

27  
2ej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



## "DESNATURALIZACION OXIDATIVA DE ERITROCITOS NORMALES Y ANORMALES"



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

(TRABAJO ESCRITO VIA EDUCACION CONTINUA)

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARIA TERESA CASTREJON VAZQUEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
VALIA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## CONTENIDO

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	
A) FUNCION Y ESTRUCTURA DEL ERITROCITO	3
B) FORMACION DE ESPECIES OXIDANTES	14
C) AGENTES OXIDANTES	17
FENILHIDRAZINA	18
DAPSONA	19
DIVISINA E ISOURAMIL	23
CONCLUSIONES	33
APENDICE: DETERMINACIONES DE LABORATORIO	
I) CUERPOS DE HEINZ EN LOS ERITROCITOS	36
A. METODO CON COLORANTE DE METIL VIOLETA	37
B. METODO DE BEUTLER	38
II) DEMOSTRACION DE HEMOGLOBINAS INESTABLES	39
A. PRUEBA DE PRECIPITACION POR CALOR	40
B. PRUEBA DE PRECIPITACION CON ISOPROPANOL	42
III) PRUEBA SELECTIVA PARA DETERMINAR LA DEFICIENCIA DE GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA (METODO DE LA METAHEMOGLOBINA RESIDUAL)	45
BIBLIOGRAFIA	

## INTRODUCCION

Muchas de las reacciones con radicales libres involucran la reducción del oxígeno primeramente para la formación de especies altamente reactivas tales como: anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ).

La desnaturalización oxidativa es una serie de alteraciones de las condiciones intracelulares y extracelulares inducidas por la generación química o metabólica de especies reactivas del oxígeno.

El daño oxidativo puede ocurrir a diferentes niveles del eritrocito ya sea en el metabolismo celular, en la hemoglobina o en los fosfolípidos y proteínas de la membrana.

En vivo, la desnaturalización oxidativa de los eritrocitos es un evento raro, causado solo por sobredosis de algunas drogas y en anomalías genéticas o adquiridas en la capacidad autooxidante de estas células.

En diferentes estudios con drogas o sustancias que provocan daño oxidativo, se han probado también los mecanismos normales de los eritrocitos para mantener su medio ambiente reducido.

Y ya que estos mecanismos juegan un papel significativo en la fisiopatología de muchas enfermedades, tales como: Anemias Hemolíticas, Metahemoglobinemias, Talasemias, etc., el conocerlos hace posible improvisar procedimientos clínicos y farmacoló-

gicos para contrarrestar el daño oxidativo.

En los años 50's Gilbert sugiere que los radicales libres del oxígeno son agentes causales de muchas patologías humanas. (2)

En los años 70's Carrel, Winterboun y Rachmilewitz, escriben sobre el papel del oxígeno activado en la hemólisis, encontrando dificultades para medir las formas activas del oxígeno en diferentes especies de eritrocitos. (8)

En estudios más recientes, se ha determinado a qué nivel del eritrocito se puede provocar el daño oxidativo de diferentes sustancias y se han propuesto mecanismos de acción para esas sustancias en relación con el daño causado y el nivel al que actúan sobre el hematie.

En este trabajo se hace una revisión del metabolismo eritrocitario y algunas de las drogas que provocan daño oxidativo en la forma y funciones de la membrana.

Para empezar, se hará un breve resumen del citoesqueleto del eritrocito y la formación normal en su medio ambiente de los agentes oxidantes más importantes. Posteriormente se hará referencia a los mecanismos de acción de algunas drogas que pueden inducir la desnaturalización oxidativa en la membrana y las alteraciones provocadas en el eritrocito.

## GENERALIDADES

### A) FUNCION Y ESTRUCTURA DEL ERITROCITO.

Los eritrocitos son células de vida larga que realizan una tarea biológica relativamente simple en un medio ambiente difícil. Son de forma bicóncava de  $7\mu\text{m}$  y  $2\mu\text{m}$  de espesor, flexible y contienen aproximadamente 29 pg de hemoglobina la cual constituye un 33% de su contenido total. (4)

Se ha estimado que tienen un ciclo de vida de  $120\pm 6$  días y cubren una distancia de aproximadamente 281.6 Km sujetos a  $1.7 \times 10^5$  ciclos circulatorios. En cada ciclo, el glóbulo rojo es empujado a través de regiones de alta turbulencia, apretado en capilares muy estrechos y hendiduras del bazo, en los cuales la lenta circulación, el pH y la glucosa extracelular, son extremadamente bajos.

En los capilares peritubulares del riñón la osmolaridad a la que se someten es aproximadamente de 1,000 mOsm/L durante los últimos 60 seg, lo cual puede alterarlos.

El medio interior no es menos amenazador debido a la alta concentración de oxígeno y la constante producción de especies oxidantes, que también pueden alterarlos; y en regiones tales como el bazo, el hígado y la médula ósea los macrófagos, que examinan cuidadosamente célula por célula, pueden eliminarlos de la circulación. (5)

Por otra parte, la membrana eritrocitaria es una estructura dinámica, químicamente compleja, que contiene componentes encargados de una gran variedad de propiedades funcionales.

La composición química de la membrana es aproximadamente de 40-50% de proteínas, 35-45% de fosfolípidos y 5-15% de carbohidratos, estas variaciones se deben a aspectos metodológicos más que estructurales. (3)

La estructura primaria de la membrana es una bicapa de fosfolípidos con moléculas de colesterol no esterificado y glucolípidos. En una área de superficie de  $140 \mu\text{m}^2$ , tenemos cantidades de aproximadamente  $2.4 \times 10^8$  moléculas de fosfolípidos,  $1.9 \times 10^8$  moléculas de colesterol,  $1.2 \times 10^7$  moléculas de glucolípidos y  $4.5 \times 10^6$  moléculas de proteínas. (1)

Los fosfolípidos se encuentran organizados asimétricamente, los que contienen colina (fosfatidil colina y esfingomielina) se encuentran en la parte más externa de la bicapa con la parte hidrofílica orientada a la superficie interna de la membrana. Los que tienen grupos amino (fosfatidil etanolamina y fosfatidil serina) se encuentran en la parte más interna. La parte hidrofóbica de ambas capas se orienta hacia el exterior de la bicapa.

El colesterol se encuentra en forma libre y se intercambia fácilmente con el del plasma. Si aumenta en la membrana el coeficiente colesterol/fosfolípido, disminuye la fluidez de la membrana. También están presentes glicéridos y ácidos grasos.

Los lípidos se encuentran móviles en la superficie de la membrana, esto proporciona las propiedades de viscosidad y fluidez bidimensional. (1)

Los hidratos de carbono se encuentran formando glucolípidos y glucoproteínas y se sitúan exclusivamente en la superficie externa de la membrana. En el eritrocito hay hexosa, hexosamina, fucosa y ácido siálico unido a proteínas. (4)

Las proteínas de la membrana desempeñan un papel importante en la estructura mecánica, permeabilidad y propiedades de regulación y reconocimiento de ligandos. Además existen un gran número de enzimas, antígenos y moléculas receptoras. (1)

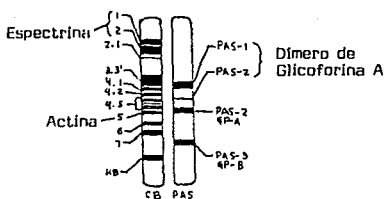
Los polipéptidos principales de la membrana del eritrocito están bien caracterizados y para separarlos, el método generalmente usado consiste en disolverlos intactos o fragmentados en un detergente iónico, el duodecil sulfonato de sodio, y luego tratarlos por electroforesis en gel de poliacrilamida. Se pueden colorear después el gel para proteínas mayores con Azul de Coomassie (CB) y para sialoglucoproteínas con ácido peryódico de Schiff (técnica de PAS). (3)

En la Figura # 1 se muestra el corrimiento electroforético de las proteínas de la membrana y algunas de sus propiedades.

Del lado citoplasmático están los polipéptidos 1 y 2 (espectrina y 5-actina), estas proteínas se asocian en estructuras supramoleculares formando microfilamentos que pueden identificar



FIGURA # 1



GEL DE POLIACRILAMIDA

Componente	peso molecular	% proteína coloreada	otros nombres
<b>POLIPEPTIDOS</b>			
1	240,000	15.1	Espectrina Tipo miosina
2	215,000	14.7	
3	88,000	24.1	
4.1	78,000	4.2	Tipo actina G-3PD
4.2	72,000	5.0	
5	43,000	4.5	
6	35,000	5.5	
7	29,000	3.4	
<b>GLUCOPROTEINAS</b>			
pas-1	55,000	6.7	Glicoforina Sialogluco- proteína
pas-2			

Corrimiento electroforético de los principales polipéptidos y glucoproteínas de la membrana del eritrocito y algunas propiedades. Modelos en gel de poliacrilamida, proteínas mayores (estandarizado con Azul de Coomassie, CB) y sialogluco-  
proteínas (estandarizado con ácido peryódico de Schiff, PAS). (1)(3)

se por microscopia electrónica de barrido.

