

36  
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

Determinación de la concentración de metahemoglobina  
y la actividad de NADH - Metahemoglobina reductasa  
(DIAFORASA) en pacientes de consulta externa del  
Hospital 1o. de Octubre (ISSSTE)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

**LAURA IRENE MATILDE GRANADOS**

DIRECTORES DE TESIS :  
Q.F.B. RAMON CENDEJAS RAMIREZ  
DR. RICARDO V. SANTIAGO DIAZ

Cuautitlan Izcalli. Edo. Mex.

Septiembre 1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Determinación de la concentración de metahemoglobina y la actividad de  
NADH-Nicotinucleotina reductasa (NDR) en pacientes de consulta externa  
del Hospital lo. de Octubre (ISSSTE).

que presenta la pasante: Laura Irene "Atilde" Graedon  
con número de cuenta: P522P47-0 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Biotécnica

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de Mayo de 1994

PRESIDENTE Dr. Ricardo V. Santiago Díaz

VOCAL Dr. C. Cilda Floron Torres

SECRETARIO Dr. E. Estela Cilla Wazawa

PRIMER SUPLENTE Dr. E. René Ramón Santos

SEGUNDO SUPLENTE Dr. D. Antonio Cárdenas Ceballos

## A D R A D E C I M I E N T O S

A ti Señor, que estas junto a mi en cada momento de mi existencia, guiando mi camino y alimentando mi espíritu de amor. Gracias te doy por la vida, por la fuerza y entereza para salir adelante, por la tranquilidad de saber que siempre estas a mi lado.

A mis padres *Donpalo y Jere*, con profundo amor y respeto les dedico esta obra, gracias por su amor, su comprension y apoyo, para que yo saliera adelante y llegue a la culminación de una de las metas que me he puesto en la vida.

A mis queridos hermanos:

*Billy, Claudia, Donpalo.*

A mis abuelitos:

*Belen y Pedro*

*Margarita y Martin(q.c.d.)*

A mi familia, con quien convivo todos los días:

*Gloria, Alejandro, Ariel, Adalid, Lupita*

*Pedro, José, Esther, Belén, Anita*

*Andrés, Andrecito, Nancy, Claudita.*

Gracias a la familia Guerrero Ramos, por todas las facilidades y el apoyo que recibí de ustedes para la realización de este trabajo.

*Dr. Mario D.*

*Dra. Amelia R.*

*Adriana*

*Alberto*

*Raúl*

*Mario*

A tí *Mario*, con todo mi amor, por que has sabido hacerme muy feliz, tu que has estado a mi lado en todos los momentos difíciles y que con tus palabras has logrado hacer que me sienta reconfortada y tranquila. Gracias mi cielo por darme la fuerza para seguir siempre adelante, gracias por tu amor y tu comprensión.

Gracias a mis directores de tesis:

*L.J.B. Ramon Corderias Ramirez*

*Dr. Ricardo V. Santiago Diaz.*

Por su valiosa colaboración en la realización de este proyecto.

Gracias a la *Universidad* y en especial a la *JED-Cuautlilan* por abrirme sus puertas y brindarme el tesoro más grande, el conocimiento.

A mis amigos y compañeros, con los cuales compartí cinco años de mi vida, a todos gracias.

*Dulce, Laura Lucila, Vicky Solano, Eva y Araceli.*

*Lilia, Eliza, Amalia, Gustavo, Minerva, Judith, Margarita.*

*Maribel, Miguel Vargas, Lolita, Jere, Lupita Alcalá, Ilda, Juan.*

*Elvira, Daniel, Vicky Bosa, Norma, Isauro, Toño, Raúl.*

*Victor, Monica, Aline y Victor M.M.*

En general a toda la generación 88-92 de Q.F.B.

A amigas del Laboratorio de Diagnóstico Clínico:

*Edith*

*Claudia*

*Jrene*

*Marisa*

*Angelina*

A todas muchas gracias por su amistad y su apoyo.

Al *J.F.B. René Damian Santos*, por su amistad y su apoyo.

# INDICE

	Hoja
<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	3
<b>II. GENERALIDADES</b> .....	5
II.1.0. TRANSPORTE DE OXIGENO POR LA SANGRE.....	5
II.2.0. HEMOGLOBINA. CARACTERISTICAS Y COMPOSICION .....	6
II.2.1. SINTESIS DE HEMOGLOBINA .....	10
II.2.1.1. SINTESIS DEL HEMO .....	10
II.2.1.2. SINTESIS DE GLOBINA.....	12
II.2.1.3. ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA.....	12
II.2.2. ALGUNOS EJEMPLOS DE HEMOGLOBINAS.....	13
II.2.3. VIDA DEL ERITROCITO Y CATABOLISMO DE LA HEMOGLOBINA .....	13
II.3.0. METABOLISMO DEL HIERRO .....	16
II.3.1. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE HIERRO .....	16
II.3.2. MECANISMOS DE RETROALIMENTACION QUE REGULAN LA ABSORCION DE HIERRO .....	17
II.3.3. FUENTES Y REQUERIMIENTOS DE HIERRO .....	17
II.4.0. PIGMENTOS HEMOGLOBINICOS ANORMALES .....	18
II.4.1. MECANISMOS QUE PROTEGEN LA EXCESIVA FORMACION DE M <sub>Hb</sub> .....	21
II.4.2. MECANISMOS DE REDUCCION DE M <sub>Hb</sub> A H <sub>b</sub> .....	23
II.4.3. SISTEMAS REDUCTORES DE METAHEMOGLOBINA .....	24
II.5.0. ETIOLOGIA DE LA METAHEMOGLOBINEMIA .....	25



II.5.1. METAHEMOGLOBINEMIAS CONGENITAS .....	25
II.5.1.1. METAHEMOGLOBINA HEREDITARIA	
POR Hb M.....	26
II.5.1.2. CLASIFICACION DE METAHEMOGLOBINEMIAS	
DISENZIMATICAS.....	28
II.5.2. CARACTERISTICAS DE NADH-DIAFORASA I Y	
NADH-DIAFORASA II.....	30
II.5.3. DIFERENCIAS ENTRE NADH-DIAFORASA Y	
NADPH-DIAFORASA.....	31
II.5.4. PROPIEDADES GENERALES DE	
NADH-DIAFORASA .....	32
II.5.5. METODOS PARA LA DETERMINACION DE LA	
ACTIVIDAD DE LA NADH-MHb REDUCTASA .....	33
II.5.6. METAHEMOGLOBINEMIA ADQUIRIDA	
O TOXICA .....	33
II.5.6.1. OXIDANTES DIRECTOS DE LA HEMOGLOBINA.....	35
II.5.6.2. OXIDANTES INDIRECTOS DE LA HEMOGLOBINA.....	39
II.6.0. RIESGOS INDUSTRIALES.....	45
II.7.0. SINTOMATOLOGIA .....	45
II.8.0 DIAGNOSTICO.....	46
II.8.1. TRATAMIENTO.....	47
<b>III. HIPOTESIS.....</b>	<b>51</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
<b>V. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>53</b>
V.1.0. MATERIAL .....	53
V.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	53
V.1.2. MATERIAL QUÍMICO.....	53

V.2.0. METODOS.....	54
V.2.1.PREPARACION DE HEMOGLOBINA	
LIBRE DE NADH-MHb REDUCTASA.....	54
V.2.2. DETERMINACION DE METAHEMOGLOBINA .....	54
V.2.3. ENSAYO ENZIMATICO DE LA NADH-METAHEMOGLOBINA	
REDUCTASA (DIAFORASA).....	56
V.2.3.1. ENSAYO DE HEMOGLOBINA.....	56
V.2.3.2. ENSAYO ENZIMATICO.....	56
V.2.4. METODO ESTADISTICO.....	58
VI. RESULTADOS.....	60
VII. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS .....	81
VIII. CONCLUSIONES.....	86
IX. BIBLIOGRAFIA.....	88

## ABREVIATURAS

A	Absorbancia.
a.a	Aminoácido.
ALA	Acido $\delta$ -aminolevulínico.
D	Daltons.
E-M	Emden-Meyerhof.
Fe	Fierro.
G.R.	Glóbulos rojos
Glu.	Acido glutámico.
G-6-PDasa	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
GS-SG	Glutación.
HbM	Hemoglobina M.
HbA	Hemoglobina A.
Hb F	Hemoglobina fetal.
Hb O <sub>2</sub>	Oxihemoglobina.
His.	Histidina.
H <sub>2</sub> A	Acido.
H <sup>+</sup>	Protones.
Hb	Hemoglobina.
MHb	Metahemoglobina
nm	Nanometros.
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NADH	NAD reducido.
NADP	Fosfato de NAD.
NADPH	Fosfato de NAD reducido.

NADH-MHb	NADH-metahemoglobina reductasa
Prox.	Proximal.
p-	Para.
-P	Fosfato.
SG-H	Glutación reducido.
Tyr	Tirosina.
TNT	Trinitrotolueno.
U.V.	Ultra violeta.
Val	Valina.
v.	Volts.

## I. INTRODUCCION

Se conoce como cianosis al color azulado o violáceo de la piel y las mucosas, la cianosis se debe habitualmente a la presencia de una determinada cantidad de algún pigmento de color oscuro en la sangre capilar, que visto a través de la piel confiere a esta un color característico.

Una cantidad incrementada de hemoglobina reducida, se encuentra en enfermedad cardíaca o pulmonar y es mas frecuentemente la responsable de ligera cianosis(9).

Los mas intensos grados de cianosis vista clínicamente son debidos a pigmentos hemoglobinicos anormales dentro de los eritrocitos, como son: la metahemoglobina y la sulfahemoglobina (9).

La metahemoglobina se forma cuando el hierro de la hemoglobina (pigmento normal de la sangre) pasa de un estado ferroso a férrico, convirtiendose así en un pigmento incapaz de transportar oxígeno (3,9).

La concentración normal de metahemoglobina reportada es tan sólo de un 2% en relación a la concentración total de la hemoglobina. Esta concentración se mantiene gracias al equilibrio existente entre la oxidación de la hemoglobina y la reducción de la metahemoglobina (26).

Un incremento en la concentración de la metahemoglobina puede originarse a partir de la exposición a drogas o sustancias químicas, las cuales incrementan la tasa de oxidación de la hemoglobina. Por otro lado pueden deprimir los mecanismos del eritrocito que protegen a la hemoglobina contra la oxidación (1,26).

La metahemoglobinemia puede ser el resultado de una anomalía en los sistemas reductores de los eritrocitos, o bien a una alteración en la estructura de la molécula (9).

Los sistemas reductores de la metahemoglobina en orden de importancia son principalmente NADH-MHb reductasa (DIAFORASA) en un 70%, ác. ascorbico en un 12%, glutatión reducido (GSH) en un 9%, NADPH-MHb reductasa en un 9% (9).

El mecanismo de reducción mas importante es la diaforasa, y la falta o una notable deficiencia de ésta enzima origina una metahemoglobinemia. Los síntomas desarrollados por la

presencia de metahemoglobina son variables, por lo cuál también los síndromes clínicos ofrecen distintos aspectos, dándose dos tipos de metahemoglobinemias: (9)

- Metahemoglobinemia primaria (hereditaria o por deficiencia enzimática)

- Metahemoglobinemia secundaria o adquirida (por exposición a sustancias químicas metahemoglobinizantes) (1).

## II.GENERALIDADES

### II.1.0. TRANSPORTE DE OXIGENO POR LA SANGRE.

La respiración es un proceso vital para el hombre, por medio del cual se intercambia oxígeno y bióxido de carbono entre el organismo y el medio ambiente. El aire atmosférico que inhalamos es una mezcla de gases que tiene la composición de un 20.96% de oxígeno, 0.4% de bióxido de carbono y un 79% de nitrógeno. Existen a demás, otros gases en cantidades muy pequeñas que no tienen importancia fisiológica (37).

La solubilidad del oxígeno en el agua o el plasma sanguíneo es pequeña. A una  $PO_2$  de 100 mmHg 100 ml de plasma contienen aproximadamente 0.30 ml  $O_2$  en solución, pero a esta misma  $PO_2$ , 100 ml de sangre son capaces de fijar unos 20 ml de  $O_2$ . Tal diferencia se debe a la presencia de la hemoglobina, importante sustancia especializada en el transporte de los gases respiratorios. El consumo de oxígeno del cuerpo humano en el reposo físico es del orden de los 250 ml/min, si la sangre no poseyera hemoglobina, pasa satisfacer esta demanda deberían circular cada minuto unos 80 litros. Durante el ejercicio, el consumo de oxígeno del cuerpo puede aumentar diez veces o más, y por consiguiente en estas condiciones el volumen minuto cardíaco debería ser del orden de los 800 litros (18).

La característica más sobresaliente de la hemoglobina, desde el punto de vista respiratorio, es su capacidad para combinarse en forma reversible con el oxígeno libre. (18) La hemoglobina, se convierte fácilmente en oxihemoglobina en presencia del oxígeno atmosférico. La hemoglobina contiene el grupo hem unido por su átomo de hierro a la proteína, globina (34), por cada átomo de Fe la hemoglobina fija una molécula de oxígeno. La forma reducida de la hemoglobina (Hb) está hidratada, y la forma oxigenada ( $HbO_2$ ) tiene la molécula de agua sustituida por un átomo de oxígeno. Las moléculas de agua y de oxígeno son fácilmente desplazadas por el monóxido de carbono que forma un compuesto fácilmente disociable, la hemoglobina del monóxido de carbono. Esta reacción es la causa de las propiedades tóxicas del gas monóxido de carbono (34).

## II.2.0. HEMOGLOBINA

### CARACTERISTICAS Y COMPOSICION

El elemento más importante en el eritrocito es la hemoglobina, proteína pigmentada de rojo, que da a la sangre su color rojo característico. La molécula tiene un peso de 64,500 d. comprende 4 cadenas de globina y 4 moléculas de hemo (3).

El grupo hemo es una porfirina que comprende un átomo de hierro. La porfirina o protoporfirina III comprende ella misma: 4 anillos pirrol con extremo nitrogenado, unidos por puentes meteno (-CH=); 8 cadenas laterales; metil, vinil o ác. propiónico (3).

El hierro está situado en el centro, fijado a los cuatro nitrógenos de los grupos pirrol y quedándole 2 vecindades libres. La molécula es plana. Figura. 1.

Las globinas son un conjunto de 4 cadenas polipeptídicas por cada molécula de hemoglobina, dos  $\alpha$  y dos  $\beta$  para la hemoglobina A, que es la que tomamos como tipo para la descripción. (43,50)

Globina de la Hb A =  $\alpha_2\beta_2$

Cada cadena es un polipéptido, es decir esta constituida por a.a. (146 para la cadena  $\beta$  y 141 para la cadena  $\alpha$ ) unidos por uniones peptídicas (estructura primaria). La cadena así formada, se enrolla sobre si misma en un espiral para realizar una estructura secundaria en hélice. (estructura secundaria). Las uniones de diversa naturaleza entre aminoácidos puestos en contacto por las curvaturas de la molécula la estabilizan (estructura terciaria). Finalmente la unión de dos cadenas  $\beta$  y dos cadenas  $\alpha$  forman una molécula simétrica globular es la estructura cuaternaria (3).

La estructura de cada cadena de globina dispone de una region hidrófoba, en la cual se aloja una molécula de hemo. La aproximación se realiza, por una parte, por las uniones que intercambian las cadenas laterales de propiónico del hem y la globina; por otra, el hierro, que dispone de dos valencias libres: Una la fija directamente a la globina sobre un residuo de histidina llamado "proximal", la otra actúa por la cara opuesta a la molécula del hemo fijando una molécula de



oxígeno, y gracias a su acción se asegura una aproximación suplementaria sobre otro residuo de histidina llamado "distal", de la globina. Figura.2 (3).

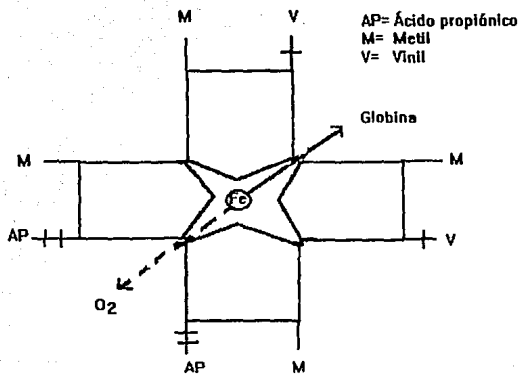


FIGURA.1. MOLECULA DEL GRUPO HEMO.

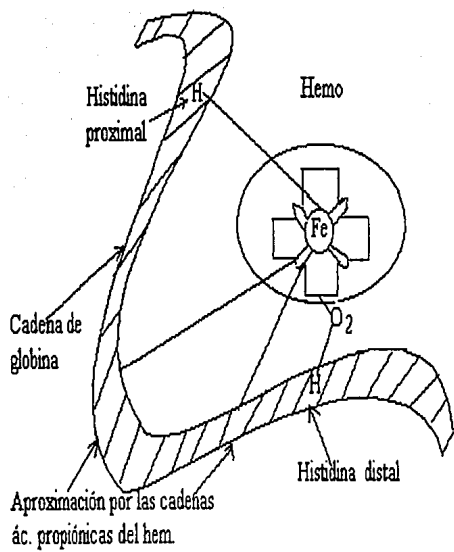


FIGURA 2. Las uniones hemo-globina.

Cada subunidad de la hemoglobina está constituida por una cadena de globina con su molécula de hemo, se unen entre ellas por enlaces de hidrogeno primariamente, aunque también intervienen enlaces salinos y fuerzas de van der Waals. Figura.3.

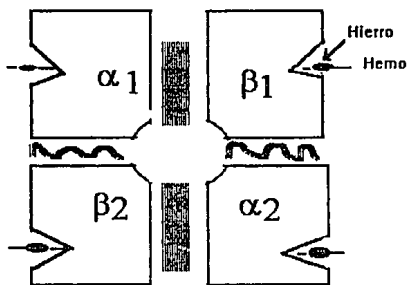


FIGURA.3. Esquema de la molécula completa de hemoglobina.

Las funciones que realiza la hemoglobina son las siguientes:

- Transporte de oxígeno de los pulmones a los tejidos, y el bioxido de carbono de los tejidos a los pulmones.
- Participa en la regulación ácido-base, eliminando  $\text{CO}_2$  en los pulmones y amortiguando los cambios de pH por acción de los grupos histidina imidazol de la hemoglobina.

