nechels. T. F., Maldonado. N., Barquet-Chediak. A. and Allen D. M.: Hemozygous erythrocytes glutathione-peroxidase deficiency: Clinical and Biochemical studies. Blood 33:164-169,1960.

16. Scott. E. M.: The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. J. Clin. Invest. 39:1176-1179,1960.

17. Vulliamy. T. J., D'Urso. M., Battistuzzi. G., Estrada. M., Foulkes N. S., et al.: Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5171-5175,1988.

18. Scott. E. M.: The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance or methemoglobinemia.