Debajo de la membrana del eritrocito los microfilamentos forman un retículo que proporciona un sostén a la bicapa fluida con las proteínas intrínsecas. Esto puede controlar la forma característica de los eritrocitos. (3)

Los principales componentes de este esqueleto son la espectrina (banda 1,2), actina (banda 5), banda 4.1, ancirina (banda 2.1) y la banda 3. (1)

En la Figura # 2 se muestra en forma esquemática la organización de estos componentes.

Espectrina (banda 1,2).- Forma el 75%, cada molécula consiste en dos cadenas de polipéptidos alineadas de lado a lado y retorcidas una sobre otra, el heterodímero resultante es una molécula larga y flexible. Los dímeros se unen entre si, en un extremo de la molécula, para formar así los tetrámeros.

Actina (banda 5) y (banda 4.1).- Representan aproximadamente el 10% y se presentan en forma de filamentos cortos que interconectan a las moléculas de espectrina.

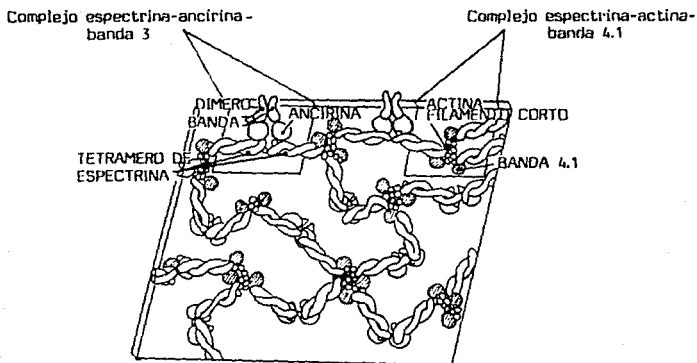
Ancirina (banda 2.1).- Es una esferoproteína voluminosa y actúa como eslabón del esqueleto de la membrana con el lado interior de la bicapa lipídica.

Banda 3.- Se encuentra en forma de dímeros y es una proteína de transporte transmembranal. (3)

Estos componentes se organizan en dos complejos principal-

mente: complejo espectrina-actina-banda 4.1 que ligan la red esquelética y el complejo espectrina-ancirina-banda 3 que sujeta el esqueleto al revestimiento de la bicapa lipídica de la membrana. (1)

FIGURA # 2



Esquema de la organización de los complejos espectrina-ancirina-banda 3 y espectrina-actina-banda 4.1 en el esqueleto de la membrana eritrocitaria. (1)

Es probable que los defectos en cualesquiera de las interacciones mayores del esqueleto; espectrina-actina-banda 4.1, dímero-tetrámero de espectrina, espectrina-ancirina ó ancirina-banda 3, debiliten la membrana y transtornen sus funciones.

(10)

El citoesqueleto del eritrocito, así como las interacciones de sus componentes se muestran en forma esquemática en la Figura # 3.

Ahora bien, es común que el hematíe esté sometido a ataques por los sistemas oxidantes en los que se desenvuelve de manera sobresaliente sin alteraciones de membrana, de aquí que estos corpúsculos requieren el aporte de una fuente de energía capaz de mantener su funcionalidad.

El eritrocito obtiene su energía a partir de dos vías principalmente:

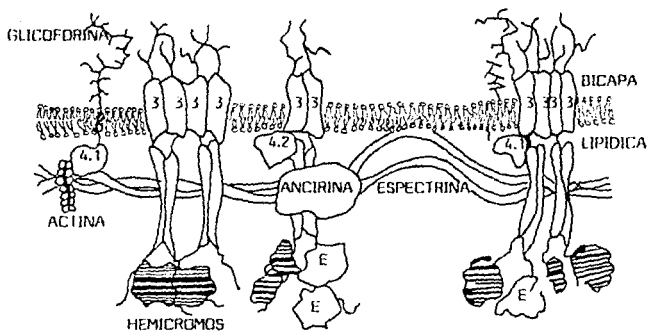
- 1) Vía de Embden-Meyerhof llamada también glicólisis anaeróbica.
- 2) Vía de la hexosa monofosfato conocida como glicólisis aeróbica.

La glucosa entra en los glóbulos rojos mediante un proceso de acarreadores que es independiente de la insulina.

Por la vía de Embden-Meyerhof aproximadamente del 90 al 95% de la glucosa se metaboliza hasta lactato con la síntesis de ATP en las células maduras, generándose 2 moléculas de ATP por mol de glucosa consumida.

FIGURA # 3

CITOSQUELETO DEL ERITROCITO



Esbozo esquemático de un corte seccional de membrana de eritrocito mostrando la organización de banda 3, la subdivisión en la transmembrana y dominio citoplasmático. La disposición de la banda 3 en relación a otras proteínas de la membrana y los enlaces de la región N-terminal. Las áreas sombreadas representan enlaces hemicromos o moléculas de hemoglobina; la E representa enlaces a enzimas. (5)

Esta escasa producción de ATP, 2-3 mmol/L de eritrocito/hr, permite renovar del 150 al 200% del total de ATP celular.

El ciclo mencionado, es la mejor fuente de nicotin adenin dinucleótido (NADH), que es un cofactor esencial en una gran variedad de reacciones de óxido-reducción, tal como la de mantener al fierro del grupo heme en estado reducido.

Otro intermediario importante en esta vía es el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), que se encuentra en concentraciones altas (aproximadamente 5 mmol/L de eritrocito). La glucosa se deriva por esta vía cuando los niveles intracelulares de ATP se elevan. La reserva de 2,3-DPG es una fuente potencial de ATP en tiempos de falta de sustrato y además es modulador del transporte de oxígeno por la hemoglobina.

Por la vía de la hexosa monofosfato (HMP) se metaboliza aproximadamente del 5 al 10% de la glucosa. Es la mejor fuente para obtener el nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADPH) cuando su oxidación dentro del eritrocito es acelerada. Esta reacción es importante en el metabolismo del glutati6n, fundamentalmente en forma reducida (GSH) debido a su acci6n como amortiguador intracelular que protege al hematíe de la desnaturalizaci6n por especies oxidantes end6genas y ex6genas. Se encuentra en concentraci6n relativamente alta (2 mM) y normalmente inactiva a las especies oxidantes.

En el proceso de reducci6n del per6xido de hidrógeno --

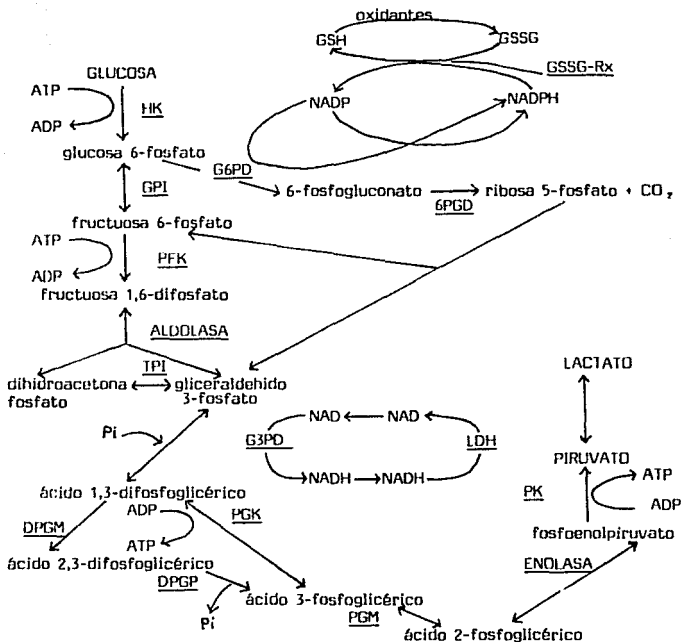
( $H_2O_2$ ), el GHS, en presencia de glutatión peroxidasa, es capaz de convertirse en glutatión oxidado (GSSH) y mezclar disulfuros con grupos tiol de las proteínas; o bien, en presencia de glutatión oxidasa, catalizada por NADPH, reducirse nuevamente a GHS.