La hemoglobina contiene al rededor de 1.34 ml de oxígeno por gramo, la masa de eritrocitos de un adulto contienen unos 600g de hemoglobina, capaz de transportar 800 ml de oxígeno (44).

## II.2.1. SINTESIS DE HEMOGLOBINA

### II.2.1.1. SINTESIS DEL GRUPO HEMO.

En las células corporales excepto en los eritrocitos maduros, pero sobre todo en los precursores eritroides, la succinil coenzima A se condensa con la glicina para formar un compuesto intermedio inestable, el ác.  $\delta$ -amino levulinico (ALA).

Esta condensación requiere fosfato de piridoxal (vitamina B6) y debe tener lugar en las mitocondrias intactas. Figura.4 (11).

Dos moléculas de ALA se condensan para formar un monopirrol, el porfobilinogeno, catalizadas por la enzima ALA-deshidrogenasa. Para formar el uroporfirinógeno III o I, reaccionan 4 moléculas de porfobilinógeno (Figura.5). El tipo de isómero III se convierte por la vía del coproporfirinógeno III y el protoporfirinógeno lo hace en protoporfirina. El hierro se inserta en la molécula de protoporfirina mediante la enzima mitocondrial ferroquelatasa para formar la molécula del hem completa (11).

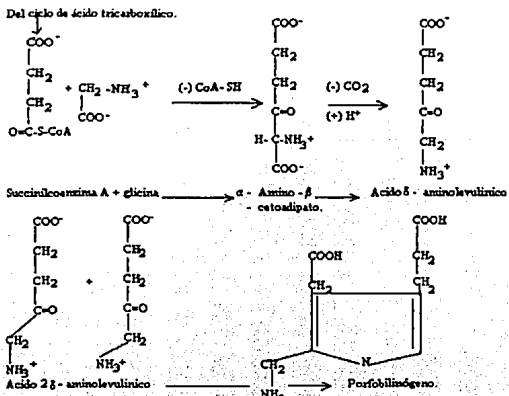


FIGURA. 4. Formación de porfobilinógeno a partir de la succinilcoenzima A y de la glicina.

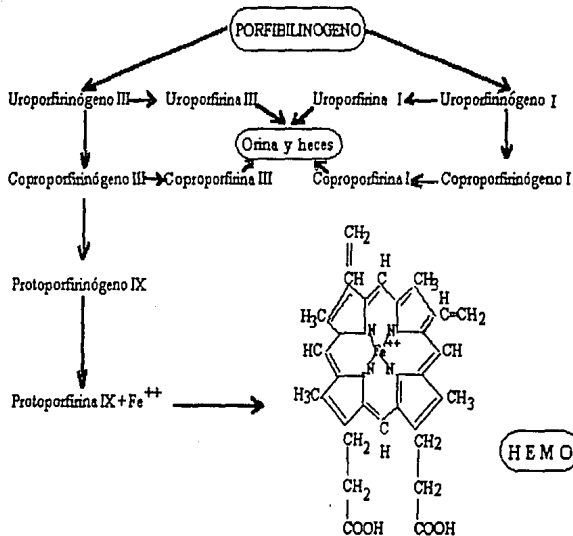


FIGURA. 5. Formación del hemo a partir del porfobilinogeno.

### II.2.1.2 SINTESIS DE GLOBINA

La síntesis de la globina se produce en el citoplasma de los eritroblastos y de los reticulocitos. Según la síntesis proteica, las cadenas de polipéptidos (que constituyen la parte proteica de la hemoglobina) se originan en los ribosomas de las células jóvenes de la serie eritroide (11).

Las pequeñas moléculas específicas de sRNA (RNA soluble) se unen a cada aminoácido y determinan el lugar de este aminoácido de acuerdo con el código en el mRNA (RNA mensajero). El crecimiento progresivo de la cadena de polipéptidos empieza en el grupo amino final. Este proceso de síntesis proteica sucede en los ribosomas que están agregados como polisomas.

### II.2.1.3 ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA.

En cada molécula de hemoglobina, se inserta un grupo hemo en la región hidrófoba de una cadena de polipéptidos doblada. La hemoglobina A del adulto normal consta de cuatro grupos de hem y de cuatro cadenas de polipéptidos ( dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$  ), que forman una molécula de hemoglobina. Los átomos de hierro ferroso tienen 6 enlaces de coordinación, 4 para los nitrógenos pirrólicos del hem, 1 para el nitrógeno imidazólico de histidina de la cadena globinica ( $87\alpha$  ó  $92\beta$ ), y uno que se une reversiblemente con el oxígeno. A medida que aumenta la presión parcial de oxígeno, los cuatro grupos hem se unen respectivamente a una molécula de oxígeno.

En este proceso se da un cambio en la configuración general de la molécula de hemoglobina, y parece que esta configuración alterada favorece la interacción hem-hem con respecto a la fijación del oxígeno (11).

## II.2.2 ALGUNOS EJEMPLOS DE HEMOGLOBINAS.

**CUADRO No.1 EJEMPLOS DE HEMOGLOBINAS**

<i>Hemoglobina</i>	<i>Fórmula</i>
HbA1	$\alpha_2\beta_2$
HbF	$\alpha_2\gamma_2$
HbA2	$\alpha_2\delta_2$
HbGowers-1	$\epsilon_4$
HbGowers-2	$\alpha_2\epsilon_2$

Tomado de Císcar y Ferreras, 1980.

La hemoglobina HbA1. Es la principal hemoglobina que existe después del nacimiento; está formada por dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$ , su fórmula es  $\alpha_2\beta_2$ . A partir del quinto mes de vida constituye el 98% de la hemoglobina de la persona normal.(9)

La hemoglobina HbA2. No se conoce bien su función, pero cuando falta la HbA1 ésta la puede suplir. Contiene dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\delta$ , su fórmula es  $\alpha_2\delta_2$ . Existe en un 2.5% aproximadamente(9).

La hemoglobina fetal (HbF). Es la que se presenta en mayor cantidad durante la vida fetal, en un adulto normal constituye aproximadamente el 0.5%. Su fórmula es la siguiente:  $\alpha_2\gamma_2$  (9).

Las hemoglobinas embrionarias son Hb Gowers1 y Hb Gowers2. La hemoglobina Gowers-1 está formada por cuatro cadenas de tipo  $\epsilon$  y cuya fórmula es  $\epsilon_4$ . La hemoglobina Gowers-2 es más parecida a las otras hemoglobinas normales, contiene dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\epsilon$ , su fórmula es  $\alpha_2\epsilon_2$  (9).

## II.2.3 VIDA DEL ERITOCITO Y CATABOLISMO DE LA HEMOGLOBINA.

El tiempo de vida de los glóbulos rojos es de 120 días desde que salen de la médula ósea y penetran al torrente sanguíneo, al cabo de este tiempo se destruye bajo la acción del sistema

retículo endotelial, ya sea por fragmentación, hemólisis o fagocitosis, o bien por combinación de estos mecanismos (14).

Aunque los eritrocitos maduros no tienen núcleo ni tampoco mitocondrias o retículo endoplasmático, no obstante contienen aún enzimas citoplasmáticas capaces de metabolizar glucosa por el proceso glucolítico, formando así pequeñas cantidades de ATP (14).

Por otro lado puede formarse un poco más de ATP utilizando una vía llamada derivación de la hexosa monofosfato, seguida de la formación oxidativa de ATP, éste sirve a los eritrocitos en varias formas importantes: (14)

- 1) Conserva la flexibilidad de la membrana celular.
- 2) Asegura el transporte de iones de la membrana.
- 3) Conserva el hierro de la hemoglobina celular en forma ferrosa, en lugar de férrica. (Que causa la formación de M<sub>Hb</sub>, que no transporta oxígeno).
- 4) Evita la oxidación de las proteínas de los eritrocitos.

Sin embargo, estos sistemas metabólicos del glóbulo rojo son cada vez menos activos con el tiempo. Cuando las células envejecen sus procesos vitales simplemente se desgastan.

Cuando la membrana celular se ha vuelto muy frágil, se rompe al atravesar algún lugar estrecho en la circulación; muchas de las células rojas se fragmentan en el bazo, cuando se extirpa el bazo el número de células anormales y células que circulan en la sangre aumenta considerablemente (3).

La hemoglobina liberada de las células que se rompen, es sustraída del plasma principalmente en el hígado, moderadamente en la médula ósea y escasamente en el bazo y otros órganos. En un primer paso la hemoglobina se transforma en verdohemoglobina (biliverdina-globina), posteriormente se separan el hierro y la globina de la biliverdina y ésta se transforma en bilirrubina, la cuál es tomada por la celdilla hepática y excretada en la bilis; el hierro y la globina son utilizados otra vez en el metabolismo de nueva hemoglobina. Figura.6 (3).



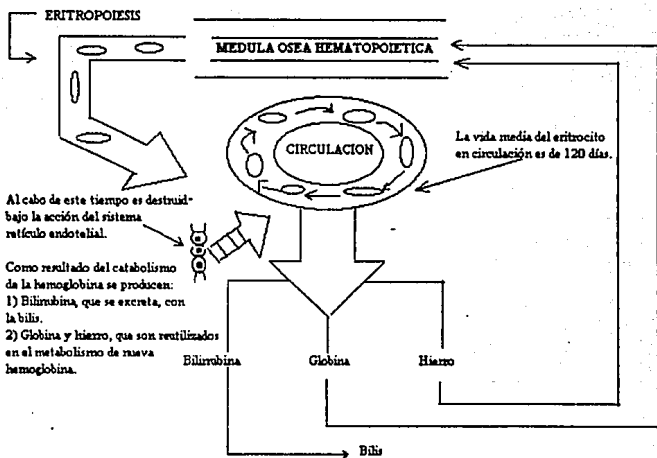


FIGURA.6. Vida del eritrocito y catabolismo de la hemoglobina.

### II.3.0 METABOLISMO DEL HIERRO.

El hierro se reduce o se oxida de forma reversible muy fácilmente. Se incorpora a numerosas proteínas de importancia crítica para el mantenimiento tanto de la vida vegetal como animal.

Las proteínas de las que forma parte el hierro y que posee el hombre, se pueden agrupar ampliamente como proteínas hem, flavoproteínas de hierro y un grupo heterogéneo de proteínas que contienen el hierro en una gran variedad de configuraciones moleculares. Entre las proteínas hem figuran la Hb, mioglobina, los citocromos y citocromo oxidasa peroxidasa y catalasas.

Las flavoproteínas de hierro, incluyen la citocromo C reductasa, succinato deshidrogenasa, NADH-deshidrogenasa, acilcoenzima A deshidrogenasa y xantinoxidasa (17).

La cantidad total de hierro en el cuerpo es en promedio de 4g; aproximadamente el 65% de este hierro se encuentra en forma de hemoglobina, el 4% aproximadamente se encuentra en forma de mioglobina; el 1% en forma de las diversas enzimas de hem que controlan la oxidación intracelular; el 0.1% en forma de transferrina en el plasma sanguíneo, el 15 a 30% aproximadamente es almacenado principalmente en forma de ferritina y hemosiderina (2,39).

#### II.3.1 TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE HIERRO.

El hierro al ser absorbido por el intestino delgado se combina inmediatamente con una globulina  $\beta$  para dar origen a un compuesto llamado transferrina, en cuya forma es transportado por el plasma sanguíneo, sólo se absorben pequeñas proporciones del mismo. Por otra parte, si sólo se dispone de pequeñas cantidades de hierro prácticamente todo será absorbido.

Cuando el cuerpo queda saturado de hierro, de manera que prácticamente toda la apoferritina en zonas de reserva de hierro está combinado con él, la intensidad de absorción del hierro por el tubo digestivo disminuye considerablemente. Por otra parte, cuando las reservas del hierro están vacías la intensidad de absorción aumenta considerablemente, 5 o más veces el valor que tiene

cuando las reservas del hierro están saturadas. Así pues, el hierro corporal total está regulado por alteraciones en la intensidad de la absorción (17).

### II.3.2 MECANISMOS DE RETROALIMENTACION QUE REGULAN LA ABSORCION DE HIERRO.

Cuando prácticamente toda la apoferritina del cuerpo a quedado saturada de hierro, resulta difícil que la transferrina libere hierro para los tejidos. En consecuencia, la transferrina, que normalmente está saturada en una tercera parte con hierro, ahora queda casi totalmente unida a éste, de manera que casi no acepta nada de hierro de las células de la mucosa.

Como etapa final del proceso, la acumulación de un exceso del elemento en las células de la mucosa deprime la absorción activa del metal, desde la luz del intestino y al mismo tiempo, estimula la excreción de hierro por la mucosa (9,44).

Desafortunadamente, aún no se conoce los detalles del método por el que el exceso de hierro deprime su absorción activa por la mucosa, aunque se han propuesto muchas teorías diferentes. Recientemente se sugiere un mecanismo muy probable de control en la absorción del hierro, basado en la capacidad de la transferrina para aceptarlo de las células de la mucosa epitelial, cuando la transferrina está saturada con hierro, no es posible aceptar más, de tal forma que su absorción disminuye considerablemente (9).

### II.3.3 FUENTES Y REQUERIMIENTOS DE HIERRO.

Las principales fuentes de hierro son las vísceras animales, hígado, corazón, riñón y bazo. Por su contenido de hierro son importantes también, la yema de huevo, carnes, pescados, los cereales,

frutas (granada y melocotón), legumbres (habas y lentejas ), verduras y hortalizas (coliflor y rábanos). El preparar los alimentos en utensilios de hierro es considerado un aporte del elemento.

El requerimiento de hierro varía de 0.5 a 1.5mg en cuanto al que es absorbido, el cuál viene contenido en una dieta que puede tener de 10 a 25mg de hierro.

A nivel de mucosa duodenal, el hierro penetra en forma ferrosa en el epitelio intestinal, una vez en las células de la mucosa, enseguida se oxida y se convierte en hidróxido férrico insoluble micelar. Las micelas de hidróxido férrico, se unen a una proteína endocelular que se denomina apoferritina, en la que el hierro queda depositado en forma férrica (9).

#### II.4.0 PIGMENTOS HEMOGLOBINICOS ANORMALES

Las dos hemoglobinas, la oxihemoglobina y la hemoglobina reducida, pueden convertirse fácilmente en hemoglobinas anormales, por acción de agentes externos.

La carboxihemoglobina se forma debido a la afinidad que tiene la hemoglobina por el monóxido de carbono (CO).

La sulfahemoglobina es producto de la acción de sulfuros inorgánicos sobre la hemoglobina.

Por otro lado la metahemoglobina se origina por agentes tóxicos (cloratos, nitratos, etc.,) que son capaces de oxidar al ión  $Fe^{2+}$  de la molécula de hemoglobina.

#### CARBOXIHEMOGLOBINA.

La hemoglobina tiene la capacidad de combinarse con el oxígeno así como también con el monóxido de carbono (CO), existiendo mayor afinidad por el CO siendo 210 veces más que por el

oxígeno. Ello significa que el monóxido de carbono se fija a la hemoglobina aún en concentraciones en el aire tan bajas como el 0.02 al 0.40%.

La carboxihemoglobina es incapaz de transportar oxígeno, originando hipoxia en los tejidos. Algunos de los síntomas de la intoxicación con este gas son dolor de cabeza, vértigo, debilidad muscular y náuseas. Se presenta este tipo de intoxicación por efecto de la inspiración del humo de aparatos de combustión, como los coches, por ejemplo.

La intoxicación puede darse de forma masiva dando la muerte que se produce rápidamente, la forma crónica es poco frecuente, la más común es la subaguda, produciéndose alucinaciones, somnolencia, a veces estado como de embriaguez, que llevan pronto a un estado de coma, edema pulmonar, hemorragias petequiales .

Para el tratamiento se administra oxígeno, transfusión, respiración artificial, azul de metileno, etc (9,11).

### SULFAHEMOGLOBINA.

La sulfahemoglobina es un compuesto que se origina de la acción de los sulfuros inorgánicos y el peróxido de hidrógeno sobre la molécula de hemoglobina. Su composición química es desconocida, pero se supone que entra en la molécula de hemoglobina un átomo de azufre y que el enlace entre la globina y el hemo sufre un cambio.

La molécula es estable, la reacción es irreversible, la sulfahemoglobina no puede transportar oxígeno pero si combinarse con el CO para formar carboxihemoglobina. La sulfahemoglobina se acompaña casi siempre de la presencia de metahemoglobina en la sangre.

Se puede desencadenar por la presencia de tóxicos como las sulfamidas, la fenacetina, la acetilamida, la acetilnilida, etc. El cuadro clínico se presenta como anorexia, cianosis, cefaleas y estreñimiento; el tratamiento consiste en separar el tóxico, la administración de azul de metileno y el ácido ascórbico no son útiles porque la unión con la hemoglobina es irreversible (21).

## METAHEMOGLOBINA

La metahemoglobina (ferrihemoglobina) se forma por la oxidación del pigmento normal de la sangre, la hemoglobina; en la cual el ion Fe pasa de un estado reducido (divalente) a un estado oxidado (trivalente) (15).

Esta sustancia es de un color rojo pardo, produce cianosis periférica y los efectos variables de anoxia de los tejidos. El eritrocito que contiene metahemoglobina no es apto para la oxigenación, pero no es deficiente en otros aspectos; su morfología, resistencia osmótica y mecánica es normal (9,10).

La metahemoglobina se considera un pigmento temporalmente inerte y reversible. El hombre normal posee pequeñas cantidades de metahemoglobina que va del 1 al 2 % de la hemoglobina. Esta concentración se mantiene gracias a que la metahemoglobina que continuamente se forma sufre al mismo tiempo una reducción a hemoglobina, este proceso permite mantener un elevado nivel de hemoglobina en el eritrocito normal.



Forma reducida  $\xleftarrow{\text{reducción}}$  Forma oxidada

Hb

MHb

La metahemoglobina puede ser resultado de la exposición a drogas o sustancias, las cuales incrementan la oxidación y que pueden inhibir los mecanismos dentro de los eritrocitos, que protegen a la hemoglobina contra la oxidación. Una vez que la metahemoglobina es formada dentro del eritrocito puede ser reducida a hemoglobina por enzimas o reacciones químicas. La metahemoglobina también puede ser resultado de la incapacidad para reducir a la metahemoglobina (25,43).