Por otra parte, la enzima glucosa,6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la encargada de mantener los niveles adecuados de NADPH en el eritrocito así como el metabolismo del glutatión, para evitar la acumulación de especies oxidantes y con esto la desnaturalización celular. (1)

En la Figura # 4, se muestra el esquema de las vías metabólicas de la glucosa en el eritrocito y las interrelaciones entre ellas.

Es paradójico que, las células aeróbicas en general y los eritrocitos en particular, no puedan vivir sin oxígeno, pero a la vez se traumatizan constantemente a consecuencia de su exceso, ocasionando así la desnaturalización oxidativa de estas células. (10)

FIGURA # 4



METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN ERITROCITOS. Enzimas: HK, hexocinasa; GPI, glucosa fosfato isomerasa; PFK, fosfofructocinasa; TPI, trioso-fosfato isomerasa; G3PD, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; PGK, fosfogliceratocinasa; DPGM, difosfoglicero mutasa; PK, piruvatocinasa; LDH, deshidrogenasa láctica; G6PD, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; 6PGD, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; GSSG-Rx, glutatión reductasa. Los cofactores están representados por las abreviaturas conocidas. (1)



B) FORMACION DE ESPECIES OXIDANTES.

Algunos de los radicales libres del oxígeno que se ha reconocido que causan daño celular se muestran en la Tabla # 1.

TABLA # 1

AGENTES POTENCIALES EN LA DESNATURALIZACION OXIDATIVA. (16)

Oxígeno Central:

ión Superóxido ( $O_2^-$ )  
Radical Hidroxilo Libre ( $OH^\bullet$ )  
Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )  
Alcoholilo ( $LO^\bullet$ )  
Peroxilo ( $LO_2^\bullet$ )

Complejos de Metales de Transición:

Fe (III) / Fe (II)  
Cu (II) / Cu (I)

Carbono Central:

Tricloro Metilo ( $CCL_3^\bullet$ )

Sulfuro Central:

Tiol ( $RS^\bullet$ )

Nitrógeno Central:

Penildiazina ( $C_6H_5N-N^\bullet$ )

De estas especies, el radical hidroxilo es el candidato más probable para ocasionar daño oxidativo en las reacciones tóxicas, ya que es extremadamente reactivo, se combina rápidamente con moléculas biológicas en proporciones limitadas solo por difusión y puede dañar o modificar compuestos de alto o bajo peso molecular. (8)

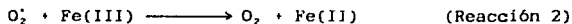
Para la formación bioquímica y química de estas especies reactivas y tóxicas, se proponen diferentes hipótesis que involucran a algunas enzimas y iones metálicos.

Entre las reacciones más importantes para la formación de especies reactivas del oxígeno tenemos:

Formación del Ión Superóxido. - Un electrón es transportado de un donador X (tal como la hemoglobina, citocromo, quinina, tiol o metal reducido) al oxígeno molecular,



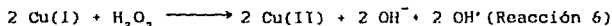
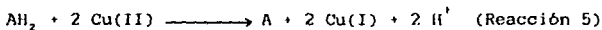
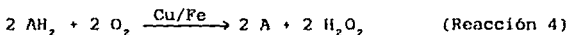
dando como resultado el ión superóxido y el donador oxidado, que por la reacción de Fenton, involucrando al ión superóxido con un ión metálico,



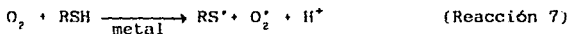
produce el radical hidroxilo libre y el metal reducido.

Formación del Radical Hidroxilo Libre. - Los agentes reductores, tales como el ascorbato y las metalo flavoproteínas, en combinación con un complejo metálico y peróxido de hidrógeno

u oxígeno molecular, también pueden generar radicales libres hidroxilo mediante las siguientes reacciones:



Formación de Radicales Tiol Libres.- Otra posibilidad es la del glutatión, capaz de generar radicales superóxido y radicales tiol libres en presencia de un metal reducido.



Como se puede observar en las reacciones anteriores, los iones metálicos son importantes catalizadores en algunas o todas ellas para la formación de especies oxidantes. (16)

El potencial redox de estos metales, particularmente del Fe y Cu, está profundamente influenciado por los ligandos del medio ambiente y ambos metales rápidamente se hidrolizan para formar compuestos polinucleares u oxihidroxilos insolubles a pH neutro. (13)

La coordinación química de ligandos o formación de quelatos, es un proceso que da por resultado cadenas heterocíclicas por el agrupamiento del metal con los ligandos de otras moléculas. Los quelatos son de diferente estabilidad y ésta la da el estado de oxidación del ión metálico.

Pequeños cambios en los ligandos pueden provocar cambios grandes en las características del quelato. (1)

Los agentes quelantes del fierro y cobre pueden ser: aminoácidos, azúcares, polioles (manitol), tiourea, ácido ascórbico, ácido salicílico), desferrosamina y disulfonato betacupríónico. (12)

La ligadura del ión metálico con el agente quelante puede conducir a dos conflictos aparentemente resueltos: realzar o inhibir el daño oxidativo.

Los agentes quelantes pueden mover la posición del metal o bien cambiar el potencial redox, con la consiguiente alteración en el daño a la biomolécula. (10)

El comportamiento oxidativo de las drogas, puede causar daño en los eritrocitos por ayudar a la formación de especies tóxicas del oxígeno o por inhibir algún mecanismo antioxidante normal en estas células. (16)

### C) AGENTES OXIDANTES.

La desnaturalización oxidativa del eritrocito puede ocurrir en la hemoglobina, proteínas y lípidos de la membrana y en el metabolismo celular.

Algunos de los agentes que provocan daño oxidativo tienen propiedades químicas en común, aunque existen una gran diversidad en su composición y estructura química creando así una extrema dificultad para predecir cuáles de estos agentes pueden

causar daño y a qué nivel de la estructura o metabolismo del eritrocito. (12)

Para entender el comportamiento de las drogas que inducen desnaturalización oxidativa, principalmente en la membrana de eritrocitos normales y anormales, se enfocarán los mecanismos de acción de las siguientes drogas:

En eritrocitos normales la fenilhidrazina y la Dapsona (diaminodifenilsulfona) y en eritrocitos con deficiencia en Glucosa,6-fosfato deshidrogenasa, la divisisina y el isouramil.

#### FENILHIDRAZINA (Ph-NH-NH<sub>2</sub>).

Es un ejemplo clásico de las drogas que pueden inducir daño en eritrocitos de individuos normales.

Se ha usado en el tratamiento de la policitemia vera y sugerido que, in vivo, provoca peroxidación de los lípidos de la membrana, hemólisis intravascular asociada con metahemoglobinemia y formación de cuerpos de Heinz. (16)

In vitro, la fenilhidrazina produce desnaturalización de la hemoglobina y efectos mayores en proteínas y lípidos de la membrana del eritrocito.

La oxidación de la fenilhidrazina, especialmente en presencia de hemoglobina, da como resultado la formación del ión superóxido y peróxido de hidrógeno. (11)

Por otra parte, el mecanismo para la producción de especies

reducidas de oxígeno, formadas por la reacción de la fenilhidrazina y la hemoglobina, es complejo e involucra algunos intermediarios reactivos y complejos de fenilhidrazina-hemoglobina. (8)

Las alteraciones que provocan estas especies en el citoesqueleto del eritrocito son: degradación de las glicoproteínas, principalmente la espectrina, peroxidación de lípidos y alteración en la organización de los fosfolípidos.

El mecanismo consiste en crear una combinación irreversible entre productos de hemoglobina oxidada (muy inestable) y la proteína de transporte transmembranal banda 3, llegando a la formación de cuerpos de Heinz, células pinzadas y hemólisis. (17)

Los macrófagos reconocen a las células dañadas oxidativamente y las eliminan de la circulación por el sistema mononuclear fagocítico.

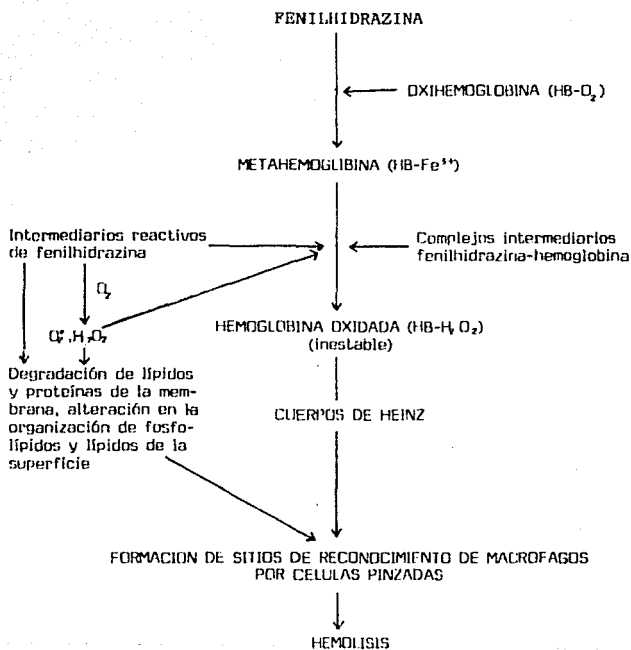
En la Figura # 5 se muestra la desnaturalización oxidativa en los eritrocitos normales por la fenilhidrazina y sus complejos en forma esquemática.

#### DAPSONA ( $\text{NH}_2\text{-Ph-SO}_2\text{-Ph-NH}_2$ ).

Es una droga usada en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades dermatológicas, inmunológicas o infecciosas, tales como dermatitis herpesiformes y lepra. (17)

Induce daño oxidativo en eritrocitos dependiendo de la

FIGURA # 5



Esquema de la desnaturalización oxidativa de eritrocitos normales inducida por la fenilhidrazina. (17)

dosis, y se ha encontrado que pacientes que reciben más de 250 mg/día son más susceptibles de presentar metahemoglobinemia asociada con formación de cuerpos de Heinz y hemólisis intravascular. (17)

La Dapsona en sí, no provoca alteraciones, pero su transformación en metabolitos activos ocurre en los neutrófilos y células mononucleares en vivo.

De los derivados, los que causan daño oxidativo son los N-hidroxilados y monoacetilhidroxilo.

El derivado N-hidroxilo, aunque es el metabolito menos producido, es el que provoca mayor daño y puede aparecer en la orina de pacientes tratados con Dapsona. (15)

El daño causado por esta droga ocurre principalmente en los fosfolípidos de la membrana por cambios en la actividad de los grupos sulfhidrilos o inhibición de la colin fosfotransferasa, que es la enzima que interviene en la fosforilación de la colina para la síntesis de fosfolípidos. (10)

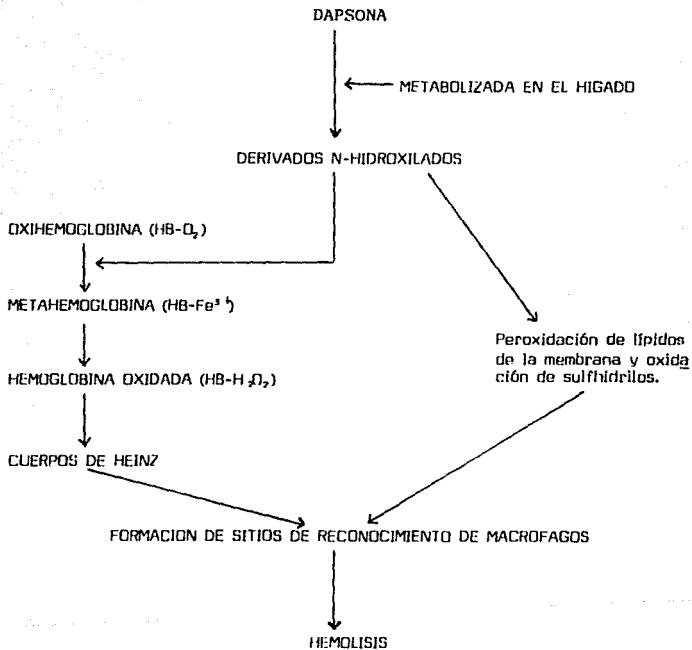
También se ha observado un aumento en la actividad de la vía de la glucosa monofosfato y en presencia de oxihemoglobina, la formación de metahemoglobina y hemoglobina oxidada.

En base a lo anterior, aparecen cuerpos de Heinz, células pinzadas y hemólisis. (17)

En forma esquemática se muestra en la Figura # 6 la acción de la Dapsona y su metabolito activo.



FIGURA # 6



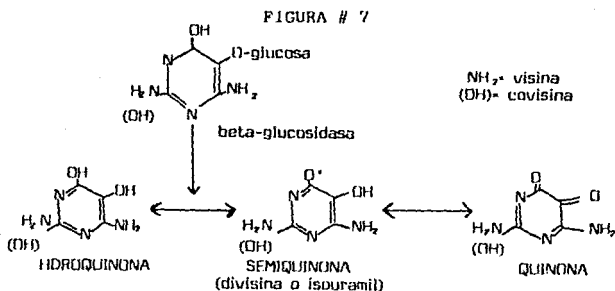
Esquema de la desnaturalización oxidativa de eritrocitos normales inducida por la formación de especies activas de la Dapsona. (17)

### DIVISINA E ISOURAMIL

La divisina y el isouramil son los derivados activos de los glucósidos de la visina y la covisina respectivamente.

En la Figura # 7, se muestra la hidrólisis de la visina en divisina (2,6-diamino-4,5-dihidroxipirimidina) y de la covisina en isouramil (6-amino-2,4,5-trihidroxipirimidina), y sus intermediarios.

Estos glucósidos se encuentran como constituyentes naturales de las habas (*Vicia Faba*). En vivo la transformación ocurre por hidrólisis del enlace beta-glucosídico entre la glucosa y el grupo hidroxilo del C-5 en el anillo de pirimidina, por acción de la beta-glucosidasa. (7)



Transformación de la visina en divisina y la covisina en isouramil. El glucósido respectivo se hidroliza por la beta-glucosidasa, a la hidroquinona que rápidamente se equilibra con el radical semiquinona. Es necesario un segundo electrón para formar la quinona. (7)

Otro constituyente de las habas que también se relaciona con el daño oxidativo, es el ácido ascórbico.

La divisina, isouramil y ascorbato son los responsables de las alteraciones en eritrocitos con deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), y como consecuencia la enfermedad denominada favismo. (6)

Se tienen evidencias de la estrecha correlación entre los efectos celulares y moleculares observados y la concentración de devisina y/o isouramil. (5)

Ambos tienen efectos comunes y mecanismos de acción aparentemente similares, y se pueden diferenciar claramente en presencia de la superóxido dismutasa.

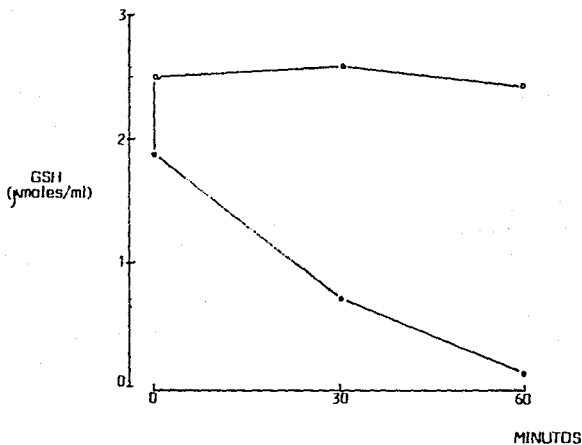
En un sistema purificado de eritrocitos con deficiencia de G6PD tratados con divisina o isouramil, se ha mostrado una reacción directa del radical semiquinina de divisina y la formación de: radical  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y posiblemente otros productos agresivos del oxígeno, los cuales causan la oxidación del glutatión reducido (GSH) y otros tioles, la formación de metahemoglobina y hemoglobina oxidada, así como la inactivación de otras enzimas (7)

La oxidación del GSH es aproximadamente de un 75% y en los grupos -SH de la membrana de un 35%. (6)

En la Figura # 8 se muestra la oxidación del GSH contra el tiempo de incubación de eritrocitos con deficiencia de G6PD.

FIGURA # 8

## OXIDACION DE GSH POR DIVISINA



Oxidación de GSH por la divisina.- A) •—••eritrocitos con deficiencia de G6PD no tratados con divisina. B) •—••eritrocitos con deficiencia de G6PD tratados con 100 µmol/l de divisina. Se observa que una pequeña cantidad de divisina (100 µmol) oxida casi por completo hasta 2,500 µmol de GSH durante los primeros 60 minutos de incubación. (7)

La presencia adicional de ascorbato en las células, potencializa todos los efectos típicos de la divisina y el isouramil, probablemente acelerando el ciclo entre la oxidación y la reducción de los compuestos. En la Figura # 9 se muestra la cinética de la oxidación de GSH en eritrocitos con deficiencia de G6PD tratados con divisina y ascorbato, a diferentes concentraciones. (7)

Aunque las consecuencias del daño oxidativo en los eritrocitos es variado, dos cambios provocados por la oxidación de GSH merecen ser resaltados: los que sufre el citoesqueleto de la membrana y el deterioro de la homeostasis del calcio, la cual sabemos regula la concentración de calcio intracelular.