#### II.4.1 MECANISMOS QUE PROTEGEN LA EXCESIVA FORMACION DE MHH.

En el organismo existen ciertos mecanismos que impiden que la hemoglobina se oxide en demasiada cantidad. La oxigenación de la sangre protege paradójicamente a la oxidación de la hemoglobina o sea, que el oxígeno molecular no tiende a oxidar la hemoglobina.

La hemoglobina dentro de los eritrocitos esta mejor protegida de la oxidación que la hemoglobina hemolizada (9,19).

Un mecanismo químico protector parece estar constituido por el *glutatión*, este mecanismo esta ligado indirectamente al *metabolismo de la glucosa*.

En los glóbulos rojos existe una tendencia mínima a formarse productos oxidados, uno de ellos es el peróxido de hidrogeno, este producto es capaz de oxidar la hemoglobina. Pero existe un mecanismo que lo dificulta, este mecanismo se establece por el NADH que se ha formado por el paso de la glucosa-6-P a 6-P-gluconato por acción de la glucosa-6-Pasa. El NADH aquí actúa sobre el glutatión al que reduce pasandolo a agua, o sea el peróxido de hidrogeno pasa a agua (cediendo oxígeno).

Con la desaparición del peróxido se anula la posibilidad de que éste peróxido actúe sobre la hemoglobina y la oxide a metahemoglobina. Se trata de un mecanismo complejo de oxidorreducción con conseción de energía; la oxidación de la glucosa-6-P a 6-PG condiciona la reducción de la NAD que pasa a NADH; éste transformara el glutatión oxidado a la forma simple reducida ( $GS-GS \rightarrow 2GSH$ ) y está reducción se establece sobre el óxido, evitando que éste peróxido produzca una posible oxidación de la hemoglobina, a la que transformaria en metahemoglobina (9,11).

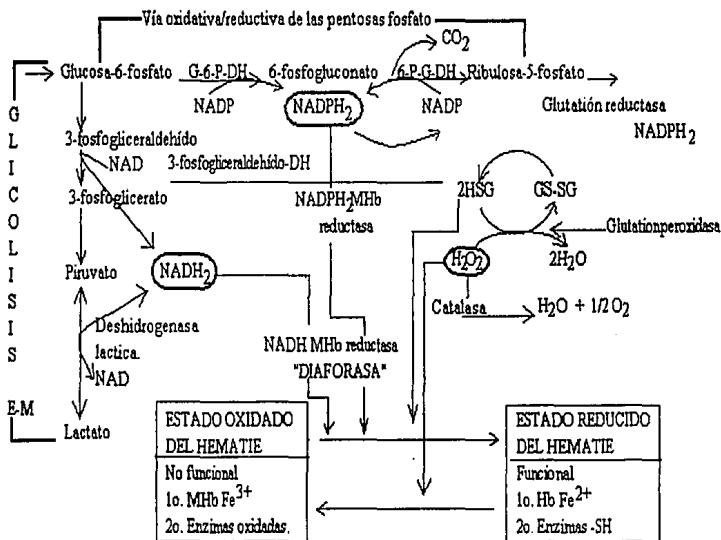


FIGURA. 7. Mecanismos de protección contra la oxidación. Davidson, I. 1986.

A la izquierda la vía de Embden-Meyerhof (E-M). Parte superior, vía de las pentosas fosfato.

En medio mecanismos de oxido-reducción, y en la parte inferior representación de su efecto sobre el eritrocito.



## II.4.2 MECANISMOS DE REDUCCION DE MHb A Hb

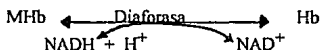
En la vía de Embden-Meyerhof existen dos pasos que están muy relacionados con la reducción de la MHb y son los siguientes:



Y en la última fase de este ciclo existe un proceso energético semejante pero invertido:



El NADH puede actuar sobre la molécula de MHb a la que reduce. esta reducción es muy lenta y por ello Gibson sostiene que existe un portador intermediario que acelera la reacción; se trata de la NADH-Metahemoglobina reductasa o *DIAFORASA*, que existe en el eritrocito humano normal.



En ciertos pasos de la glucólisis se forma NADH a partir de NAD; este NADH va a actuar sobre la molécula de MHb añadiéndole  $\text{H}^+$  y posteriormente reduciéndola a Hb, esta reacción esta acelerada por la enzima *diaforasa*.

Los mecanismos que hemos mencionado prácticamente dependen de la degradación de la glucosa que puede darse tanto por la vía de Embden-Meyerhof, como a través de la vía de las pentosas fosfato; en el paso de glucosa-6-P a 6-P-gluconato el NADP pasa a NADPH,(figura.7) y la

misma reducción existe en el paso de la 6-P-gluconato a ribulosa -6-P. El NADPH que se forma puede contribuir a reducir la MHb y así mismo en este punto se habla de una enzima: La NADPH-Metahemoglobina reductasa o también denominada hemoglobina reductasa (9,15).

#### II.4.3. SISTEMAS REDUCTORES DE METAHEMOGLOBINA.

En orden de importancia y expresado en porciento de la capacidad de reducción de MHb del eritrocito, dichos sistemas reductores son: *NADH-Meta hemoglobina reductasa (diaforasa) 70%* ; *ácido ascorbico 12%* ; *glutatión reducido (GSH) 2%* y *NADPH-Metahemoglobina reductasa 2%*.

La diaforasa es el principal sistema de reducción de la MHb y la falta o una notable deficiencia de ésta enzima es acompañada de metahemoglobinemia.

El ácido ascorbico, logra una reducción directa, pero lenta de la MHb y en concentraciones normales (1 mg /100 ml de G.R) interviene poco o nada en la prevención de la formación de MHb. De igual modo, el glutatión reducido, cuya concentración en el eritrocito es de 70 mg/100ml y el NADPH reducen lentamente la metaemoglobina.

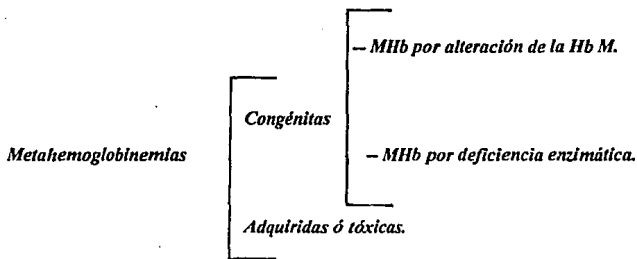
El ácido ascorbico, el glutatión reducido y la NADPH-Metahemoglobina reductasa son sistemas de reserva que solo tienen actividad efectiva cuando la tasa de reducción de metaemoglobina es baja, y por tanto, se tiene una concentración muy superior al 2% de metaemoglobina que se considera normal (24,40).

La metaemoglobina reductasa, utiliza el NADH que se genera en la reacción de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, para reducir el hierro de la metaemoglobina, desde la forma trivalente ( $Fe^{3+}$ ) a la forma divalente ( $Fe^{2+}$ ).

## II.5.0 ETIOLOGIA DE LA METAHEMOGLOBINEMIA.

Las metahemoglobinemias son aquellos estados patológicos que se caracterizan por mostrar elevada cantidad de pigmento sanguíneo con el hierro ya del todo oxidado, en forma trivalente  $Fe^{3+}$ , e ineficaz para el transporte de más oxígeno. El individuo normal posee menos de 2% de metahemoglobina.

En general las metahemoglobinemias no deparan hemolisis graves y únicamente se caracterizan por motivar una insuficiente oxigenación de los tejidos con cianosis.(10). Las causas de metahemoglobinemia son variables también los síndromes clínicos ofrecen distintos aspectos. Se pueden clasificar de la manera siguiente:



### II.5.1 METAHEMOGLOBINEMIAS CONGENITAS.

Estas metahemoglobinemias pueden ya aparecer en el momento de nacer, o establecerse a los pocos meses, son de dos tipos distintos en cuanto a su etiología.

Una dominante, debida a la presencia de metahemoglobina M, que no mejora con azul de metileno; se conocen varias Hb M con numerosas variantes ( HbM Boston , con las variantes sueca, alemana y japonesa; HbM Saskatoon; HbM Milwaukee I y II ; HbM Iwate ).

Otra resesiva, por deficiencia enzimática, que se corrige en parte con el azul de metileno.(9)

#### II.5.1.1. METAHEMOGLOBINA HEREDITARIA POR HbM.

Este tipo de MHb es rara y existe únicamente en la forma heterocigota, la forma homocigota probablemente no es compatible con la vida (14).

Las hemoglobinas M (HbM) difieren de la hemoglobina normal del adulto (HbA) por la sustitución de un aminoácido (histidina) en las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$ . En las hemoglobinas M, el a.a. sustituido parece encontrarse cerca del hierro del grupo hem, al cuál transforma y cuyo átomo de hierro pasa a la forma oxidada, férrica, sin poder volverse a la forma ferrosa.

Se han separado cinco tipos de HbM:(9)

- *La HbM Boston* .- Posee en la cadena  $\alpha$  un residuo 58 (posición E7) con sustitución en la histidina distal por tirosina.

- *La HbM Saskatoon*.- Su alteración es muy similar a la anterior y esta en la cadena  $\beta$  ya que posee un residuo 63 ( en la misma posición E7), también una tirosina en lugar de la histidina distal. Ambas hemoglobinas poseen el mismo cambio y en la misma posición (E7 o histidina distal), lo que varía es la cadena. En ambas hemoglobinas el grupo fenólico de la tirosina forma un complejo con el hem, que permanece en forma oxidada (9).

- *La HbM Milwaukee*.- Posee la alteración no en la histidina distal, pero sí en su vecindad, pues el cambio está en el residuo 67 (posición E11) de la cadena  $\beta$ , cambiando una valina por el ác.glutámico y en este caso se establece interacción entre el radical carboxilo de este ácido y el ion hierro del hem, que permaneciera en el estado oxidado (9).

Tanto la *HbM Iwate* como la *HbM Hyde park*, presentan sustitución en la histidina proximal. Primeramente la HbM Iwate, presenta en la cadena  $\alpha$ , residuo 87, posición F8, una sustitución de la histidina por valina. Por su parte HbM Hyde park, presenta la misma sustitución en la cadena  $\beta$ , residuo 92 misma posición F8; ambas hemoglobinas poseen un cambio en la histidina proximal, que se sustituye por el a.a. tirosina. Las causas por las que se produce metahemoglobinemia en estas dos hemoglobinas anormales, son difíciles de aclarar, en primer lugar parecería que la falta de histidina proximal del hem, que es su principal sostén tendría que privar el enlace de este hem con la molécula de globina (9).

Lo que sucede es que cuando la tirosina reemplaza a esta histidina proximal, la acción de enlace es entonces sustituida por la histidina distal, la cuál es la que hace de verdadero enlace químico, o sea que cambia la acción de ambas histidinas, pasando la función principal de unión a la histidina distal (cuya acción normalmente era secundaria) y por otro lado la tirosina (que sustituye a la histidina proximal), por medio del grupo fenólico forma un enlace secundario con el hem, cuyo hierro fija en forma oxidada trivalente (9).

**CUADRO No.2 TIPOS DE HEMOGLOBINAS M.**

HEMOGLOBINA	CADENA	SUSTITUCION		
		Hist.prox.	Hist.distal	Vecindad Hist.dist.
HbM Iwate	$\alpha$	Tyr.	---	---
HbM Hyde park	$\beta$	Tyr.	---	---
HbM Boston	$\alpha$	---	Tyr.	---
HbM Saskatoon	$\beta$	---	Tyr.	---
HbM Milwaukee I	$\beta$	---	---	67 Val.---->Glu.

Tomado de Ciscar y Farreras, 1980.

## II.5.1.2 CLASIFICACION DE METAHEMOGLOBINAS

Existen tres sistemas de reducción en los eritrocitos:

1) La glutatión reductasa, que transforma GSH en GS-SG con lo que reduce el peroxido, esta ligado a varias enzimas, especialmente a la G-6-PDasa.

2) La NADPH-MHb reductasa que depende de vía de las pentosas.

3) La diaforasa o NADH-MHb reductasa, que depende de la vía de Ebbden-Meyerhof.

Son tres enzimas, tres lugares que pueden fallar por la correspondiente deficiencia y por lo tanto 3 posibles síndromes disenzimaticos.

### *1) Metahemoglobinemia por síntesis inadecuada de glutatión.*

Se trata de un síndrome excepcionalmente raro y del cuál se ha descrito un caso familiar por Townes y Lovell. Se hereda como rasgo dominante y existe una deficiencia en la actividad de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, consecutivamente una generación insuficiente de NADH, y con ello un fallo de uno de los mecanismos de reducción de la metahemoglobina (18).

### *2) Deficiencia de metahemoglobina reductasa.*

Se trata de la NADH-MHb reductasa, existe el caso familiar descrito por Muller y col. la herencia aun no esta bien determinada.

La NADPH-MHb reductasa, fue el primero de los dos sistemas ( NADPH Y NADH) enzimático en ser descubiertos. Tiene una estimación probable de aproximadamente del 5% al 9% de la actividad de reducción a la hemoglobina de células rojas normales, además una deficiencia congénita de la enzima no conduce a metahemoglobinemia (14,18).

### 3) Deficiencia de diaforasa

De estas tres deficiencias, la que tiene mayor importancia y de la que se tiene mayor conocimiento es la deficiencia de NADH-MHb reductasa o DIAFORASA.

Esta enzima es dependiente de la glucólisis por el ciclo de Embden-Meyerhof que normalmente reduce la metahemoglobina a hemoglobina en el interior del eritrocito, esta deficiencia se descubrió en los esquimales de Alaska (Scott y Hoskins), pero después se han descrito casos en norteamericanos, europeos y puertorriqueños (9).

Los heterocigotos con respecto a la deficiencia de NADH-diaforasa no son usualmente metahemoglobinicos clínicamente. En los glóbulos rojos existe una tendencia mínima a formarse productos oxidados, uno de ellos es el peróxido de hidrógeno, éste producto es capaz de oxidar la hemoglobina, pero existe un mecanismo que lo dificulta; este mecanismo se establece por el NADPH que se ha formado por el paso de la glucosa-6-P a 6-fosfogluconato, por acción de la glucosa-6-PDasa, el NADH que actúa sobre el glutatión (GS-SG) al que reduce pasándolo a agua, o sea peróxido de hidrógeno pasa a ser agua (cediendo oxígeno) con la desaparición del peróxido se anula la posibilidad de que este peróxido actúe sobre la hemoglobina y la oxide a metahemoglobina (9,16,22).

Se trata de un mecanismo complejo de oxidorreducción con consecución de energía, la oxidación de la Glucosa-6-P a 6-PGluconato, condiciona la reducción de la NADP que pasa a NADPH este transforma el glutatión oxidado a la forma simple reducida (GS-SG) a (2GSH) y esta reducción se establece sobre el oxido evitando que este peróxido produzca una posible oxidación de la hemoglobina a la que transformaría en metahemoglobina (9).

La NADH-MHb reductasa era conocida anteriormente como difosfopiridin nucleotido-diaforasa (DPNH-diaforasa), también se le conoce como NADH-diaforasa o NADH-deshidrogenasa (9,36).

Esta enzima utiliza el NADH que es el sistema electrodonador que se genera en la reacción de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa para reducir el hierro de la metahemoglobina desde la forma trivalente a la divalente (4,15). La NADH-MHb reductasa ha sido aislada y purificada 129000 veces, la enzima tiene un peso molecular de aproximadamente 30000 D (30,31).

El NADH-MHb reductasa existe en forma soluble en el citoplasma del eritrocito. Scott y McGraw demostraron que la enzima es una flavoproteína que tiene flavin adenin dinucleotido, el cual es un grupo prostetico que no causa la reducción de la MHb directamente, ya que requiere un factor para el transporte de electrones para la reducción enzimática de la MHb (9,31).

## II.5.2 CARACTERISTICAS DE NADH-DIAFORASA I Y NADH-DIAFORASA II.

En la literatura se señala que se encuentran dos enzimas las cuales utilizan el NADH, la NADH-diaforasa I que es responsable de poseer la facultad de reducir cerca del 90% de la MHb del sistema ligado al NADH (31,33,42).

Por otro lado la NADH-diaforasa II, que se encarga del 10% restante de la capacidad de reducir la MHb en el sistema ligado al NADH (22).

Se ha llegado a la conclusión de que la NADH-diaforasa I es solo la MHb-reductasa con un papel fisiológico en el eritrocito.

Cuando se determino la actividad de NADH-diaforasa I en extractos metahemoglobinemicos de células rojas esta fue menor a un 3%. La enzima metahemoglobinemica es similar a la enzima normal con respecto a la afinidad por el colorante, la afinidad por NADH y los efectos del fosfato sobre esta actividad y a pesar de que el comportamiento de este estudio cromatografico es normal, esto no indica que la enzima lo sea(30,31).

La actividad de la NADH-diaforasa de hemolizados metahemoglobinemicos, a sido ensayado en varias concentraciones, observando que la actividad enzimática, parece ser proporcional a la



concentración de fosfato. En hemolizados de sujetos normales, también se observa que se da una activación, después de estar inicialmente deprimida a concentraciones bajas de fosfato.

Se tienen reportes de que para ambas preparaciones, ya sea normal o metahemoglobinémica, la actividad enzimática se ve deprimida, cuando la concentración de fosfato está por debajo de una concentración de 0.4 M y por el contrario se observa un incremento paralelo de la actividad, cuando la concentración de fosfato se incrementa (23,27,36).

### II.5.3 DIFERENCIAS ENTRE NADH-DIAFORASA Y NADPH-DIAFORASA.

Además de NADH-MHb reductasa, los eritrocitos también contienen un sistema de reducción ligado al NADPH denominado, NADPH-MHb reductasa; sin embargo este sistema funciona solo en presencia de un transportador artificial de electrones tal como el azul de metileno.

La reducción no enzimática de la MHb es responsable solo de una pequeña proporción de la frecuencia total de reducción de la MHb en los eritrocitos.

La NADH-MHb reductasa es mucho más activa que la enzima NADPH-dependiente, así la deficiencia de NADPH-MHb reductasa no da lugar a sintomatología clínica, siempre que la actividad de la NADH-MHb reductasa de los eritrocitos sea normal.