Estos dos eventos están probablemente interrelacionados entre sí por causa-efecto. (6)

La homeostasis del calcio, consiste en canales transmembranales que son los responsables del flujo de manera selectiva y controlada del plasma hacia el interior del eritrocito.

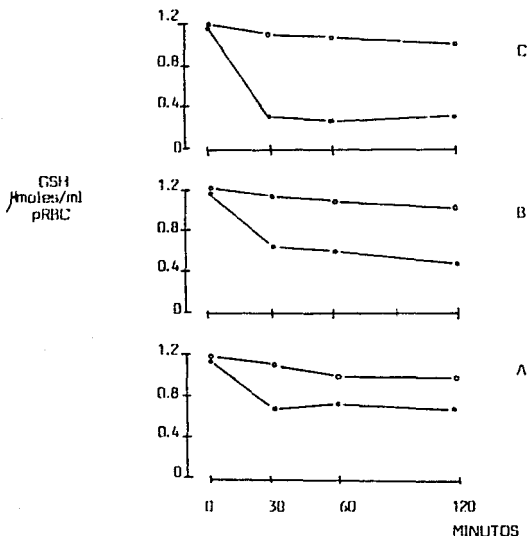
Este mecanismo autobomba, está vinculado con la actividad de muchas enzimas, pero principalmente con la calcio-ATPasa.

La calcio-ATPasa es una enzima de alta afinidad en sistemas de baja capacidad y se caracteriza por dirigir la predicción de requerimientos enzimáticos del eritrocito, actividad que obedece al criterio de exceso de uso o falta. (5)

Otra de sus funciones es la de estimular a una gran varie-

FIGURA # 9

## CINETICA DE LA OXIDACION DE GSH CON DIVISINA Y ASCORBATO



Cinética de la oxidación de GSH en eritrocitos con deficiencia en G6PD tratados con divisina y ascorbato. ○—○ control sin tratamiento; A) ●—● tratados con 250  $\mu\text{mol/L}$  de divisina, sin ascorbato; B) ●—● tratados con 250  $\mu\text{mol/L}$  de divisina y 50  $\mu\text{mol/L}$  de ascorbato; C) ●—● tratados con 250  $\mu\text{mol/L}$  de divisina y 250  $\mu\text{mol/L}$  de ascorbato. Se observa que la concentración de GSH decrece notablemente por la presencia de la divisina, pero en presencia de ascorbato el aumento en la oxidación es poco. (7)

dad de efectores, los que incluyen calmodulin, fosfolípidos ácidos, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; y también en tratamientos tales como la ingestión limitada de las enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina y calpina). (1)

En condiciones patológicas tales como anemia hemolítica, enfermedad de hemoglobina C, beta-talasemia y el favismo, el envejecimiento prematuro del eritrocito y la inactividad de sistemas enzimáticos dependientes del calcio son provocados por fallas en la actividad de la ATPasa. (6)

De los procesos enzimáticos calcio-dependientes que se ven afectados por el aumento de calcio intracelular tenemos:

1) Una baja en la actividad de la calcio-ATPasa en la autobomba de calcio como resultado de una disminución del contenido de GSH, debida a la autooxidación de la divisi<sup>n</sup>a e isouramil.

2) Un aumento de la susceptibilidad a la degradación proteolítica de la transglutaminasa, enzima encargada del acoplamiento de enlaces cruzados de las proteínas naturales de la membrana.

3) Presencia de variabilidad en las propiedades del sistema procalpina-calpina, el cual al parecer cierra el umbral de la autobomba de calcio. (7)

En los eritrocitos la procalpina es una proenzima inactiva, que por mecanismos autoproteolíticos irreversibles, calcio dependientes, se transforma en la calpina (enzima activa). (5)

La calpina después de actuar sobre proteínas se inactiva.

El sistema procalpina-calpina juega un papel importante en la deformabilidad del eritrocito porque cataliza la degradación proteolítica limitada de algunas proteínas submembranales del citoesqueleto. Es muy susceptible de ser inactivado en forma irreversible por la divisina. (7)

En la Figura # 10 se muestran en forma esquemática los sitios donde actúa la divisina y el calcio en el sistema procalpina-calpina y las modificaciones que ocurren en el eritrocito con deficiencia de G6PD.

Las fallas en la homeostasis del calcio, ocasionan un incremento notable en los niveles de calcio intracelular y responsabilidad en el daño irreversible de la integridad del citoesqueleto del eritrocito. (6)

Los daños ocasionados por la divisina y el isouramil en las proteínas de la membrana están bien caracterizados y se sabe que ocurren enlaces transversales de las proteínas vía enlaces disulfuro o alquilación de grupos tiol (-SH) completamente estables e irreversibles, con lo cual se producen agregados polipeptídicos grandes, principalmente de la proteína banda 3 y en menor extensión de la espectrina.

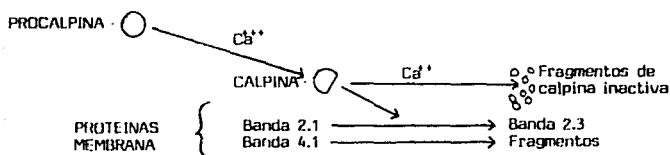
También se activan enzimas que pueden atacar a la ancirina, a la proteína banda 4.1 y al equilibrio dímero-polímero de la espectrina. (5)

Estos agregados polipeptídicos afectan la deformabilidad

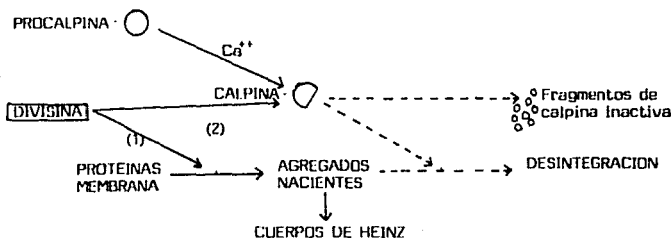


FIGURA # 10

SITIOS DONDE ACTUAN LA DIVISINA Y EL CALCIO  
EN EL SISTEMA PROCALPINA-CALPINA



A) Esquema de la degradación de proteínas en reposo, de eritrocitos con deficiencia de G6PD, mostrando la conversión calcio dependiente de procalpina-calpina.



B) Esquema de la degradación de proteínas en daño oxidativo, de eritrocitos con deficiencia de G6PD, mostrando la acción de la divisina. (1) puede inhibir la formación de agregados polipeptídicos, o bien, (2) inactivar a la calpina.

La calpina se forma por un mecanismo irreversible y se inactiva por un mecanismo autoproteolítico, ambos dependientes del calcio. Esta enzima cataliza la degradación de los enlaces transversales de las proteínas submembranales. (5)

de la célula y la viscosidad de la bicapa lipídica de la membrana del eritrocito, provocando la formación de cuerpos de Heinz y la hemólisis extravascular. (6)

Es apenas posible que dos modificaciones diferentes (formación de enlaces disulfuro S-S y alquilación de tioles -SH) puedan inducir, primero, el mismo reordenamiento secundario y, subsecuentemente, la estabilización irreversible de la estructura molecular del eritrocito. (10)

En la Tabla # 2 se muestra una sinopsis de los efectos de la concentración de divísins e isouramil y el rango de tiempo en el cual se presentan las alteraciones en eritrocitos con deficiencia de G6PD.

Se puede observar que la mayor parte del daño oxidativo ocurre en las primeras horas después de la ingestión de la divísina, y además estos daños se relacionan con la dosis. (5)

TABLA # 2

EFFECTOS DE LA CONCENTRACION DE DIVISINA O ISOURAMIL  
Y EL TIEMPO EN PRESENTARSE EN ERITROCITOS  
CON DEFICIENCIA DE G6PD. (5)

DAÑO SOBRE EL ERITROCITO	DIVISINA/ISOURAMIL ( $\mu$ mo/L)	TIEMPO (min)
Oxidación de GSH	50/1000	5-30
Oxidación de lípidos de membrana	50/1000	30-60
Oligomerización de agrupamientos de proteína banda 3	20/200	60
Enlaces anticuerpo-banda 3	100/500	60
Enlaces del fragmento C 3	100/500	60
Aumento de la fagocitosis depen- diente del complemento	20/500	30-60
Cuerpos de Heinz	100/1000	60
Metahemoglobina	100/5000	7-90
Incremento del flujo pasivo de calcio	100/500	180
Disminución de la actividad de la calcio-ATPasa	2000	180-720
Incremento de calcio intracelular	100/500	180
Agregación de las proteínas de la membrana de alto peso molecular	50/1000	180
Alteraciones reológicas	250/500	180
Enlaces transversales en la membrana	100/1000	1-2
Peroxidación de lípidos	1000	no hay
Formación de radicales OH <sup>*</sup>	5000	30-90

## CONCLUSIONES

Los aspectos moleculares de las drogas que inducen desnaturalización oxidativa en eritrocitos humanos, pueden tener características en común, pero el daño en vivo y las diferencias individuales entre pacientes juegan un papel importante entre el mecanismo de acción y el daño tóxico.

Hasta ahora, está claro que hay tres componentes bioquímicos involucrados en la formación de los radicales libres tóxicos que son:

- 1) la presencia de oxígeno bajo condiciones en las que elementos reducidos y protones pueden transferirse del oxígeno al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con o sin la mediación del ión superóxido ( $O_2^-$ );
- 2) la presencia de una molécula blanco con sitios específicos de enlace a un metal redox activado, frecuentemente el Fe o el Cu;
- 3) la interacción del ( $H_2O_2$ ) con el metal reducido y/o el sitio de enlace del metal para generar radicales libres hidroxilo ( $OH\cdot$ ), los cuales realizan el daño molecular y celular.

Para comparar el mecanismo de acción entre la fenilhidrazina y la dapsona en eritrocitos normales, se encuentra que para la formación de los productos tóxicos, la fenilhidrazina puede actuar directamente sobre los componentes del eritrocito, mientras que la dapsona debe ser metabolizada en el hígado

o activada por los macrófagos.

En ambos casos, la alteración más importante es a nivel de la hemoglobina de la membrana, la cual provoca peroxidación de lípidos, formación de cuerpos de Heinz y células pinzadas.

La peroxidación de los lípidos de la bicapa, puede inducir cambios en la permeabilidad de la membrana y como resultado la hemólisis intravascular; o bien en la antigenicidad y capacidad de deformación con lo cual se provoca una hemólisis extravascular de los eritrocitos con daño oxidativo.

Por otro lado, las dos alteraciones más importantes e interrelacionadas por causa-efecto provocadas por la divisina o el isouramil en eritrocitos con deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), son:

- 1) alteraciones en las proteínas de la membrana, por excesiva oxidación del glutatión reducido (GSH);
- 2) deterioro de la homeostasis del calcio.

El primer blanco de la divisina e isouramil es la oxidación del GSH, los grupos tiol de las proteínas y los tioles solubles, con la formación de enlaces disulfuro (S-S) o alquilación.

Altas concentraciones de tioles oxidantes, del rango de 100 a 500 mol/L, pueden afectar tanto al eritrocito hasta producir alteraciones irreversibles y disparar una serie de eventos encaminados a la fagocitosis.

Los mecanismos que median la desnaturalización oxidativa

de eritrocitos normales y con deficiencia de G6PD están lejos de ser elucidados y ordenados dentro de una secuencia precisa de eventos.

Sin embargo, todos los componentes celulares del eritrocito son susceptibles al daño oxidativo y esto hace que múltiples reacciones de oxido-reducción sean importantes.

Además, existen ciertos componentes y mecanismos de la membrana del eritrocito que pueden ser más susceptibles que otros al daño oxidativo de las drogas, debido a defectos congénitos o adquiridos de su estructura.

El conocer estos mecanismos y sus manifestaciones clínicas es con el fin de prevenir o alterar las condiciones que dirigen la formación de radicales tóxicos y remover o desplazar a los iones metálicos activos de los sitios de especificidad con agentes quelantes más efectivos.

Por último, es paradójico notar, que por un lado, las especies altamente reactivas del oxígeno son esenciales para la sobrevivencia de las células aérobicas (eritrocitos) y, por otro lado, estas especies pueden ser un factor importante que contribuya a la desnaturalización oxidativa y por consiguiente a ser removidas de la circulación a través del sistema mononuclear fagocítico.

## APENDICE

### DETERMINACIONES DE LABORATORIO

#### 1) CUERPOS DE HEINZ EN LOS ERITROCITOS

##### INTRODUCCION:

En el proceso de desnaturalización de las hemoglobinas inestables, se forman los cuerpos de Heinz dentro del eritrocito, por la pérdida del heme de las cadenas beta a causa de drogas oxidantes. También pueden ser producidos por envenenamiento por agentes químicos (compuestos aromáticos, agentes oxidantes inorgánicos, por clorato de potasio) o por intoxicación con drogas (hidrocloruro de fenilhidrazina y drogas antipalúdicas).

##### FUNDAMENTO:

Es posible inducir la formación de cuerpos de Heinz exponiendo los eritrocitos a la acetilfenilhidrazina y coloreándolos posteriormente.

En preparaciones no teñidas pueden verse como objetos refractarios, pero es preferible verlos en preparaciones teñidas.

##### MATERIAL:

El común en el laboratorio.

A. METODO CON COLORANTE DE METIL VIOLETA:

REACTIVOS:

- 1.- Colorante de metil violeta (react. #30).

MUESTRA BIOLÓGICA:

Una biometría hemática del paciente y un testigo normal.

PROCEDIMIENTO:

1. Mezcle un volumen de sangre total del problema, más cuatro volúmenes de la solución colorante de metil violeta.
2. Deje reposar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente (20-22°C).
3. Coloque una gota de la mezcla homogeneizada entre porta y cubreobjetos.
4. Selle la preparación con parafina.
5. Observe al microscopio con objetivo de inmersión.

Los cuerpos de Heinz aparecen teñidos de color púrpura intenso; se pueden observar varios o solamente uno en un mismo eritrocito cerca de la membrana.

VALORES NORMALES:

Bajo estas condiciones normalmente no se encuentran cuerpos de Heinz dentro de los eritrocitos.



B. METODO DE BEUTLER:

REACTIVOS:

- 1.- Sol. buffer de fosfatos para cuerpos de Heinz (react. #74).
- 2.- Sol. cristal violeta al 2% (react. #75).
- 3.- Acetilfenilhidrazina al 1% (react. #76).

MUESTRA BIOLÓGICA:

Una biometría hemática del paciente y un testigo normal.

PROCEDIMIENTO:

1. Agregar 0.1 ml de sangre fresca a 2 ml de la sol. de acetilfenilhidrazina. Aerear la sol. resultante soplando en ella por medio de una pipeta Pasteur.
2. Dejar la pipeta en el tubo e incubar a 37°C por 2 horas. Volver a aerear y dejar otras 2 horas.
3. Colocar una gotita en un cubreobjetos e invertir en un portaobjetos que tenga una gota grande de la sol. de cristal violeta.
4. Dejar la preparación 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que las células se tiñan. Leer con objetivo de inmersión.

VALORES NORMALES:

Menos del 40% de células que tienen 5 ó más cuerpos de Heinz es negativo. Si más del 40% de células tienen 5 ó más cuerpos de Heinz se dá el resultado como positivo.

#### INTERPRETACION:

Los cuerpos de Heinz se ven mejor en preparaciones húmedas sin teñir como cuerpos altamente refringentes y cerca de la periferia celular.

También son teñidos con azul de cresil brillante en sol. salina isotónica o con metil violeta al 0.5% en sol. salina. No son teñidos con colorantes de Ramanowsky.

El diámetro de estas inclusiones varía entre 1-3 micras.

#### BIBLIOGRAFIA

Dacie, J.V. & Lewis, S.M.  
PRACTICAL HAEMATOLOGY  
5th. Ed.  
Churchill Livingstone  
London (1975)

### II) DEMOSTRACION DE HEMOGLOBINAS INESTABLES

#### INTRODUCCION:

Las hemoglobinas inestables son variantes de la hemoglobina que debido a alguna anomalía importante de su estructura primaria, precipitan dentro de los hematiés como inclusiones insolubles o cuerpos de Heinz. Se han descrito numerosas hemoglobinas inestables, pero sólo se ha obtenido información en algunos casos de susceptibilidad a la desnaturalización oxidativa

inducida por fármacos, como son los de las hemoglobinas: Zúrich, Torino, Shepherds Bush, M Saskatoon y Hb H.