La NADH-MHb reductasa de los eritrocitos, purificada unas 1000 veces tiene un pH óptimo de 5.2, la enzima es específica para el NADH, salvo en presencia de otros aceptores de electrones, tales como el azul de metileno o el citodromo-C, en cuyo caso se produce un cierto grado de reacción con el NADP (27,30,31).

La NADPH-deshidrogenasa de los eritrocitos humanos es una enzima no flavínica, esta enzima requiere de azul de metileno, como acarreador de electrones, para llevar a cabo la reducción de la MHb (30).

El peso molecular de la enzima NADH-dependiente, es de 30000 D. y el de la enzima NADPH-dependiente es de 20000 D. La electroforesis de las diaforasas eritrocitarias demuestra la existencia de cinco bandas cuando se utiliza como donador de electrones el NADH y de siete a

ocho bandas empleando NADPH. En un caso de metahemoglobinemia se apreciaron unas diaforasas NADPH-normales, careciendo en cambio 3 de las bandas de diaforasas NADH. (27,30)

Kaplan encontró, mediante electroforesis, una banda unica de actividad NADH-diaforasa en los eritrocitos procedentes de sujetos normales, en ese mismo trabajo la actividad de NADPH-diaforasa aparecia como una doble banda no bien resuelta; la banda de NADH se fragmentaba en tres componentes con el envejecimiento de la muestra (27).

#### II.5.4 PROPIEDADES GENERALES DE NADH-DIAFORASA.

**Especificidad:** La enzima al parecer es relativamente especifica para NADH; la enzima purificada tiene 1.5% de actividad con NADPH y el restante 98.5% para NADH.

La relativa ractividad con NADH y NADPH varia sobre diferentes fracciones de la enzima y estas variantes separan a la NADPH-Diaforasa (19).

En hemolizados de celulas normales la enzima muestra entre 10 y 15% de actividad con NADPH. La actividad de NADPH-Diaforasa, de sangre metahemoglobinemica, no fue significativamente diferente de la sangre normal (19).

**Estabilidad:** Se encuentra reportado en literatura que las preparaciones de la enzima, fueron muy estables y prácticamente no se observa perdida de la actividad durante un almacenaje a 5°C por un mes.

**Efectos del pH :** El pH óptimo para la actividad de NADH-MHb reductasa, es de 5.2 de acuerdo a experimentos realizados por Yoshiki Sugi'ta y col. esto ocurre ya sea en ausencia o en presencia de ferrocianuro. La actividad de la reductasa en ausencia de ferrocianuro decrece lentamente sobre el lado alcalino y la proporción de actividad a pH 7, fue aproximadamente del 55%, del que se obtuvo a pH óptimo (30,31).

### II.5.5 METODOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NADH-MHb REDUCTASA.

En la metahemoglobina congénita debida a la deficiencia de NADH-diaforasa, el examen de sangre revela del 8 al 40% de la Hb en estado oxidado, el análisis de la NADH-diaforasa por medio del método del diclorofenol indofenol ligado o el método usado como el complejo ferrocianuro-MHb como receptor, revela que la actividad enzimática es de menos de un 20% de lo normal.(32)

Así el método de Scott, hace que la NADH-MHb reductasa procedente de los eritrocitos lisados, catalice la reducción del 2,6-diclorofenol indofenol, siendo medida la reducción por modificación de la absorbancia de la solución a 600 nm.

El otro procedimiento, implica la reducción de la ferrihemoglobina por acción de la NADH-MHb reductasa. La ferrihemoglobina esta formada por oxidación de los hemolizados, por acción del ferricianuro, se genera así un complejo ferrihemoglobina-ferricianuro, el cuál se cree que induce una transformación de la estructura de la ferrihemoglobina.

Existe otra técnica, discriminativa del tipo de las de mancha. En ella la reducción del 2,6-diclorofenol indofenol efectuada por el NADH, es catalizada por la NADH-diaforasa. Se observa la desaparición del NADH a la luz U.V ; ya que el NADH tiene fluorescencia, la cuál desaparece al ser oxidado a NAD (9,20).

### II.5.6. METAHEMOGLOBINEMIA ADQUIRIDA O TOXICA.

La metahemoglobinemia tóxica es causada por sustancias exógenas que actúan sobre la hemoglobina, la formación excesiva de metahemoglobina, supone que el agente penetra al

eritrocito y produce la conversión de hemoglobina a metahemoglobina a una velocidad que excede a los mecanismos reductores de metahemoglobina existentes en la célula.

Las sustancias exógenas pueden ser de varios tipos como: medicamentos y sustancias químicas (9).

### CUADRO No.3 ALGUNOS AGENTES CAUSANTES DE METAHEMOGLOBINEMIA.

---

Acetanilida	Fenilhidracina
Aminofenol	Hidroxiquinona
Anilina	Nitratos
Antipirina	Nitritos
Benzocaina	Nitrobenceno
Clorato potásico	Nitroglicerina
Cloronitrobenceno	Sulfonamidas
Fenacetina	Subnitrato de bismuto

---

Tomado de Ciscar y Ferreras, 1980.

La oxidación del hierro puede realizarse por cualquiera de los siguientes caminos:

A) *Por acción directa de oxidantes.* Sustancias con alto potencial de oxidación, esto es superior al de oxidación/reducción de MHb/Hb, que es de 0.15v. ejemplo de este grupo son: ferricianuro, cloratos, nitratos, quinonas, algunos colorantes, etc.

B) *Por acción directa de donadores de hidrógeno en presencia de oxígeno atmosférico.* Sustancias con potenciales de oxidorreducción muy por abajo del de la hemoglobina (0.15v.), van a actuar como reductores, donadores de hidrógeno más que como oxidantes.

Esto puede ser causa del peróxido de hidrógeno que se forma durante la autooxidación del agente reducido en presencia de oxígeno, ya que en el eritrocito concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno formadas gradualmente pueden oxidar a la hemoglobina aún si esta presente una gran cantidad de catalasa.

Un segundo mecanismo que tampoco es inhibido completamente por la catalasa, consiste en la interacción de agentes donadores de hidrógeno ( $H_2A$ ) directamente con la oxihemoglobina, dando por resultado un complejo inestable, hemoglobina peróxido de hidrógeno:



Ejemplo de esto son: aminofenoles, fenilhidroxilaminas, compuestos nitrosoaromáticos etc (6,35).

C) Autooxidación. El proceso de autooxidación puede deberse a un rompimiento del intermediario de la oxihemoglobina, a su interacción con donadores de hidrógeno de la parte globina de la molécula o a una acción enzimática (6).

#### II.5.6.1 OXIDANTES DIRECTOS DE LA HEMOGLOBINA.

**Cloratos.**- La capacidad del clorato de potasio para formar metahemoglobina, antiguamente atrajo considerable atención debido al uso de este compuesto, en enjuagues bucales, gargarizantes y dentríficos.

Cuando el clorato de potasio es adicionado a la sangre in vitro, la formación de metahemoglobina es muy lenta al inicio, pero se acelera subsecuentemente. Los efectos in vivo, del clorato de potasio fueron investigados por primera vez por Marchand en 1887, el observó que los perros que recibieron dosis orales de casi 1.8 a 2.7g de clorato de potasio por Kg de peso corporal, mostraron formación de metahemoglobina en la sangre (6,32).

El clorato de potasio fue capaz de formar metahemoglobina en gatos, teniendo cuidado de que la administración de las dosis se realizaran en tiempos prolongados. Así de tres gatos que

recibieron 0.5g de clorato de potasio por Kg; dos mostraron alguna formación de metahemoglobina aunque los tres gatos murieron.

El mecanismo de formación de metahemoglobina por clorato ha sido investigado por Jung y sus asociados, que encontraron que repetidas dosis subcutáneas de 1g/Kg no producen metahemoglobina en ratas, mientras que tales dosis llevan a altas concentraciones de metahemoglobina en gatos originan la muerte de un 50 a un 80%.

El clorato que se usa en cerillos, herbicidas y antisépticos bucales, es también uno de los productos de biotransformación del hipoclorito (blanqueador domestico); se combina con pequeñas cantidades de metahemoglobina y el clorato de metahemoglobina que se forma resulta ser un potencetizador oxidativo que forma metahemoglobina. Es un efecto catalítico más que una verdadera oxidación directa, en el curso del cuál el clorato sera reducido con rapidez, cantidades relativamente pequeñas de clorato pueden formar grandes cantidades de metahemoglobina (1,6,29).

**Quinonas.-** Cannava y col. demostraron que las quinonas pueden formar metahemoglobina in vitro, así una serie de benzoquinona y derivados de naftoquinona, incluyendo derivados de benzoquinona, 2-6dicloroquinona, tolouiquinona y 1-2naftoquinona, convierten la hemoglobina a metahemoglobina directamente en sangre de perro hemolizada y no hemolizada a pH 6.8. Sin embargo, está oxidación no fue dependiente del potencial de oxido-reducción de las diferentes quinonas.

Un interesante conocimiento sobre un posible papel fisiológico de las quinonas en la formación de metahemoglobina ha sido resumido por Fishberg, que noto que la orina en estados patológicos, ocasionados casi por la deficiencia de ácido ascorbico fue capaz de producir metahemoglobina in vitro.

Se encontro que un paciente con "cianosis autotoxica enterogena" excreto grandes cantidades de benzoquinona. ác. acético, esta excreción puede ser suprimida por la administración de ác.ascorbico, y que la cantidad de metahemoglobina en sangre varia con la excreción urinaria de

benzoquinona, ác. acético y de ahí que su formación sea el resultado de un metabolismo desalineado de tirosina (6,26,35).

**Nitritos.**- Comly ha demostrado que la metahemoglobina de "origen desconocido" observada en infantes, puede ser debido a nitrato en una fuente acuosa, el cual es reducido a nitrito en el intestino. El nitrito fue encontrado por ser la causa de metahemoglobinemia en infantes que se alimentaron con espinacas.

Entre varias posibilidades de entrada de peligrosas cantidades de nitrito, la adulteración de pescado con nitrito de sodio puede ser mencionado. El salamiento de la carne continúa siendo la única fuente de envenenamiento ocasional con nitrito.

El nitrito de sodio y los ésteres orgánicos de nitritos y nitratos, el nitrito de amilo, trinitrato de glicérido, nitrito de etilo, etc. Son usados como vasodilatadores coronarios, para reducir la presión arterial y en el tratamiento de la intoxicación por cianuro, pero también pueden ocasionar metahemoglobinemia. La metahemoglobinemia provocada por nitritos se ha producido accidentalmente al ingerir alimentos que contienen cantidades excesivas de nitrito, ya que pueden ser usados legalmente para la preservación del color en el procesado de carne o ilegalmente para enmascarar o retardar la descomposición de la carne o pescado (1,6,10).

En la cinética de formación de metahemoglobina por nitrito in vitro, se observa que a bajas concentraciones de nitrito la reacción fue muy lenta. Marshall y Marshall demostraron que una rápida formación de metahemoglobina por nitrito ocurre después de un "periodo de inducción" la duración del cual depende de la concentración de nitrito.

El ác. ascórbico disminuye el inicio de una rápida formación de metahemoglobina, es incierto si reduce la metahemoglobina formada lentamente o si reacciona con el nitrito. Kakizaki y col. encontraron que a pH 7 y a concentración constante de oxihemoglobina la duración del periodo de inducción es inversamente proporcional al cuadrado de la concentración del nitrito.

Martín y Huisman, aislaron varios tipos de hemoglobina humana y encontraron que sus velocidades de reacción con nitrito difieren sustancialmente. La hemoglobina compuesta de

cadenas  $\alpha$  y cadenas  $\delta$  normales o anormales reacciona más lentamente con nitrito que Hb-A. La Hb-Barts es oxidada a una velocidad extremadamente alta (6).

Las cinéticas de formación de metahemoglobina in vivo por nitrito, fue investigada en perros y ratones. La reacción es más lenta en el ratón que en el perro.

La acción de nitrito en los glóbulos rojos parece estar limitada por un incremento en la concentración de metahemoglobina. no se observa oxidación de glutatión en presencia de una ruta de fosfato pentosa activa, si los glóbulos rojos eran incubados durante una hora con concentraciones de nitrito, muchas veces mayores que la concentración de hemoglobina (6).

**Nitrato.**- El nitrato normalmente no provoca metahemoglobinemia, no obstante muchos casos se han reportado en lactantes, cuyas preparaciones alimenticias han sido hechas con agua de pozo. En estos lactantes las enterobacterias reductoras de nitrato, lo reducen a nitrito que se absorbe y forma metahemoglobina (6,29).

Existen dos factores adicionales en estos niños pequeños, volviendolos más susceptibles que individuos de más edad. La hemoglobina fetal (HbF) forma metahemoglobina más fácilmente que la hemoglobina adulta y los recién nacidos tienen de 60 a 80% y los prematuros hasta un 90% de HbF. También hay una deficiencia relativa de hemoglobina reductasa dependiente de NADH, en el período neonatal.

Los lactantes por lo tanto pueden desarrollar metahemoglobinemia a partir de muchas drogas. se ha presentado metahemoglobinemia cuando se ha usado subnitrato de bismuto en el tratamiento de diarrea, por el uso del nitrato de antimonio como diurético y en pacientes con lesiones ulcerativas en el intestino, después de ingerir nitratos (6,28).

**Otros oxidantes directos.**- Hay muchas otras sustancias que convierten hemoglobina a metahemoglobina cuando se adicionan directamente a glóbulos rojos intactos o hemolizados, o a la hemoglobina.



Combemale, en 1891 demostro que una dosis de 500 mg de azul de metileno por Kg induce la metahemoglobinemia en perros. Nadler y col. encontraron que la inyección intravenosa de 500 mg de azul de metileno en el hombre o una dosis de casi 7 a 10 mg/Kg produce concentraciones de metahemoglobina de casi 0.4 a 8.5%.

Book reporto que la dosis subcutánea letal o casi letal de 75 mg/Kg en el perro y 100 mg/Kg en el gato y el ratón producen concentraciones de metahemoglobina que son aproximadamente de 10 a 15% casi una hora después de la inyección. Entonces la concentración de metahemoglobina disminuye y subsecuentemente en el transcurso de varios días, se eleva a niveles superiores aproximadamente de 30 a 50% de MHb ( 6).

#### II.5.6.2.OXIDANTES INDIRECTOS DE LA HEMOGLOBINA.

Hay un grupo de aminas aromáticas y nitrocompuestos, que como tales, no forman metahemoglobina a partir de hemoglobina in vitro o lo hacen muy débilmente. Así estos compuestos son la mayor parte formadores muy activos de MHb in vivo, además la posibilidad, naturalmente alcanza a tales compuestos que son metabolizados en algunos compuestos intermediarios extremadamente activos.

En los estudios in vivo, a habido diferencias en las especies de animales empleados, la dosis del compuesto, el medio en que el compuesto fue disuelto y la ruta por la que fue administrado, las veces en que fueron tomadas las muestras sanguíneas para la determinación de metahemoglobina, y la presición de los métodos por medio de los cuáles la MHb fue determinada (6).

##### *A) susceptibilidad de las especies animales.*

En la literatura se encuentran referencias a trabajos hechos con dife-entes especies animales que muestran susceptibilidad variada a la formación de MHb por un compuesto establecido.

Estudios sistémicos cuantitativos fueron realizados por Lester y Spicer. El primer trabajo estudia la máxima cantidad de metahemoglobina formada por acetanilida y acetofenitidina en varias dosis, expresada como mmoles/Kg.

Lester encontró que el gato fue más sensible, si esta especie es enlistada como 100, las sensibilidades de las otras especies son de la siguiente forma: Hombre 56, perro 29, rata 5, conejo 0, mono 0. Para acetofenitidina las sensibilidades fueron como sigue: Gato 100, hombre 63, perro 35, rata 5 (1,25,28).

De acuerdo a Spicer 15 mg/Kg de anilina producen 28.3% de MHB en el perro, 56.4% en el gato y cantidades insignificantes en la rata. El gato ha sido utilizado muy frecuentemente para la evaluación de compuestos formadores de metahemoglobina debido a la facilidad con que el pigmento es formado en esta especie (6).

#### ***B) Formación in vitro de metahemoglobina por compuestos arilamino y nitro.***

En 1913, Heubner notó que la adición directa de los aminofenoles a la sangre total llevó a la formación de MHB, la adición de 0.25 mg de orto-aminofenol a 2 cc de sangre de cerdo, equivalente a 12.5 mg /100 cc, produce una marcada banda de MHB en el espectro en 24 min.

Debido a que las proporciones en esta conversión son 0.1 mmol de orto-aminofenol y 1 mmol de Hb, Heubner calculó que una molécula del compuesto formado fue capaz de convertir 10 moléculas de hemoglobina.

Heubner también notó que la anilina y metaxilidina, pero no dimetilaniлина fueron capaces de formar metahemoglobina in vivo. Estas observaciones, llevaron a Heubner a concluir que los aminofenoles fueron un intermediario necesario en la formación de MHB in vivo.

Las hidroxilaminas son formadores activos de metahemoglobina in vitro. Ellinger, observó que la incubación de acetanilida con sangre de gato desfibrinada lleva a una gradual formación de metahemoglobina como se midió por la reducción en la capacidad de oxígeno; esto aumentó a casi 35% en el cuerpo en 48 horas. Sin embargo, no ocurre tal disminución con sangre oxalataada o

citrada, como es bien sabido, acetanilida forma metahemoglobina in vivo. La metahemoglobina no fue formada con acetil-n-metilanilina o acetil-p-toluidina in vivo o in vitro. Estas observaciones llevaron a Ellinger a concluir que la acetanilida ejerce su acción formadora de MHb, siendo convertida a acetilfenilhidroxilamina (28).

**C) Capacidad de formación de metahemoglobina de compuestos aril amino y nitro.**

Los compuestos aril amino y nitro no pueden oxidar fácilmente la hemoglobina in vitro, aparentemente la formación de metahemoglobina in vivo debe ser formada a través de algunos derivados metabólicos. Ha sido manejado que tales derivados oxidan directamente a la hemoglobina o interactúan con la oxihemoglobina para formar peróxido de hidrógeno el cual oxida a la hemoglobina.