#### A. PRUEBA DE PRECIPITACION POR CALOR.

##### FUNDAMENTO:

Las hemoglobinas inestables, se desnaturalizan y precipitan al calentarse a 50°C durante una hora, en cambio la hemoglobina normal no precipita al calentarse a esta temperatura.

##### MATERIAL:

El común en el laboratorio.

##### REACTIVOS:

- 1.- Sol. amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 (react. #27).
- 2.- Reactivo de Drabkin (react. #28).

##### MUESTRA BIOLÓGICA:

Coloque una gota de EDTA al 5% (ACD ó heparina) en cada uno de 3 tubos de 12X75 mm. Agregue 5 ml de sangre de un individuo normal a uno de los tubos, 5 ml de sangre del paciente a otro tubo y 5 ml de sangre de un paciente con hemoglobinas inestables al tercero. Mézcle cada tubo con mucho cuidado para evitar coagulación.

##### PROCEDIMIENTO:

1. Prepare un hemolizado con la misma técnica de la electrofore-

sis de hemoglobina. Ajústelo a 10 g/dl.

2. Marcar los tubos de la siguiente manera:

P50 y PTA para el problema  
N50 y NTA para el normal  
T50 y TTA para el testigo positivo

3. Adicione a cada uno de los tubos 1.0 ml de sol. amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4
4. Adicione 0.1 ml de hemolizado correspondiente a cada tubo.
5. Mezcle el contenido de los tubos perfectamente bien.
6. Coloque los tubos marcados con 50°C en baño maría durante 1 hora.
7. Los tubos marcados con TA colóquelos en baño de agua a 22°C durante 1 hora.
8. Transcurrido este tiempo, centrifugar los tubos a 3500 rpm durante 10 minutos.
9. Decante los sobrenadantes a otros tubos rotulados.
10. Separe en otro tubo 0.5 ml de cada sobrenadante.
11. Agregue 9.5 ml del reactivo de Drabkin. Mezcle bien.
12. Deje en reposo durante 10 minutos.
13. Mida D.O. en espectrofotómetro a 540 nm.
14. Ajuste a 0 de D.O. con el reactivo de Drabkin.

CALCULOS:

$$\text{Porcentaje de hemoglobina inestable} = \frac{\left( \text{D.O. muestra s/ calentar} \right) - \left( \text{D.O. muestra calentada} \right)}{\text{D.O. muestra s/calentar}} \times 100$$

**INTERPRETACION:**

En general el hemolizado permanece claro después de una incubación de una hora a 50°C.

**VALORES NORMALES:**

Hemoglobina inestable a 50°C- menos de 1%

**BIBLIOGRAFIA**

Dacie, J.V. & Lewis, S.M.  
PRACTICAL HAEMATOLOGY  
5th. Ed.  
Churchill Livingstone  
London (1975)

Brown Bárbara A.  
TECNICAS DE LABORATORIO EN HEMATOLOGIA  
Elicien  
Barcelona, España (1976)

**B. PRUEBA DE PRECIPITACION CON ISOPROPANOL.**

**FUNDAMENTO:**

La adición de alcohol isopropílico al hemolizado problema, debilita las uniones internas de la hemoglobina. La hemoglobina inestable precipita en esta solución en menor tiempo que la hemoglobina normal.

Una vez precipitada la hemoglobina inestable, puede determinarse el contenido de hemoglobina del sobrenadante y así calcular el porcentaje de hemoglobina inestable.

**MATERIAL:**

El común en el laboratorio.

**REACTIVOS:**

- 1.- Sol. de isopropanol al 17% en tris HCl 0.1 N pH 7.4 (react. #29).
- 2.- Reactivo de Drabkin (react. #28).

**MUESTRA BIOLÓGICA:**

Las mismas que para la prueba de precipitación por calor.

**PROCEDIMIENTO:**

1. Marcar los tubos de la siguiente manera:  
P37 y PTA para el problema  
N37 y NTA para el normal  
T37 y TTA para el testigo positivo
2. Adicione a cada uno de los tubos 1.0 ml de la sol., de isopropanol.
3. Adicione 0.1 ml de hemolizado correspondiente a cada tubo.
4. Mezcle el contenido de los tubos perfectamente bien.
5. Coloque los tubos marcados con 37°C en baño maría durante 30 minutos.
6. Los tubos marcados con TA colóquelos en baño de agua a 22°C durante 30 minutos.
7. Transcurrido este tiempo, centrifugar los tubos a 3500 rpm durante 10 minutos.

8. Decante los sobrenadantes a otros tubos rotulados.
9. Separe en otros tubos 0.5 ml de cada sobrenadante.
10. Agregue 9.5 ml del reactivo de Drabkin. Mezcle bien.
11. Deje en reposo durante 10 minutos.
12. Mida D.O. en espectrofotómetro a 540 nm.
13. Ajuste a 0 de D.O. con reactivo de Drabkin.

CALCULOS:

$$\text{Porcentaje de hemoglobina inestable} = \frac{\left( \text{D.O. muestra s/calentar} \right) - \left( \text{D.O. muestra calentada} \right)}{\text{D.O. muestra s/calentar}} \times 100$$

INTERPRETACION:

Tanto la prueba de precipitación a 37°C con alcohol isopropílico como la de precipitación a 50°C demuestran la presencia de hemoglobinas inestables; complementándose con otras pruebas, como la presencia de cuerpos de Heinz y la electroforesis.

Las dos pruebas de precipitación son igualmente sensibles; sin embargo, la prueba de isopropanol tiene la desventaja de que precipita a la hemoglobina fetal a partir de los primeros minutos; dando falsos positivos cuando el contenido de hemoglobina fetal de la muestra es alto. Las muestras manejadas inadecuadamente (no refrigeradas) dan falsos positivos por la formación de metahemoglobina. En estos casos debe añadirse a la muestra KCN al 2% lo cual reduce la frecuencia de falso positivo por

formación de ese compuesto.

El tubo del normal permanece claro durante 30 minutos; la presencia de una hemoglobina inestable se aprecia después de los primeros 5 minutos, porque la solución se pone turbia y después de 20 minutos se observa la formación de un presipitado flocculento.

VALORES NORMALES:

Hemoglobina inestable con alcohol isopropílico- negativa.

BIBLIOGRAFIA

Carrel, R. and R. Kay. "Method for the detection of unestable haemoglobins". Brit J. Haematol. 23/615 (1972)

III) PRUEBA SELECTIVA PARA DETERMINAR LA DEFICIENCIA  
DE GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA  
(METODO DE LA METAHEMOGLOBINA RESIDUAL)

INTRODUCCION:

La deficiencia de la enzima está determinada por uno o más genes en el cromosoma X y existen alrededor de 50 variantes diferenciadas por sus propiedades electroforéticas y catalizadoras, dando diferentes formas de expresión clínica. Las dos variantes más comunes son: La de la raza blanca del litoral



del mediterráneo (G6PD-B ) con deficiencia de la enzima en: plaquetas, leucocitos y eritrocitos, de presentación severa cuando se ingieren habas (favismo), presipitada también por ciertas drogas oxidantes. La variante (G6PD-A ) encontrada en poblaciones de negros del oeste de africa y los estados unidos que lleva a una hemólisis por drogas oxidantes, se expresa clínicamente más leve que la anterior y la deficiencia de la enzima es únicamente en los eritrocitos.

**FUNDAMENTO:**

Esta prueba sirve para demostrar las deficiencias de G6PD. Consiste en tratar a los eritrocitos con nitrito de sodio para convertir su oxihemoglobina en metahemoglobina, la cual en presencia de G6PD y azul de metileno es transformada nuevamente a oxihemoglobina. Esto ocurre por la activación del ciclo de las pentosas y activación de la metahemoglobina-NADPH-reductasa. Si existe una deficiencia de G6PD, el nivel de metahemoglobina permanece elevado.

La cantidad residual de metahemoglobina se determina en forma colorimétrica; para ésto, cuando a una sol. de metahemoglobina se le adiciona cianuro de sodio, su banda de absorción se anula por la conversión de metahemoglobina a cianometahemoglobina. El cambio en D.O. es directamente proporcional a la concentración de metahemoglobina. Posteriormente se mide la cantidad

de hemoglobina total, después de la conversión completa a ciano-metahemoglobina por la adición de ferricianuro de potasio y cianuro de sodio. Esta conversión medirá la oxihemoglobina y metahemoglobina pero no la sulfahemoglobina, por lo que la presencia de grandes cantidades de sulfahemoglobina producirá una lectura errónea de la hemoglobina total.