Cuando un compuesto formador de metahemoglobina es administrado, la MHb empieza a acumularse en la sangre a un grado característico del compuesto, alcanzando una concentración máxima en la que permanece durante un período de tiempo variable y entonces empieza a disminuir. La forma específica de la curva es la resultante principal de 3 procesos:

- a) Metabolismo del compuesto a otras sustancias que no oxidan hemoglobina y las cuales, pueden ser referidas como reacciones laterales.
- b) Formación de un compuesto intermediario que reacciona directamente con hemoglobina para formar metahemoglobina.
- c) Reducción inversa de metahemoglobina  $Hb \rightleftharpoons MHb$ .

Estos tres procesos son continuos e independientes.

Los datos sobre ciertos compuestos, como los de Reiter sobre nitro-o-toluidina o de Paterson sobre nitrosobenzonol son suficientemente extensos para demostrar que la concentración de MHb aumenta conforme aumenta la dosis del compuesto hasta un punto donde incrementos relativamente altos en la dosis de droga producen pequeños incrementos en la concentración de metahemoglobina (28).

Los valores para la máxima concentración de metahemoglobina en una dosis establecida puede variar considerablemente en individuos de la misma especie; datos de Bredow y Young, para una dosis de 70 mg/kg, en el gato muestran los siguientes valores para cuatro individuos en mmol MHb/kg : 0.066, 0.22, 0.30, 0.36; tal variabilidad es probablemente una expresión de las diferentes capacidades de los individuos de una especie, en el metabolismo de la droga o en los sistemas de enzimas, involucrados en la reducción inversa de metahemoglobina.

Hay una gran variabilidad de individuo a individuo en las concentraciones de metahemoglobina con una dosis establecida. Sobre todo, en concentraciones de metahemoglobina menores a 0.20 mmol / Kg hay una proporcionalidad directa entre la concentración y la dosis. En un numero de compuestos, los valores para las relaciones moleculares se elevan a preciablemente a muy bajas concentraciones de metahemoglobina. Los valores promedio pueden también poseer considerable varianza, es posible, que el uso de mayor numero de animales de una determinada especie o el uso de una raza más uniforme de una determinada especie puede producir promedios con menos varianza. Para propósitos de record, enlistamos en el cuadro No.4 las relaciones moléculares promedio que han sido obtenidas por diferentes investigadores (28).

**CUADRO No. 4 CAPACIDAD DE FORMACION DE MHb DE LOS COMPUESTOS  
ARIL AMINO Y NITRO**

COMPUESTO	PROPORCION MOLECULAR	REFERENCIA
Anilina	2.50	Herken
	2.70	Schwedtke
Acetanilida	1.00	Lester
m-fenilendiamina	1.40	Jung
Acetofenitidina	0.14	Lester
o-Aminofenol	6.80	Petersen
Nitrosobenceno	8.60	Peterson
p-Aminofenol	3.60	Schwedkte
p-Aminofenol	1.30	Issekutz
Fenilhidroxilamina	34.00	Issekutz
Nitrosobenceno	0.86	Bredow and Jung
o-Dinitrobenceno	1.90	Heubner and Ssing
m-Dinitrobenceno	7.10	Issekutz
	7.80	Bredow and Yung
	6.40	Heubner and Sing
p-Dinitrobenceno	55.00	Heubner and Sing
Trinitrobenceno	4.80	Bredow and Jung
o-Nitrotolueno	0.05	Bredow and Jung
m-Nitrotolueno	0.04	Bredow and Jung
2,4-Dinitrotolueno	1.40	Bredow and Jung
2,6-Dinitrotolueno	0.55	Bredow and Jung
2,4,6-Trinitrotolueno	1.70	Bredow and Jung
m-Cloronitrobenceno	2.30	Jung
m-Aminonitrobenceno	3.00	Jung
2,4-Dinitroclorobenceno	0.60	Jung
p-Nitro-o-toloidina	3.70	Reiter

Tomado de Kiese, 1966.

La tabla anterior revela dos hechos que son cualitativamente impresionantes, puede notarse:

1) La relación molecular es mayor a uno para un considerable número de compuestos. En otras palabras, una molécula de cada uno de estos compuestos forma un intermediario que puede aceptar más de un electrón.

2) El segundo punto de interés, es que *p*-dinitrobenzono y fenilhidroxilamina son destacados formadores de metahemoglobina. *o*-aminofenol, *m*-dinitrobenzono y nitrobenzono, aunque no como distintivo en este respecto, parecen ser mucho más activos que los otros compuestos.

El hecho de que ciertos compuestos son potentes formadores de metahemoglobina, aumenta la posibilidad de que estos compuestos, o compuestos derivados de ellos poseen un grupo químico que directamente, o en asociación con otros sistemas, sean de cierta importancia en la oxidación de hemoglobina.

Debido relativamente a su alta capacidad de formación de metahemoglobina, *p*-aminofenol, fenilhidroxilamina y nitrobenzono han sido implicados por varios investigadores como intermediarios importantes en el metabolismo de otros compuestos formadores de metahemoglobina (6,28).

### ***SULFONAMIDAS.***

La introducción de la droga sulfonamida en la práctica médica, cerca de 1937, proporciono un aumento al riesgo de metahemoglobina. Los primeros casos fueron reportados por Gibberd, Paton y Eaton. Hartmann y sus asociados encontraron que, en la gran mayoría de pacientes que recibieron 0.1g o más diariamente de sulfanilamida por Kg de peso corporal, algo de cianosis debida a metahemoglobinemia fue detectable. En general hay una correlación aproximada entre la concentración de sulfanilamida en la sangre y la concentración de metahemoglobina.

Niveles de 10 a 20 mg de sulfanilamida por 100 ml fueron usualmente asociados con metahemoglobinemia en un rango de un 20 a un 30%, en pacientes que recibieron sulfonamidas. Con el remplazo de sulfonamidas por antibióticos en el tratamiento de infecciones bacterianas, la incidencia reportada ha disminuido enormemente (28).

#### II.6.0 RIESGOS INDUSTRIALES.

Varios procesos industriales involucran exposición a compuestos que producen metahemoglobinemia. Así en la soldadura eléctrica, óxido nítrico es generado; como una regla los resultados de tal exposición son imperceptibles para la concentración de metahemoglobina que es raramente más del 3%. Aunque TNT es productor de metahemoglobina, el efecto de la ingestión de pequeñas cantidades casi 1mg / Kg, es imperceptible en el hombre y no hay cambio detectable en el pigmento sanguíneo. Hace unos cuantos años, Bass y col. reportaron la presencia de metahemoglobinemia en personas que trabajan con aceites minerales, se encontró que este aceite contenía 0.5% de un formador de metahemoglobinemia, 2-anilino-etanol (28).

#### II.7.0 SINTOMATOLOGIA

La metahemoglobinemia causa un tipo de hipoxia anémica, esto es capacidad disminuida de transporte de oxígeno por sangre. Se presenta cianosis que va desde el gris pizarra hasta el azulado de la piel y las mucosas; dicha cianosis no llega a ser aparente, hasta que la concentración de metahemoglobina alcanza un nivel del 15% del pigmento total. Esto es aproximadamente una concentración de 1.5g de MHb/ 100ml de sangre.

Concentraciones de metahemoglobina que van del 10 al 25% son toleradas sin aparente efecto de enfermedad, a no ser por la cianosis. Las metahemoglobinemias arriba del 30%, en general presentan ligera disnea. A niveles de 35 a 45% la disnea va acompañada de dolor de cabeza, y fácil fatigabilidad. A concentraciones de 60 a 70% de MHb se presentan síntomas como

salivación, atoxia, vomito, estupor e inconsciencia. A concentraciones mayores de 70% se presentan convulsiones y sobreviene la muerte.

Pacientes con metahemoglobinemia hereditaria no tratada, tienen una disminuida capacidad para transportar oxígeno debido a que tienen de 20 a 25% de M<sub>Hb</sub>, presentan una moderada eritrocitosis compensatoria.

En la metahemoglobinemia congénita, es una condición que la cianosis este presente en extensiones variadas y puede llegar a agravarse en la infancia a muy temprana edad en el adulto. Investigaciones recientes han establecido que la cianosis es debida a metahemoglobinemia, como resultado del desorden en los sistemas de enzimas que están involucrados en el mantenimiento del equilibrio Hb-M<sub>Hb</sub> del eritrocito (28).

#### II.8.0. DIAGNOSTICO.

En la metahemoglobinemia hereditaria debida a deficiencia de NADH-diaforasa, el examen de sangre revela que del 8 al 40% de la hemoglobina está en forma oxidada. La sangre tiene un color achocolatado obscuro. El análisis de la NADH-metahemoglobina reductasa, revela que la actividad enzimática es de menos de un 20% de lo normal. La actividad de la NADH-diaforasa es normal, en la metahemoglobinemia tóxica (24).

La cianosis debida a metahemoglobinemia se debe diferenciar de la cianosis por enfermedades cardiacas o pulmonares y de la metahemoglobinemia hereditaria por hemoglobina M. La historia familiar ayuda a diferenciar de metahemoglobinemia hereditaria por deficiencia de la NADH-metahemoglobina reductasa de la debida a las hemoglobinas M. En la deficiencia de NADH-diaforasa, la incubación de la sangre con pequeñas cantidades de azul de metileno da una rápida reducción de la metahemoglobina; en la metahemoglobina M tal reducción no se realiza.

En el caso de metahemoglobinemia adquirida, la cianosis es de origen reciente y se requiere de una historia cuidadosa, para saber cuál es el origen, si es por exposición a un fármaco o aún



producto químico; en la metahemoglobinemia hereditaria se descubre una historia de cianosis de largo tiempo.

Para evaluar la concentración de metahemoglobina, se realiza un análisis espectrofotométrico por el método de Evelyn y Malloy (9,21).

### II.8.1. TRATAMIENTO.

Mientras los niveles de metahemoglobina no lleguen a niveles de 30% o más usualmente no es necesario tratamiento alguno. Si la metahemoglobinemia es causada por agentes exógenos (drogas), la concentración de metahemoglobina se eleva a un grado máximo persistiendo éste por algún tiempo y entonces disminuye de nuevo a niveles imperceptibles. El tratamiento en estos casos puede constituir simplemente en el retiro de la droga, con la seguridad de que la cianosis y la metahemoglobinemia desaparecera espontáneamente en uno o dos días (14,29).

La terapéutica con antidotos específicos se basa en catalizar los mecanismos reductores enzimáticos intraeritrocíticos fisiológicos.

Existen dos sustancias que son ampliamente usadas en el tratamiento de metahemoglobinemia; el ácido ascórbico y el azul de metileno.

El ácido ascórbico ha sido utilizado con éxito para reducir el grado de metahemoglobinemia moderadamente grave (50%), actúa como reductor directo, es oxidado dando ácido dehidroascórbico.

El azul de metileno debido a sus propiedades de oxidorreducción fue considerado durante más de 20 años como un antidoto en el tratamiento de algunos tipos de envenenamiento por ejemplo, las debidas a cianuro, monóxido de carbono y por supuesto la formación de metahemoglobina (6,28).

La forma activa, azul de leucometileno se forma por la reducción de metileno en los tejidos; la reacción se acopla con la oxidación de sustancias como NADH. El leucometileno se reoxida con la reducción de MHb (figura.8 ) o indirectamente con la reducción y oxidación de glutatión.

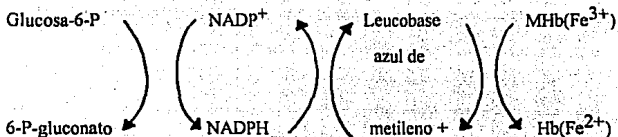


FIGURA. 8 La leucobase se reoxida dando azul de metileno y esta reacción se acopla directamente con la reducción de metahemoglobina (7).

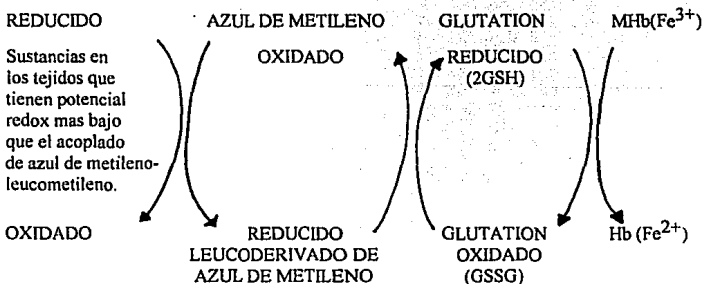


FIGURA. 9 Sistema de oxidación-reducción que interviene en la reducción de la metahemoglobina al administrar azul de metileno. El azul de leucometileno se reoxida dando azul de metileno, y esta reacción se acopla indirectamente por la reducción y oxidación intermedia de glutatión (7).

El efecto de aceleración del azul de metileno en el grado de desaparición de MHB in vivo, fue confirmado por Wendel, Bodansky y Gotman. Este último demostró que una dosis intravenosa de 1 mg de azul de metileno por Kg de peso corporal, es altamente y rápidamente efectivo en salvar a los perros de la muerte en grados de metahemoglobinemia fatales.

De acuerdo a experimentos realizados por Bodansky y Gutmann el ácido ascórbico en comparación con el azul de metileno es mucho menos efectivo, en la aceleración de la reducción de metahemoglobinemia (28).

La aplicación terapéutica de azul de metileno en la metahemoglobinemia consiste en la aplicación de 3 a 6 mg/Kg por vía oral o para acción más rápida, 1 a 2 mg/Kg por vía intravenosa.

Debido a que la metahemoglobinemia familiar congénita, es una de las enfermedades clasificadas en el grupo de "errores del metabolismo innato"; la metahemoglobinemia requiere de atención constante durante la vida. Este tipo de metahemoglobinemia se debe a una deficiencia del sistema enzimático del eritrocito que no reduce metahemoglobina (28).

Para estos casos no es necesaria una terapia intravenosa, la administración oral de ácido ascórbico en dosis diarias divididas, de 400 a 500 mg/día, o de azul de metileno en dosis similares de 250mg/día son adecuadas para reducir las concentraciones de metahemoglobina a niveles de 5% a las pocas semanas. El mantenimiento de metahemoglobina en este nivel es tan largo como la administración continúe.

Cuando el grado de metahemoglobinemia es tan pronunciado que el semi-estupor o inconsciencia está presente, existe una emergencia y el tratamiento debe ser pronto. Como ya hemos mencionado los grados de metahemoglobinemia peligrosos pueden ser resultado del contacto industrial con potentes agentes formadores de metahemoglobina o de ingestión de compuestos, soluciones o productos alimenticios conteniendo tales agentes, en estos casos el tratamiento consiste en la inyección intravenosa de azul de metileno en una dosis de 1 a 2 mg por Kg de peso corporal (28).

William y Challis reportaron un caso de metahemoglobinemia inducida por contacto con p-bromoanilina y ác. p-bromoortosulfanílico. El paciente estaba intensamente cianótico y semicomatoso cuando le fue inyectada 100ml de una solución al 1%, equivalente a 15 mg de azul de metileno por Kg. A la hora, la cianosis había desaparecido y el paciente se recuperó.

Steele y Spink reportaron dos pacientes con metahemoglobinemia marcada; uno estaba desorientado y el otro semi-estuporoso. La inyección intravenosa de 50 ml de una solución 0.5% de azul de metileno (3 a 4 mg por Kg) da por resultado un mejoramiento dramático. 15 minutos después de la inyección, los pacientes se sientan y parecen estar bien. (28)

Quando el azul de metileno es inyectado en el hombre, dos reacciones suceden:

- 1) Una oxidación directa de hemoglobina a metahemoglobina.
- 2) Una reacción opuesta, la reducción de metahemoglobina a hemoglobina, para la que coenzima y factor coenzima son necesarios.

Aparentemente, la última reacción es más efectiva, de tal forma que el equilibrio establecido entre las dos reacciones es disminuido a un punto de muy baja formación de metahemoglobina.

Para casos extremadamente graves es útil la transfusión sanguínea y la administración de oxígeno. La transfusión sanguínea no solamente reemplaza a la hemoglobina inactiva con hemoglobina activa sino que también suprime parte del agente tóxico circulante en la metahemoglobinemia tóxica (13,28).

El glutatión (GS-SG) es un agente reductor efectivo aunque clínicamente no ha sido utilizado.

La rivoftavina ha sido utilizada en algunos casos de metahemoglobinemia congénita, dando como resultado la disminución de la metahemoglobinemia (9).

### **III. HIPOTESIS**

La incidencia del incremento en la concentración de metahemoglobina en sangre, no tiene ninguna relación con la concentración de hemoglobina, así como tampoco con la edad y el sexo.

Incrementos considerables de metahemoglobina en sangre, pueden ser originados por agentes oxidantes de la Hb, como cloratos, nitrito, quinonas, etc.(6), o bien por una deficiencia enzimática de NADH-Metahemoglobina reductasa.

#### **IV. OBJETIVOS.**

- 1.- Montar y estandarizar las pruebas para la cuantificación de metahemoglobina, y la actividad enzimática de NADH-metahemoglobina reductasa (DIAFORASA).**
- 2.- Determinar la concentración de metahemoglobina y detectar la actividad de NADH-metahemoglobina reductasa en individuos de diferente edad y sexo.**
- 3.- Determinar si existe relación, entre los niveles de metahemoglobina y la actividad de NADH-metahemoglobina reductasa.**
- 4.- Determinar si existe relación entre los niveles de hemoglobina en individuos anémicos e individuos normales, con la producción de metahemoglobina.**

## V. MATERIAL Y METODOS.

### V.1.0. MATERIAL

#### V.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se trabajó con 107 muestras de sangre, las cuales fueron obtenidas por punción venosa, de pacientes de consulta externa del Hospital lo. de Octubre del ISSSTE.

Se utilizó hemoglobina libre de NADH-Metahemoglobina reductasa 0.012g/ml.

#### V.1.2. MATERIAL QUÍMICO.

- (a) Amortiguador de fosfatos 0.06M, pH 6.6.
- (b) Amortiguador de fosfatos 0.015M, pH 6.6.
- (c) Buffer de citratos 0.05M, pH 4.7.
- (d) Cianuro de sodio, solución acuosa al 10%.
- (e) Dietil amino etil celulosa (DEAE).
- (f) EDTA, 0.01M.
- (g) Ferricianuro de potasio  $5 \times 10^{-4}$  M
- (h) Ferricianuro de potasio, solución acuosa al 20%.
- (i) Mezcla Cianuro 0.05mg/ml.- Ferricianuro 0.2mg/ml.
- (j) NADH 0.033 g/ml.
- (k) Solución de NaCl 0.9%.
- (l) Triton X-10 concentrado.

## V.2.0. METODOS.

### V.2.1. PREPARACION DE HEMOGLOBINA LIBRE DE NADH-MHb REDUCTASA.

La sangre con anticoagulante, se centrifugó a 2000 rpm y posteriormente se decanto el plasma. Los eritrocitos se lavaron 10 veces con un volúmen de una solución de NaCl 0.9% y fueron centrifugados a 3000 rpm.

Por cada 10 ml de paquete celular lavado, se adicionaron 60 ml de agua destilada y 1.6g de dietil amino celulosa (DEAE). Se dejo reposar por 10 minutos, mezclando ocasionalmente. Posteriormente se centrifugó, y se decantó el fluido sobrenadante dentro de otro recipiente.

El proceso de adsorción se repitió, adicionando nuevamente una orción de 1.6g de DEAE. El líquido claro sobrenadante se diluyo a una concentración final de 0.012g/ml. (La concentración se determino por medio del ensayo de hemoglobina). Los restos de NADH-metahemoglobina reductasa son absorbidos en el DEAE.

Se comprobó que la solución estuviera libre de la actividad de reducción de la NADH-MHb reductasa. (empleando el esayo enzimático, pero empleando 1.8ml de solución libre de enzima y omitiendo la adición de la muestra).

### V.2.2. DETERMINACION DE METAHEMOGLOBINA.

**Principio.** La prueba se fundamenta en que la metahemoglobina presenta una absorción máxima a 630nm, la cual desaparece al agregar cianuro de sodio (NaCN) y se transforma en cianometahemoglobina. En otra alícuota toda la hemoglobina se convierte en metahemoglobina con el agregado de ferricianuro de potasio. La absorbancia de esta solución se mide también a 630 nm antes y después de agregar cianuro, como medida de la cantidad total de hemoglobina (9).

Valores normales: 0.0 a 2.0% de MHb.



**Procedimiento.**

Se tomaron 0.2 ml e sangre y se le añadió 10 ml. de amortiguador de fosfatos 0.016M, se mezcló, posteriormente se agregaron 3 gotas de tritón X-10, se mezcló por inversión dejando reposar hasta que la hemólisis fue completa.

De la solución hemolizada se tomo una alícuota de 3ml, a la cual se le midió la absorbancia a 630 mn contra un blanco de amortiguador de fosfatos. Esta lectura fue la absorbancia  $A_1$ .

En seguida, se agregaron 4 gotas de la solución de cianuro de sodio a la alícuota anterior, se mezcló y se dejó en reposo por 2 minutos, después de este tiempo nuevamente se leyó la absorbancia a 630 mn, siendo esta la lectura  $A_2$ .

A otra alícuota de 3ml del hemolizado se le agregaron 3 gotas de ferricianuro de potasio, se mezcló, se leyó a 630 nm siendo esta la absorbancia  $A_3$ .

A esta misma alícuota se le añadieron 3 gotas de cianuro de sodio, se mezcló y leyó la absorbancia a 630 mn, siendo esta la absorbancia  $A_4$ .

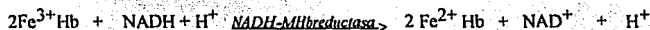
**Calculo.**

$$\frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100 = \% \text{ de metahemoglobina}$$

Si los valores de las lecturas  $A_1$  y  $A_2$  son iguales no hay metahemoglobina.

### V.2.3. ENSAYO ENZIMATICO DE LA NADH-METAHEMOGLOBINA REDUCTASA (DIAFORASA).

**Principio.** La determinación de la actividad de NADH-metahemoglobina reductasa, se basa en la determinación del incremento de absorción a una longitud de onda de 575 nm la cual se debe a la formación del NAD<sup>+</sup> a partir de la oxidación del NADH (20).



Valores normales: 2.0 a 4.4 U. de Enzima.

#### V.2.3.1. ENSAYO DE HEMOGLOBINA.

En un tubo de ensayo se colocaron, 5ml de solución cianuro-ferricianuro, 40 ul de la muestra (sangre completa), se dejó reposar por 10 minutos y se centrifugó, se midió la absorbancia de la solución clara a 540 nm contra un blanco de agua, en una celda de 1 cm.

Para determinar la concentración de hemoglobina en la muestra, se trabajó simultáneamente con un hemolizado de hemoglobina de concentración conocida. ( 11.6 g/100 ml ).

Valores normales: Hombres 15.0 a 19.0 g/100ml Hb.

Mujeres: 12.5 a 16.5 g/100ml Hb.

Niños: 9.5 a 16.0 g/100ml Hb.

#### V.2.3.2 ENSAYO ENZIMATICO.

En un tubo de ensayo se colocaron:

0.5 ml de EDTA 0.01 M.

1.0 ml de Buffer de citrato 0.05 M.

1.8 ml de Ferricianuro de potasio  $5 \times 10^{-4}$  M.

1.0 ml de hemoglobina 0.012g/ml, libre de actividad de NADH-MHb reductasa.

0.04ml de muestra (sangre completa).

Se llevó a un volumen de 9.9 ml con agua destilada, se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, para eliminar los restos celulares.

Se tomaron dos alícuotas de 2.97 ml del centrifugado y se colocaron en tubos de ensayo por separado, al tubo número uno, se le añadieron 0.03 ml de agua destilada, se mezcló y se calibró el espectrofotómetro a cero.

En el tubo número dos, se le añadieron 0.03 ml de NADH 0.033 g/ml, a tiempo cero se midió el cambio de absorbancia por un lapso de 3 minutos, con intervalo de 30 seg.

**Nota:** el cambio de absorbancia del primero al segundo minuto después de la adición del NADH (incremento de absorbancia a 575 nm por minuto), es una medición de la actividad enzimática.

*Calculo.*

$$\frac{\text{increment. de A a 575nm/min.} \times 1000}{42} \times \frac{10}{A \text{ a } 540 \text{ nm} \times 0.207 \times 68} = \frac{\text{increment. A a 575nm/min.} \times 17}{A \text{ a } 540 \text{ nm.}}$$

Unidades de NADH-Miobina reductasa.

## V.2.4.METODO ESTADISTICO.

### Medidas de tendencia central, para datos agrupados:

#### Media

$$X = \frac{\sum xf}{n}$$

X = media muestral

x = marca

f = frecuencia

n = tamaño de la muestra

#### Mediana

$$X = LRIx + \frac{n/2 - FAA_{X-1}}{F_x} \quad C$$

X = mediana

LRI = limite real inferior del intervalo que contiene a la X

n = tamaño de la muestra

FAA = frecuencia acumulada absoluta de un intervalo antes del que contiene a la X

F<sub>x</sub> = frecuencia absoluta del intervalo que contiene a la X

C = Amplitud

#### Moda

$$X = LRIx + \frac{d_1}{d_1 - d_2} \quad C$$

X = moda

LRIx = limite real inferior del intervalo que contiene a la moda

d<sub>1</sub> = diferencia en frecuencia absoluta del intervalo que contiene a la X con

- el anterior.
- $d_2$  = diferencia en frecuencia absoluta del intervalo que contiene a la X con el posterior.
- C = amplitud.

Mediadas de dispersión:

$$S^2 = \frac{(X - \bar{X})^2 f}{n - 1}$$

- $S^2$  = varianza
- X = marca
- $\bar{X}$  = media
- f = frecuencia
- n = tamaño de la muestra

Desviación estandar

$$S = \sqrt{S^2}$$

- S = desviación estandar
- $S^2$  = varianza

Rango.

$$R = X_1 - X_s$$

- R = rango
- $X_1$  = observación con el mayor valor
- $X_2$  = observación con el menor valor

## VI. RESULTADOS

VI.1. Los resultados del grupo de pacientes de consulta externa del Hospital 1o. de Octubre (ISSSTE) de diferente sexo con edades de 11 a 60 años, se dan en el siguiente cuadro, las concentraciones de hemoglobina, % de metahemoglobina, incremento de la absorción a 575 nm y unidades de actividad enzimática, para cada uno de las 107 muestras.

**CUADRO No.5 CONCENTRACIONES DE Hb, MHb, INCREMENTO DE A575 nm U. DE NADH-MHb REDUCTASA**

n	Edad	Sexo	Hb g/10 ml	MHb(%)	Incremento A 575 nm	U. de Enzima
1	54	F	12.10	6.30	0.050	1.77
2	26	F	13.40	3.80	0.038	1.22
3	29	M	9.80	3.40	0.009	0.39
4	48	M	13.10	1.40	0.046	1.50
5	56	F	15.60	3.12	0.051	1.40
6	49	M	16.40	2.77	0.013	0.34
7	38	F	15.80	2.30	0.052	1.40
8	29	F	13.10	4.35	0.064	2.10
9	47	F	15.80	4.10	0.066	1.78
10	34	M	17.10	0.00	0.034	0.85
11	11	F	15.30	2.90	0.049	1.36
12	25	M	17.10	0.68	0.054	1.35
13	18	M	17.60	0.00	0.056	1.36
14	32	F	13.40	0.00	0.042	1.35
15	37	M	12.60	1.90	0.051	1.73
16	33	M	15.60	1.31	0.066	1.80
17	37	F	13.10	4.14	0.080	2.61
18	29	F	12.10	1.43	0.064	2.26
19	16	M	14.30	1.37	0.077	2.29
20	37	M	13.10	2.37	0.059	1.93
21	34	F	15.60	1.33	0.084	2.30
22	32	F	10.00	3.47	0.042	1.78
23	15	M	15.30	0.74	0.064	1.78

Continuación.....

n	Edad	Sexo	Hbg/100ml	MHb(%)	Incremento U. de Enzima	
					A 575 nm	
24	35	F	12.30	3.33	0.059	2.04
25	26	M	16.40	0.00	0.056	1.46
26	17	F	14.30	0.00	0.029	0.86
27	35	M	15.60	1.14	0.080	2.14
28	34	F	13.30	2.80	0.075	2.40
29	28	F	12.10	3.00	0.085	3.01
30	27	F	14.90	1.49	0.055	1.58
31	35	F	12.80	2.40	0.078	2.59
34	28	M	14.60	3.30	0.072	2.11
35	33	M	11.30	2.50	0.061	2.30
36	26	M	16.60	2.35	0.051	1.31
37	32	F	13.80	2.36	0.032	0.99
38	33	F	15.10	2.66	0.065	1.84
39	36	F	9.80	4.00	0.023	1.00
40	48	F	12.10	0.00	0.077	2.73
41	27	F	14.90	3.50	0.048	1.38
42	34	M	18.40	2.10	0.064	1.49
43	19	F	12.10	3.30	0.036	1.27
44	28	F	14.30	0.00	0.048	1.43
45	32	F	13.30	0.45	0.042	1.35
46	27	M	11.80	1.10	0.022	0.79
47	32	F	13.60	0.00	0.032	1.00
48	43	M	14.30	1.90	0.036	1.07
49	32	M	15.10	1.20	0.027	0.76
50	20	M	20.10	0.00	0.063	1.34
51	41	M	16.90	0.00	0.028	0.71
52	32	F	15.60	1.13	0.046	1.26
53	33	M	16.10	1.68	0.070	1.86
54	32	F	12.80	3.32	0.075	2.50
55	35	F	15.40	0.45	0.047	1.30
56	33	F	12.60	2.43	0.087	2.95
57	27	F	15.10	1.60	0.037	0.76
58	44	M	16.60	1.45	0.069	1.78
59	38	F	10.00	1.20	0.009	0.36
60	37	M	18.90	0.00	0.068	1.54
61	39	F	14.10	2.14	0.060	1.82
62	35	F	10.00	7.14	0.065	2.76
63	36	M	16.10	2.43	0.054	1.47
64	37	F	13.80	4.34	0.061	1.88
65	32	F	14.60	1.63	0.059	1.77
66	23	F	16.90	1.48	0.058	1.47
67	31	M	16.90	2.11	0.059	1.49

Continuación.....

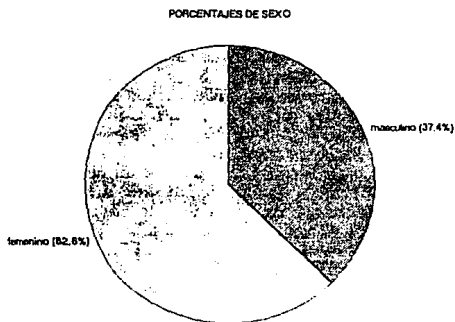
n	Edad	Sexo	Hbg/100ml	MHb(%)	Incremento		U. de Enzima
					A 575 nm		
68	13	M	16.90	2.00	0.058	1.47	
69	31	F	12.60	1.40	0.067	2.27	
70	29	F	12.80	2.00	0.065	2.16	
71	22	M	11.35	4.54	0.066	2.49	
72	16	M	18.10	4.10	0.059	1.39	
73	42	M	16.90	1.90	0.060	1.52	
74	30	F	15.60	2.60	0.064	1.75	
75	43	F	17.90	2.10	0.065	1.55	
76	36	F	18.40	1.85	0.066	1.53	
77	60	M	20.10	2.20	0.065	1.38	
78	48	F	18.60	2.30	0.060	1.37	
79	36	F	17.10	2.19	0.056	1.40	
80	31	M	17.10	2.43	0.067	1.67	
81	39	F	9.80	7.00	0.048	2.10	
82	36	F	16.60	5.60	0.064	1.65	
83	33	M	15.60	4.73	0.066	1.81	
84	31	F	16.10	4.76	0.066	1.75	
85	36	F	8.10	6.25	0.009	0.46	
86	49	M	16.10	2.27	0.040	1.10	
87	33	M	14.90	1.74	0.017	0.49	
88	24	F	11.30	2.70	0.032	1.21	
89	57	M	12.60	2.63	0.012	0.41	
90	37	F	12.80	1.94	0.020	0.66	
91	45	M	15.90	1.22	0.032	0.86	
92	35	F	14.60	2.22	0.060	1.76	
93	28	F	13.80	2.38	0.061	1.99	
94	27	M	17.90	1.48	0.058	1.39	
95	31	F	14.30	1.13	0.059	1.76	
96	30	F	15.10	1.59	0.053	1.50	
97	28	F	14.20	0.00	0.056	1.70	
98	38	M	16.90	2.10	0.053	1.34	
99	31	F	12.60	0.57	0.061	2.07	
100	32	F	14.30	0.54	0.058	1.73	
101	36	F	14.60	1.75	0.046	1.35	
102	50	M	14.80	0.00	0.058	1.67	
103	23	F	14.80	0.00	0.066	1.90	
104	38	F	14.10	0.61	0.062	1.88	
105	23	F	15.10	0.00	0.071	2.01	
106	19	F	14.60	0.00	0.061	1.78	
107	47	M	15.10	1.08	0.058	1.60	

M: Sexo Masculino

F: Sexo femenino



El grupo estuvo integrado por un total de 107 personas, en el cual la distribución por sexos fue de 62.6% para el sexo femenino y el restante 37.4% para el sexo masculino, como se puede ver en la figura 10.



**FIGURA 10.** Representación gráfica del % de sexo en los individuos de las muestras.

Una manera diferente de analizar los resultados es hacer el análisis estadístico con los valores del cuadro No.5 de Hb, MHb, etc. y se obtuvieron los resultados para la población en general mostrados en el cuadro No. 6, sin tomar en cuenta la edad y el sexo.

**CUADRO No.6 ANALISIS ESTADISTICO DE LA POBLACION EN GENERAL.**

	PROMEDIO	MEDIANA	VARIANZA	DES. STD.	RANGO'
	X	X	S <sup>2</sup>	S	R
Hbg/100ML	14.5	14.75	5.40	2.32	20.1 - 8.1
MHb %	2.13	0.14	1.89	1.51	7.14 - 0.0
<b>INCREMENTO</b>					
A 575 nm	0.054	0.061	0.060	0.017	0.087 - 0.009
<b>U. DE ENZIMA</b>	1.60	1.55	1.46	0.57	3.01 - 0.34

Hb = Hemoglobina

MHb = Metahemoglobina

Incremento A 575nm = incremento de absorbancia a 575 nm

U. de enzima = Unidades de NADH-MHb reductasa

En el cuadro No. 7 se presentan los valores de hemoglobina del cuadro No.5 agrupados en 9 categorías con intervalos de 1.34g/100ml para observar la frecuencia de los grupos.

**CUADRO No.7 FRECUENCIAS DE CONCENTRACION DE  
HEMOGLOBINA g/10 ml.**

<b>Intervalo de confianza</b>	<b>Frecuencia (f)</b>	<b>Frecuencia acumulada (fa)</b>
8.09 - 9.43	1	1
9.43 - 10.77	6	7
10.77 - 12.11	9	16
12.11 - 13.45	21	37
13.45 - 14.79	17	54
14.79 - 16.13	28	82
16.13 - 17.47	15	97
17.47 - 18.81	7	104
18.81 - 20.15	3	107
<b>Total</b>	<b>107</b>	

Los datos de frecuencias (f) y concentración de Hb del cuadro 7 se comparan entre sí obteniéndose la figura 11 en donde se observa, como la frecuencia más alta de hemoglobina se encuentra en el intervalo que va de 14.79 a 16.13g/100ml, además entre el rango de 12.11 a 16.13g/100ml de hemoglobina se encuentra el 56% de los pacientes.

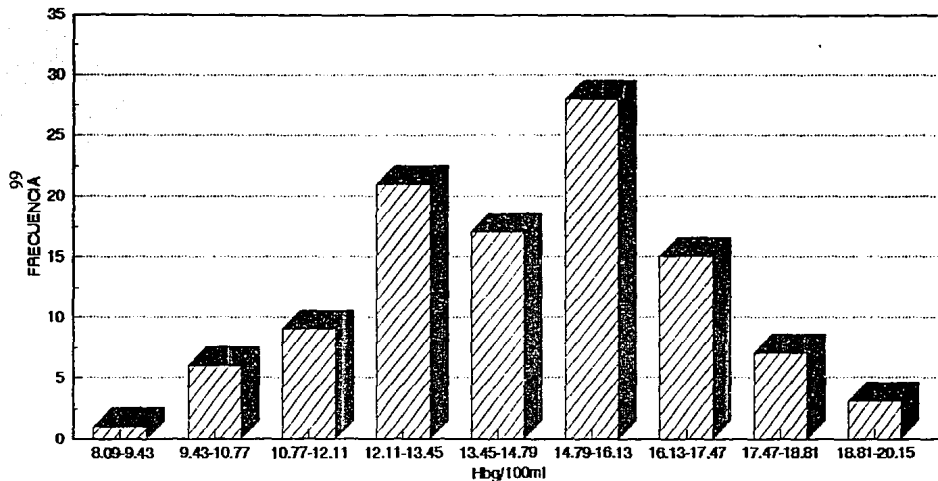


FIGURA 11. Diagrama de barras, frecuencia(f) vs. concentración de Hbg/100ml.  
Datos tomados del cuadro 7.