**MATERIAL:**

El común en el laboratorio.

**REACTIVOS:**

- 1.-Glucosa en sol. acuosa 0.28 M(5%) (react. #50)
- 2.-Nitrito de sodio 0.18 M (react. #51).
- 3.-Azul de metileno 0.0004 M (react. #52).
- 4.-Cloruro de sodio 0.85%.
- 5.-ACD (react. #53).
- 6.- Sol.reguladora de fosfatos M/15 pH 6.6 (react. #55).
- 7.-Sol.reguladora de fosfatos M/60 pH 6.6 (react.#56).
- 8.-Cianuro de sodio neutralizado (react. #60).
- 9.-Sol. ferricianuro de potasio al 20% (react. #57).

**MUESTRA BIOLÓGICA:**

Tome 4.5 ml de sangre al paciente y a un donador normal en 2 tubos de 13X100 mm con 0.75 ml de ACD. Mézclelos cuidadosamente.

**PROCEDIMIENTO:**

PRIMERA PARTE (MODIFICADO POR EL B.C.S.)

1. Las muestras del paciente y normal se dejan sedimentar a 4°C durante aproximadamente 30 minutos.
2. Elimine la cantidad de plasma necesario para que el volumen de eritrocitos sea igual al del plasma (hematocrito aprox.45).
3. Rotule 5 tubos de 13X100 mm de la sig. forma:

P-Problema

N-Normal

S-Sin reactivo

C-Con reactivo

PS      PC      NS      NC      TP

T-Testigo positivo

4. Adicione a los tubos

Sangre problema (ml)	2.0	2.0	---	---	---
Sangre normal (ml)	---	---	2.0	2.0	---
Sangre testigo positivo (*)	---	---	---	---	2.0
Glucosa en sol. acuosa (ml)	---	0.2	---	0.2	---
Nitrito de sodio (ml)	---	0.1	---	0.1	0.1
Azul de metileno	---	0.1	---	0.1	---
NaCL 0.85% (ml)	0.4	---	0.4	---	0.3

(\*)-Es sangre normal, lo hacemos positivo al adicionarle nitrato de sodio y no azul de metileno.

5. Mezcle suavemente por inversión.
6. Incube en baño de agua a 37°±0.5°C, durante 3 horas.
7. Agite las mezclas a los 60 y 120 minutos.
8. A los 180 min. de incubación, congelar los tubos en hielo seco-acetona.
9. Descongelar y determinar en el hemolizado la metahemoglobina residual por el método de Malloy y Evelin, modificado por Brewer, que corresponde a la SEGUNDA PARTE DEL PROCEDIMIENTO.

# ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

-49-

## SEGUNDA PARTE: DETERMINACION DE METAHEMOGLOBINA POR EL METODO DE MALLOY Y EVELIN (MODIFICADO POR BREWER).

1. Rotule 12 tubos de 18 X 150 mm de la sig. forma:	SERIE I						SERIE II					
	BK	PS	PC	NS	NC	TP	BK	PS	PC	NS	NC	TP
2. Adicione:												
Sol. reg. de fosfatos M/15	-----	-----	-----	-----	-----	-----	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Sol. reg. de fosfatos M/60	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Hemoliz. Problema (ml)	-----	0.2	0.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Hemoliz. Normal (ml)	-----	-----	-----	0.2	0.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Hemoliz. Testigo (+) (ml)	-----	-----	-----	-----	-----	0.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----

3. Mezcle y lea D.O. a 635 nm; empleando el tubo BK para ajustar a 0, esta lectura será L-1, ÚNICAMENTE LA SERIE I.

4. Adicione cianuro de sodio neutralizado (0.05ml-1 gota)    0.05 0.05 0.05 0.05 0.05 0.05 -----

5. Mezcle y deje reposar 2 minutos.

6. Lea D.O. a 635 nm (L-2), NO DESECHE LOS TUBOS

7. Pasar 2.0 ml de c/u de los tubos de la serie I a su correspondiente de la serie II.

8. Adicione a serie II:  
 Ferricianuro de potasio al 20% (0.05ml-1 gota)    -----    0.05 0.05 0.05 0.05 0.05 0.05  
 Cianuro de sodio neutralizado (0.05 ml-1 gota)    -----    0.05 0.05 0.05 0.05 0.05 0.05

9. Mezcle y deje reposar 2 minutos.

10. Lea D.O. a 540 nm (L-3).

### CALCULOS:

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

F = Factor de dilución;  $F = \frac{255}{51} = 5.0$

INTERPRETACION:

Si la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa está disminuída al exponer la hemoglobina al nitrito de sodio, la producción de NADPH estará bloqueada y no se producirá glutati6n reducido (GSH), entonces, la hemoglobina se oxidará a metahemoglobina.

VALORES NORMALES:

Los valores normales con reactivo son menos de 5% y sin reactivo menos de 2%.

BIBLIOGRAFIA

Dacie, J.V. & Lewis, S.M.  
PRACTICAL HAEMATOLOGY  
5th. Ed.  
Churchill Livingstone  
London (1975)

Brewer, G.V., Tarlov, A.R. & Alving, A.S. J. of Am. Assoc. 180/386  
(1962)

Junxis, J.H.P. & Huisman, T.H.J.  
A LABORATORY MANUAL ON ABNORMAL HAEMOGLOBINS  
2 da. Ed.  
Blackwell Scientific Publications  
(1968)

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Beck S. William (ed.)  
HEMATOLOGY  
3th. Ed.  
The MIT Press  
Massachusetts. (1981)
- 2) Gilbert D.L. (ed.)  
OXYGEN AND LIVING PROCESSES  
An Interdisciplinary Approach.  
N.Y. (1981)
- 3) Rosas Urbina Yolanda  
ANEMIAS HEMOLITICAS POR TRANSTORNOS A NIVEL DE MEMBRANA  
U.N.A.M., México D.F. (1990)
- 4) Wintrobe, Maxwell, Meyer, (eds.)  
HEMATOLOGIA CLINICA  
Ed. Interamericana  
México D.F., (1968)
- 5) Arese, P. and De Flora, A. "Pathophysiology of Hemolysis in Glucosa-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency" Seminars in Hematology 27/1/1-40 (1990)
- 6) Arese, P. "Favism. A Natural Model for the Study of Hemolytic Mechanisms" Rev. Pure. Appl. Pharmacol. Sci. 3/123-183 (1982)
- 7) Arese, P., Bosia Naitana, A. "Effect of Divisina and Isouramil on Red Cell Metabolism in Normal and G6PD deficient Subjects" Fifth Ann. Arbor. Conference. N.Y./725-744 (1981)
- 8) Carrel, R.N., Winterbourn, C.C., Rachmilowitz, E.A. "Activated Oxygen and Hemolysis" Br. J. Haematol. 30/254-259 (1975)
- 9) Czapski, G., Ilan, Y.A. "On the Generation of the Hydroxylation Agent from Superoxide Radical" Photochem. Photobiol. 28/651-653 (1978)
- 10) Chiu, D., Kuypers, F. and Lubin, B. "Lipid Peroxidation in Human Red Cells" Seminars in Hematol. 26/4/257-276 (1989)
- 11) Golberg, B., Stern, A., Peisach, J. "The Mechanism of Superoxide Anion Generation by Interaction of Phenylhydrazine with Hemoglobin" J. Biol. Chem. 251/3045-3050 (1976)

- 12) Gordon, Smith, E.C. "Drug-induced Oxidative Hemolysis" Clin. Haematol. 9/557-586 (1980)
- 13) Hershko Chaim. "Mechanism of Iron Toxicity and its Possible Role in Red Cell Membrane Damage" Seminars in Hematol. 26/4/277-285 (1989)
- 14) Misra, H.P., Fridovich, I. "Oxidation of Phenylhydrazine: Superoxide and Mechanism" Biochem. 15/681-687 (1976)
- 15) Rasbridge, M.R., Scott, G.L. "The Haemolytic Action of Dapsone: Changes in the Red Cell Membrane" Br. J. Haematol. 24/183-193 (1973)
- 16) Saltman, P. "Oxidative Stress: A Radical View" Seminars in Hematol. 26/4/249-256 (1989)
- 17) Stern, A. "Drug-induced Oxidative Denaturation in Red Blood Cell" Seminars in Hematol. 26/4/301-306 (1989)
- 18) Stocks, J., Dormandy, T.L. "The Autoxidation of Human Red Cell Lipids Induced by Hydrogen Peroxide" Br. J. Haematol. 20/95-110 (1971)