Los pacientes del cuadro 5 fueron divididos en grupos de acuerdo a los valores de metahemoglobina (%), y se presentan en el cuadro No.8 en donde se ve que se obtuvieron 9 grupos con intervalos de 0.8 unidades cada uno, teniendo entre el primero y tercer grupo la mayor frecuencia de valores, los datos de la población en general son independientes de edad y sexo.

**CUADRO No.8 FRECUENCIAS DE CONCENTRACIONES DE MHb (%).**

Intervalo de confianza	Frecuencia (f)	Frecuencia acumulada (fa)
0.0 - 0.8	23	23
0.8 - 1.6	19	42
1.6 - 2.4	32	74
2.4 - 3.2	10	84
3.2 - 4.0	8	92
4.0 - 4.8	10	102
4.8 - 5.6	1	103
5.6 - 6.4	1	104
6.4 - 7.2	3	107
<b>Total</b>	<b>107</b>	

Los datos del cuadro No.8 de concentración de Mhb y frecuencia se grafican en la figura 12 en donde se observa, que el % de Mhb con mayor frecuencia cae en el intervalo de 1.6 a 2.4, no obstante la menor frecuencia de pacientes con metahemoglobinemia se da del cuarto grupo en adelante, teniendo un 21.5% de la población con concentraciones de Mhb, que van de 3.2 a 7.2%

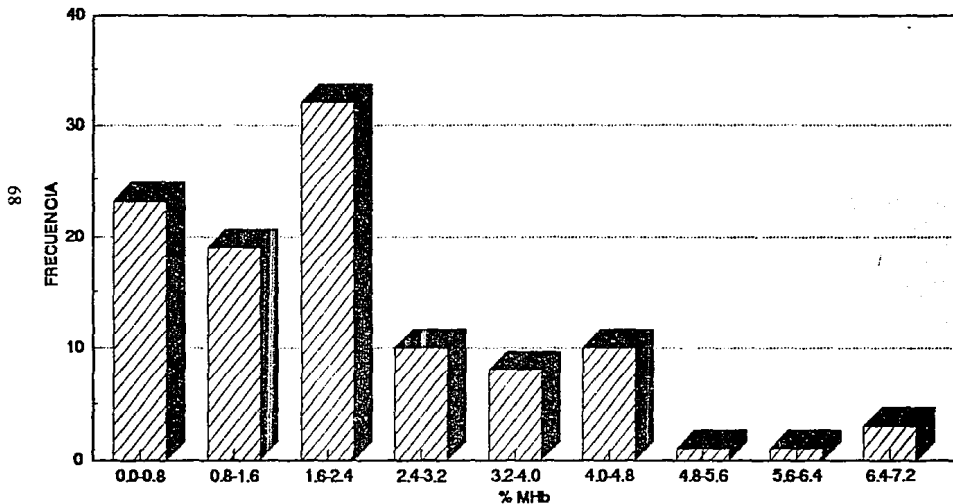


FIGURA.12. Diagrama de barras de frecuencia(f) vs concentración de Mhb(%).

Los valores de incremento de absorbancia a 575 nm, se agrupan en 9 categorías, con intervalo de 0.009 unidades y se presentan en el cuadro No.9, estos datos son para el total de la población sin tomar en cuenta la edad ni el sexo.

**CUADRO No.9 FRECUENCIAS DE INCREMENTO DE ABSORBANCIA A 575 nm.**

Intervalo de confianza	Frecuencia (f)	Frecuencia acumulada (fa)
0.008 - 0.017	6	6
0.017 - 0.026	3	9
0.026 - 0.035	9	18
0.035 - 0.044	7	25
0.044 - 0.053	15	40
0.053 - 0.062	29	69
0.062 - 0.071	25	94
0.071 - 0.080	8	102
0.080 - 0.089	5	107
<b>Total</b>	<b>107</b>	

Con los datos de incremento de absorbancia y frecuencia del cuadro No.9 se construye la figura 13 en donde se ve que el incremento de absorbancia corresponde a la diferencia de lecturas entre el 1o. y 2o. minuto, del ensayo enzimático, el intervalo de lecturas con mayor frecuencia es el de 0.53 a 0.62 de incremento de absorbancia a 575nm.

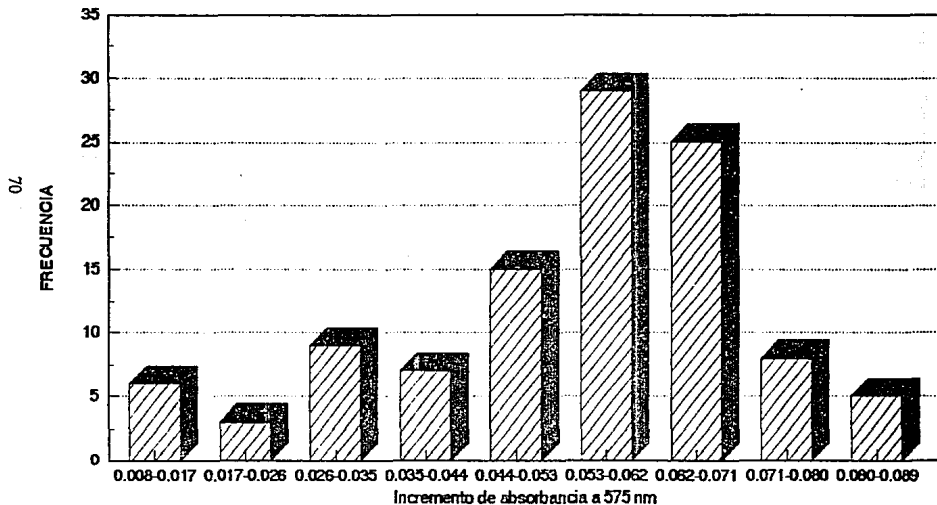


FIGURA 13. Diagrama de barras de frecuencia(f) vs incremento de A575nm.



Los valores de actividad enzimática de NADH-MHb reductasa, para la población en general sin tomar en cuenta la edad ni el sexo, se agruparon en 9 categorías con intervalos de 0.3 unidades cada una y se presentan en el cuadro No.10, en donde se ve que aproximadamente el 71.03% de la población, presentan una actividad enzimática por debajo de la actividad normal.

**CUADRO No. 10 FRECUENCIAS DE ACTIVIDAD DE NADH-MHb REDUCTASA  
(UNIDADES DE ENZIMA).**

Intervalo de confianza	Frecuencia (f)	Frecuencia acumulada (fa)
0.33 - 0.63	6	6
0.63 - 0.93	8	14
0.93 - 1.23	7	21
1.23 - 1.53	31	52
1.53 - 1.83	24	76
1.83 - 2.13	13	89
2.13 - 2.43	8	97
2.43 - 2.73	5	102
2.73 - 3.03	5	107
<b>Total</b>	<b>107</b>	

En la figura 10 se presenta la relación de frecuencia y actividad enzimática obtenidos en el cuadro No.10 y se ve que la frecuencia más alta está en el intervalo de 1.23 a 1.53 U. de enzima y la frecuencia más baja en los intervalos 2.43 a 2.73 y 2.73 a 3.03 unidades de enzima.

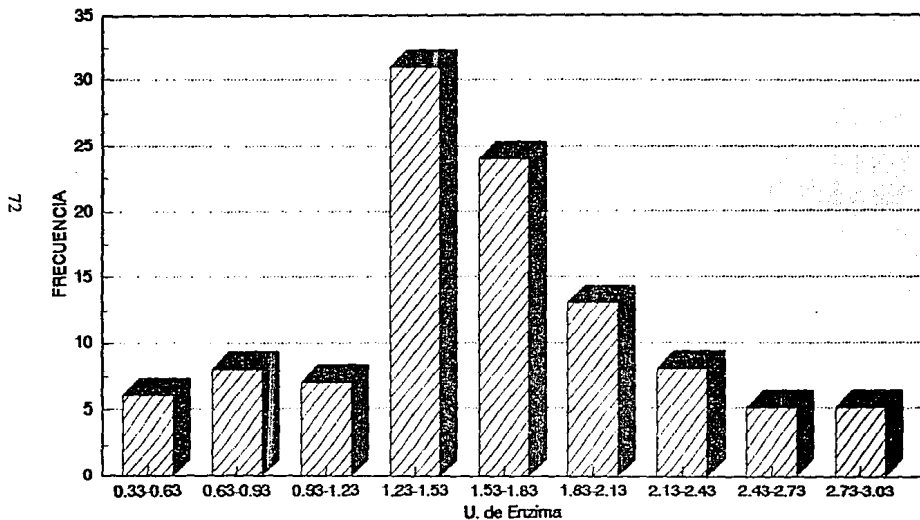
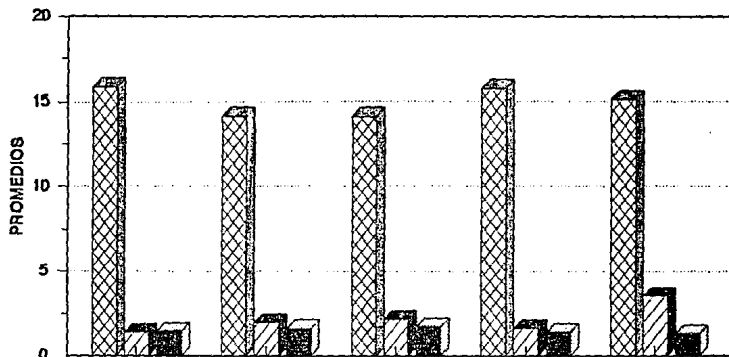


FIGURA 14. Diagrama de barras, frecuencia (f) vs actividad enzimática (unidades de NADH-MHb reductasa).

Para determinar si el sexo y la edad influyen de alguna manera, en la concentración de hemoglobina, metahemoglobina y en la actividad enzimática de NADH-MHb reductasa (DIAFORASA), se realizó un análisis comparativo, de los promedios obtenidos, en cada intervalo de edades, para esto se formaron 5 grupos, de acuerdo a la edad, con intervalo de 10 años cada uno, primeramente se trabajaron los datos independientemente del sexo y se presenta en la figura No.15, para posteriormente separarlos por sexo, presentándose en la figura No.16 el sexo femenino y en la figura No. 17 el sexo masculino.

Dentro de los 5 grupos formados se observa, que la actividad enzimática de DIAFORASA esta ligeramente por de bajo de lo normal (2.0-4.4 U. de enzima), mientras que en el ultimo grupo de 51 a 60 años, existe un aumento de la concentración de MHB, con una marcada disminución de la actividad enzimática en relación a los otros grupos, las concentraciones de Hb se encuentran dentro de lo normal, sin influir de manera aparente en la actividad enzimática.

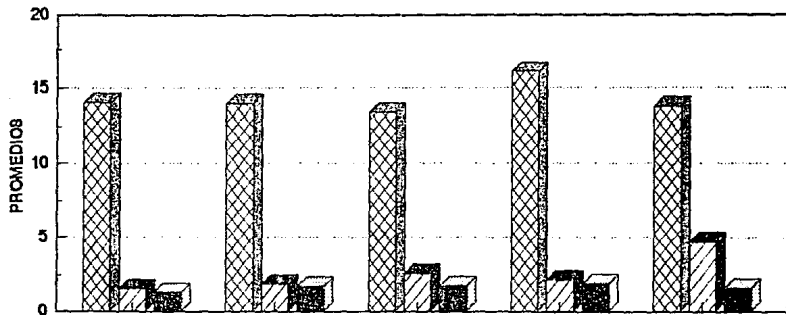


EDADES		10-20	21-30	31-40	41-50	51-60
XHb	☒	15.86	14.17	14.12	15.75	15.10
%MHB	▨	1.44	1.95	2.12	1.61	3.56
XACTIVIDAD ENZIMATICA	■	1.40	1.82	1.70	1.39	1.24

FIGURA 15. Diagrama de barras comparativo de los promedios de Hb, %MHB y actividad enzimática, para ambos sexos.

En este gráfico no se observan diferencias marcadas para las concentraciones de hemoglobina, a excepción del grupo de 41 a 50 años, que es de 16.10g/100ml de Hb en promedio, en el grupo de 51 a 60 años se presenta, un aumento de los niveles de metahemoglobina, mas marcado que en los otros grupos, con una actividad enzimática ligeramente por debajo de lo normal (2.0-4.4 U.Enzima).

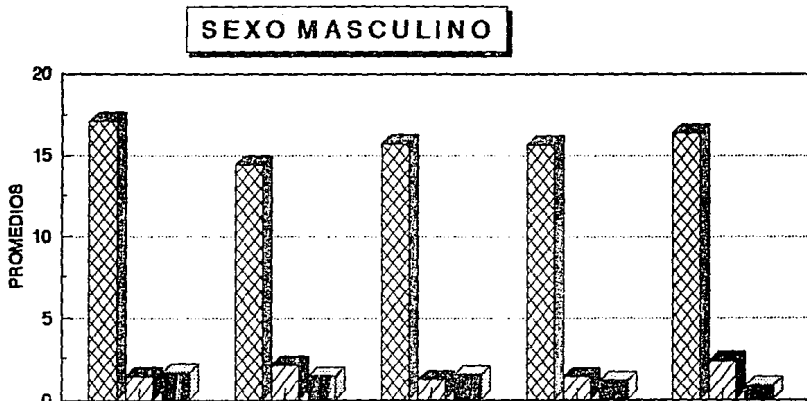
**SEXO FEMENINO**



EIDADES	10-20	21-30	31-40	41-50	51-60
Hb	14.07	14.04	13.45	16.10	13.85
MHb	1.55	1.98	2.65	2.14	4.71
XACTIVIDAD ENZIMATICA	1.32	1.73	1.77	1.85	1.58

**FIGURA 16. Diagrama de barras comparativo de los promedios de Hb, MHb y actividad enzimática del sexo femenino.**

En el diagrama de barras se encuentra una hemoglobina normal, con una actividad enzimática por abajo de 2.0 y una metahemoglobina dentro de rangos normales y nuevamente se observa, en el grupo de edad de 51 a 60 años un relativo aumento de la MHb, con una marcada disminución de la actividad enzimática.



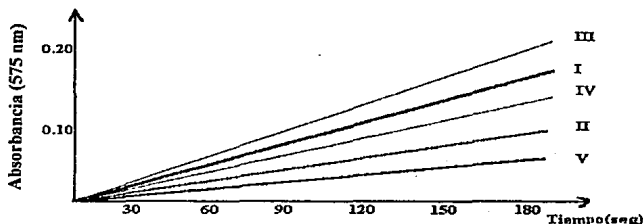
EDADES		10-20	21-30	31-40	41-60	51-60
X <sub>Hb</sub>	☒	17.05	14.44	15.70	15.61	15.35
X <sub>MHb</sub>	▨	1.35	2.10	1.17	1.40	2.41
X <sub>ACTIVIDAD ENZIMATICA</sub>	■	1.60	1.41	1.63	1.21	0.89

FIGURA 17. Diagrama de barras comparativo de los promedios de Hb, MHb y actividad enzimática del sexo masculino.

Con respecto a la actividad enzimática, se realizó un análisis de regresión lineal de las lecturas obtenidas a 575 nm., obteniéndose los valores de pendiente y correlación para cada uno de los 107 pacientes. Al igual que con los datos anteriores, en éste caso, se trabajo con los rangos de edades y sexo, establecidos anteriormente; los cuadros No. 11,12 y13 nos muestran los promedios de pendiente y correlación obtenidos para cada grupo de edad y sexo y con los datos de cada cuadro se construyen las figuras 18,19 y20.

**CUADRO 11. PROMEDIOS DE PENDIENTE Y CORRELACION PARA CADA GRUPO DE EDADES. AMBOS SEXOS.**

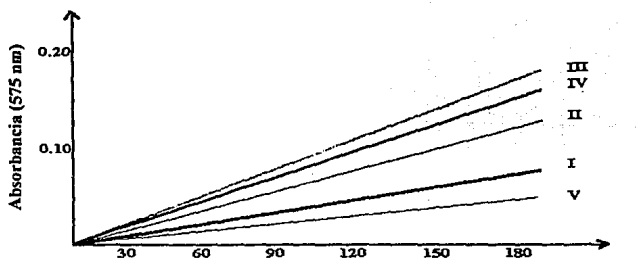
Edad	X Pendiente	X Correlación	
10 - 20	0.000853	0.96	I
21 - 30	0.000793	0.94	II
31 - 40	0.000916	0.94	III
41 - 50	0.000812	0.94	IV
51 - 60	0.000637	0.85	V



**FIGURA 18. Representación lineal. A 575nm vs tiempo(seg), para ambos sexos.**

**CUADRO 12. PROMEDIOS DE PENDIENTE Y CORRELACION PARA CADA GRUPO DE EDADES, SEXO FEMENINO.**

Edad	X Pendiente	X correlación	
10 - 20	0.000714	0.95	I
21 - 30	0.000857	0.95	II
31 - 40	0.000994	0.95	III
41 - 50	0.000950	0.97	IV
51 - 60	0.000662	0.94	V



**FIGURA 19. Representación lineal. A 575 nm vs tiempo(seg), para el sexo femenino.**



CUADRO 13. PROMEDIOS DE PENDIENTE Y CORRELACION PARA  
CADA GRUPO DE EDADES. SEXO MASCULINO.

Edad	X Pendiente	X Correlación
10 - 20	0.000986	0.98 I
21 - 30	0.000730	0.93 II
31 - 40	0.000838	0.94 III
41 - 50	0.000675	0.91 IV
51 - 60	0.000613	0.77 V

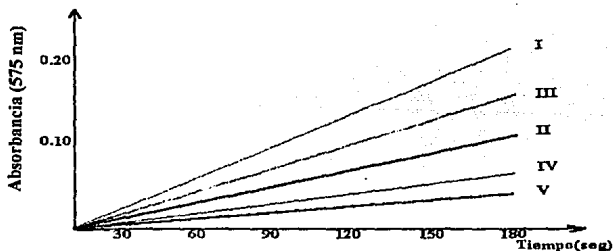


FIGURA 20. Representación lineal. A 575 nm vs tiempo(seg), para  
el sexo masculino.

A partir de las figuras 18, 19 y 20 se hace una comparación gráfica de pendientes, con el objeto de mostrar de una manera más clara los resultados obtenidos, en relación a la actividad enzimática, de la DIAFORASA y se presenta en la figura 21.

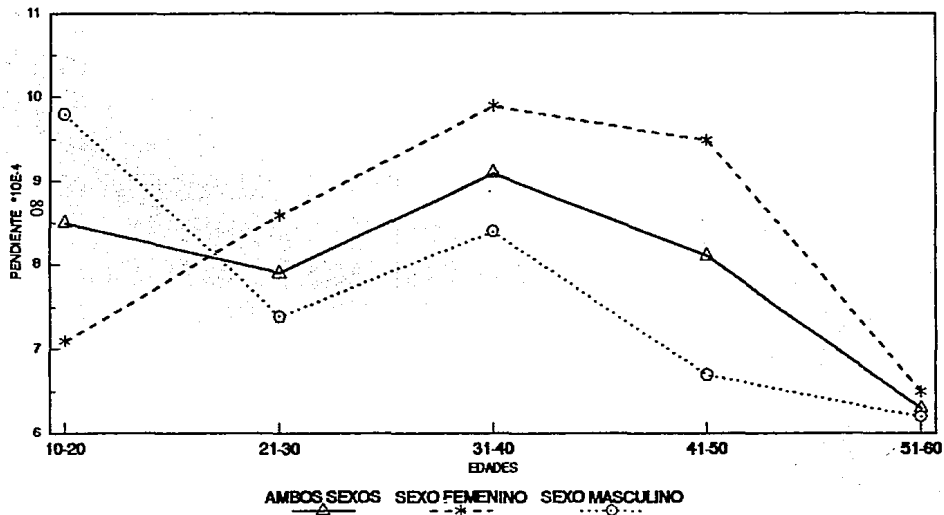


FIGURA 21. Comparación gráfica de pendientes.

## VII. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Los niveles normales de metahemoglobina, se encuentran en un intervalo que va de un 0.0% hasta un 2.0%, en relación a la concentración total de hemoglobina (14).

Esta concentración se mantiene gracias a los sistemas reductores de metahemoglobina, de los cuales el más importante es la NADH-metahemoglobina reductasa (DIAFORASA). Problemas de metahemoglobinemia de tipo congénito, debidas a la deficiencia de DIAFORASA son raramente encontradas, por lo que el tipo de herencia no ha sido bien determinado.

Los casos más comunes de metahemoglobinemia, se deben generalmente a efectos tóxicos, de agentes oxidantes de la metahemoglobina que se pueden encontrar tanto en el medio ambiente, por los altos índices de contaminación existentes actualmente, como por el uso de pesticidas, algunos conservadores en alimentos, además del uso de algunos fármacos metahemoglobinizantes, como los analgésicos, anestésicos locales etc.

Nuestro estudio estuvo encaminado a determinar la actividad enzimática de NADH-MHb reductasa, además de los niveles de metahemoglobina presentes, en un grupo de pacientes, de consulta externa del Hospital 1o. de Octubre (ISSSTE).

La selección del grupo se realizo al azar, para formar un grupo heterogéneo, de diferentes edades y sexo, abarcando así desde niños, hasta personas ya mayores. No nos fue posible conocer la ocupación de estas personas, dato que sería muy interesante para determinar, que tanto riesgo tienen de estar en contacto con sustancias metahemoglobinaizantes.

Este hospital se encuentra en la zona norte del D.F., donde están ubicadas un gran numero de industrias, que sumadas al intenso transito, incrementan de manera considerable el indice de contaminación, factor importante en el aumento de los niveles de metahemoglobina.

En el cuadro 6, se observan los valores promedio obtenidos, para la concentración de hemoglobina, metahemoglobina, incremento de absorbancia y actividad enzimática, para la población en general sin tomar en cuenta la edad ni el sexo.

La concentración promedio de hemoglobina obtenida es de 14.5g/100ml, con respecto al cuadro 7 y la figura No. 1, se observa que la frecuencia más alta cae dentro del intervalo de 14.79 a 16.13 g/100ml, por tanto no hay presencia de anemia en el grupo estudiado.

El valor promedio de % de MHB encontrado es de 2.13%, con un intervalo que va de un 0.0 a 7.14%; a estas concentraciones no existen signos clínicos ni sintomatología (6,28). El cuadro 8 y la figura No.2, nos muestran la frecuencia mas alta de metaheoglobina en el intervalo de 1.6 a 2.4%.

De acuerdo al valor de MHB promedio, se puede mencionar que se encuentra levemente por arriba, del limite normal superior, reportado en bibliografía.

Las lecturas de absorbancia a 575 nm, con mayor frecuencia se encuentran en el intervalo de 0.053 a 0.062 (cuadro 9, figura 3), el valor promedio con respecto al cuadro 6, es de 0.054, el cual es muy similar al reportado en la literatura, que nos indica, que el cambio de absorbancia por minuto, para una muestra con actividad normal es aproximadamente de 0.05 (20). Los pacientes manejados tienen un incremento, que nos indica una actividad enzimática total.

En el cuadro 10 y la figura No.4, se observa que la frecuencia más alta de actividad enzimática se encuentra en el intervalo de 1.53 a 1.83 unidades de enzima, grupo en el cual se encuentra el mayor numero de pacientes. El valor promedio de actividad enzimática, es de 1.6, el cual se encuentra dentro del intervalo antes mencionado. Estos valores se encuentran moderadamente por debajo de los normales, reportados en bibliografía, los cuales son de 2.0 a 4.4 unidades de NADH-MHB reductasa (20).

De acuerdo a los datos antes mencionados, se puede decir que aparentemente, los valores de MHB son aceptables, así como la actividad de la enzima. Dicha actividad se encuentra levemente disminuida, con respecto a los valores normales reportados.

Para saber, si el sexo y la edad influyeron de alguna manera en la concentración de Hb, MHB y en la actividad enzimática, se dividió el grupo en estudio, en diferentes rangos de edad, primero sin tomar en cuenta el sexo y posteriormente se realizó el mismo análisis tanto para el sexo femenino, como para el sexo masculino.

En la figura No.5, tenemos que la concentración más alta de Hb, se encuentra en el intervalo de edad de 10 a 20 años. A pesar de que en los demás intervalos la concentración de hemoglobina, se ve levemente disminuida con respecto al anterior, se puede decir que en general la población estudiada, no presenta problemas de anemia.

La concentración de metahemoglobina cae dentro de los límites permisibles, sin embargo se puede ver que en el grupo por arriba de los 50 años, la concentración de metahemoglobina, se incrementa a niveles de 3,56% de Mhb en promedio, que corresponden a los niveles más bajos de actividad enzimática (figura 5).

Del mismo modo se realizó, un análisis comparativo entre los tres parámetros establecidos, tanto para el sexo femenino, como para el sexo masculino, manteniendo siempre los mismos intervalos de edades (figuras 6 y 7). En ambos casos los valores de hemoglobina se encuentran dentro de los valores normales, confirmando de este modo que no existen problemas de anemia, en los pacientes estudiados.

Las concentraciones más altas de Mhb tanto para el sexo masculino, como para el femenino se encontraron en las edades de 51 a 60 años, mostrando un incremento marcado en las mujeres (figura 6), aquí se encuentra un gran número de amas de casa que se exponen en muchas ocasiones a hipoclorito y fungicidas, que son muy usados en el hogar. Estos son eliminados más lentamente ya que se acumulan en tejido adiposo, dando como resultado metahemoglobinemia.

Las figuras 6 y 7, no muestran una diferencia marcada, con respecto a la actividad de la NADH-Mhb reductasa, entre el sexo masculino y el sexo femenino. A excepción del sexo masculino, en el intervalo de 51 a 60 años, en este caso la actividad de la enzima es en promedio de 0.89 unidades de enzima, la cual se ve muy disminuida en relación a los valores normales (2.0 a 4.4 U. de enzima). Estos pacientes pueden estar recibiendo medicamentos capaces de oxidar a la hemoglobina y que del mismo modo pueden ocasionar la inhibición de los mecanismos de los eritrocitos, que protegen a la hemoglobina contra la oxidación (14).

En las figuras 8,9,10, se observa una comparación entre los promedios de pendiente obtenidos para ambos sexos, sexo femenino y sexo masculino, respectivamente.

En los tres casos la pendiente con menor inclinación, corresponde a la edad de 51 a 60 años, indicándonos de esta forma, que la actividad de la diaforasa es muy baja. Esto puede deberse a que en edades avanzadas, los sistemas de defensa del organismo disminuyen su efectividad, aunado a que toda la población del D.F. se encuentra expuesta a altos niveles de contaminación.

En la figura 11 se observa una diferencia entre las pendientes, las cuales nos dan una idea de la actividad de la NADH-MHb reductasa (DIAFORASA), para los pacientes de 10 a 20 años y entre los pacientes de 50 años en adelante donde se tiene un incremento de la actividad, en los primeros grupos, mientras que en los últimos, esta actividad decrece.

Existe una tendencia de mayor actividad por debajo de los 40 años a partir de este punto existe una caída de la actividad, acentuándose a partir de los 50 años.

Aparentemente la actividad hasta los 50 años es suficiente para mantener los rangos de MHb cerca de los valores normales, sin embargo variaciones mínimas de pendiente (actividad), después de los 50 años la concentración de MHb se dispara al doble.

A partir de los 40 años se ve una tendencia de disminución de actividad que pudiera asociarse en cierta medida al envejecimiento.

El riesgo de exposición a agentes oxidantes, depende mucho del tipo de actividad, tal vez se trate en su mayoría de personas, que debido a su ocupación, están más expuestas a la contaminación ambiental o a sustancias tóxicas que tengan como consecuencia, una inhibición de la enzima, además de un incremento en los niveles de metahemoglobina.

Finalmente se buscó la relación entre concentración de hemoglobina, metahemoglobina con la actividad de diaforasa, para ver si cuando encontrábamos menor concentración de Hb, la actividad enzimática de diaforasa se encuentra disminuida, al igual que cuando los niveles de metahemoglobina se encuentran elevados, pero no fue así; se realizó un estudio estadístico de correlación lineal, en ambos casos se obtuvieron valores de correlación al rededor de 0.002, valor muy bajo, lo que nos indica que la actividad enzimática es independiente de la concentración de Hb y MHb, pueden darse casos de anemia, con una actividad normal o por el contrario una actividad disminuida, con una concentración de Hb normal.

Los niveles de metahemoglobina encontrados en este estudio en su mayoría se encuentran dentro de los valores normales, aunque ya en el límite máximo permitido. La concentración más alta de metahemoglobina, se encuentra entre 5.6 a 7.2% y solo la presentan 5 personas (cuadro 8). No llegan a niveles en que la cianosis se haga evidente mucho menos a concentraciones que lleguen a causar incapacidad, que van desde un 35% hasta un 45%.

Los problemas de disfunción enzimática, de tipo congénito son muy raros, por tanto, se puede decir que las observaciones, en las cuales la actividad de diaforasa se encuentra disminuida, se deben a problemas de agentes tóxicos a los que estamos expuestos cotidianamente, por la contaminación, alimentos contaminados con sales, pesticidas y medicamentos con capacidad de oxidar a la hemoglobina, como por ejemplo los analgésicos que son frecuentemente utilizados, indiscriminadamente.

Desconocemos con exactitud cuales son los niveles críticos de baja actividad enzimática que disparan los niveles de MHB. Para conocer con mayor claridad estas variaciones en los niveles de MHB con respecto a la edad es recomendable continuar y profundizar más en el estudio y caracterización de la enzima, NADH-MHB reductasa, para confirmar si se trata de un nuevo marcador, no reportado, que hace ser más vulnerable al ser humano, con respecto a la edad.

## VIII. CONCLUSIONES

La concentración de metahemoglobina, obtenida en la población en general, es de un 2.13%. De los pacientes estudiados, un 30.8%, presentan metahemoglobinemia.

La actividad de la enzima NADH-MHb reductasa (DIAFORASA), en el grupo estudiado, presenta en su mayoría una actividad levemente disminuida, en relación a los valores normales, un 71.1% de la población en general presentan actividad enzimática por debajo de lo normal.

La actividad enzimática de NADH-MHb reductasa (DIAFORASA), en el grupo estudiado, presenta un incremento variable hasta los 40 años , edad en la cual comienza una tendencia a disminuir la actividad enzimática.

Aparentemente las variaciones en la actividad de la enzima, hasta antes de los 50 años son suficientes para mantener los niveles normales de MHb. Sin embargo después de los 50 años, las variaciones mínimas que se presentan en la actividad de esta enzima no son suficientes y se observa un incremento considerable en los valores de MHb, en esta población.

No existe relación entre la actividad enzimática y la concentración de Hb.



## IX. BIBLIOGRAFIA.

- (1) Ariens, E.J., Lehmann, P.A. y Simonis, A.M. 1978. "Introducción a la toxicología general". 1a. edición, Ed. Diana, México, D.F.
- (2) Balcells, S.G. 1986. "La clínica y el laboratorio". 14a. edición, Ed. Marin. Barcelona España.
- (3) Bernard, Jean. 1982. "Manual de hematología". 4a. edición, Masson S.A. España.
- (4) Beutler, E.K., Blume, J.C. y Kaplan, G.W. 1977. International committee for standardization in haematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. *British J. of Haematology*. 35:331.
- (5) Bickar, D., Bonaventura, C. y Bonaventura, J. 1984. Carbon monoxide driven reduction of ferric heme and heme proteins. *The journal of biological chemistry*. 259(7): 10777-10783.
- (6) Bondasky, O. 1951. Methemoglobinemia and methemoglobin producing compounds. *Pharmacol rev.* 3:144.
- (7) Bowman, W.C. y Rand, M.J. 1984. "Farmacología. bases bioquímicas y patológicas. aplicaciones clínicas". 1a. edición, Ed. Interamericana. México, D.F.
- (8) Cera, Enrico. D., Charles, H.R. y S.J.G.A. 1987. Allosteric interpretation of oxygen-binding reaction of human hemoglobin tetramers. *Biochemistry*. 26:4003-4008.
- (9) Císcar, R.F. y Farreras, P.V. 1980. "Diagnóstico hematológico. Laboratorio y clínica II". 1a. edición, Ed. Jimss. Barcelona, España.

(10) Comly, H.H. 1945. Cyanosis in infantes cased by nitrates in well wather. J. Amer. med. Ass. 129:112.

(11) Davidson, I. y Herry, J.B. 1984. "Diagnóstico clínico por el laboratorio". 7a. edición, Ed. Salvat. Barcelona, España.

(12) Daniels, Wayne. W. 1984. "Bioestadística. Bases para el análisis de la s ciencias de la salud". 1a. Edición, Ed. Limusa. México, D.F.

(13) Dreisbach, R.H. 1984. "Manual de toxicología clínica, prevención, diagnostico y tratamiento". 5a. edición, Ed. El manual moderno. México, D.F.

(14) Farreras, Valenti. P. 1990. "Medicina interna". 12a. edición, Ed. Dogma. México, D.F.

(15) Finch, C.A. 1948. Methemoglobinemia and Sulphemoglobinemia. N. Engl. J. Med. 239:490.

(16) González, R., Estrada, M., Suarch, E., Fernández, O., Ortiz, R., Guzmán, E., y Colombo, B. 1978. Heterogeneity of hereditary methaemoglobinaemia: A study of 4 cuban families with NADH-Methaemoglobin reductase deficiency including a new variant. Scand. J. Haematology. 20:385-393.

(17) Guyton, Arthur. C. 1984. "Tratado de fisiología médica". 6a. edición Ed. Interamericana. México, D.F.

(18) Harper, A., Rodwell, W.V. y Mayes, A.P. 1988. "Manual de química fisiológica". 11a. edición, Ed. El manual moderno. México, D.F.

(19) Hegesh, E. y Avron Moc. 1967. The enzymatic reduction of ferrihemoglobin reductase. I. the reduction of ferrihemoglobin in red bloos cells and hemolysates. Biochim. Biophys. Acta. 146:91-101.

(20) Hegesh, E., Calmanovici, N. y Avron M. 1968. New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-Methemoglobin reductase) in erythrocytes. J.Lab. and Clin. Med. 72(2):339-344.

(21) Henry R., Cannon D.C. y Winkilman, J.W. 1980. "Química Clínica. Bases y técnicas". 2a. edición, Ed. Interamericana. México, D.F.

- (22) Hirano, M. y Matsuki, T. 1981. Congenital Mhb due to NADH-methemoglobin reductase deficiency: Successful treatment oral riboflavin. *Br. J. Hematology*. 47:35-38.
- (23) Jaffe, Ernst. R. 1959. The reduction of methemoglobin in human erythrocytes incubated with purine nucleosides. *J. Clin. Invest.* 38:1555.
- (24) Jaffe, E.R. 1966. Hereditary methemoglobinemias. Associated erythrocytes in the metabolism of erythrocytes. *Am. J. Med.* 41:786.
- (25) Joseph, E. y Beutler, E. 1966. Methemoglobin formation and reduction in man and various animal species. *A. Journal. Invest.* 210(2):347-350.
- (26) Karim, Michael. A. 1990. "Toxicología". 4a. edición, Ed. Lewis Publishers. Inc. U.S.A.
- (27) Kaplan, J.C. y Beutler, E. 1967. Division of medicine. Electrophoresis of red cell NADH- and NADPH-Diaphorases in normal subjects and patients with congenital Methemoglobinemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 29(4):605-610.
- (28) Kiese, M. 1966. The Biochemical production of ferrihemoglobin forming derivatives from aromatic amines and mechanisms of ferrihemoglobin formation. *Pharmacol. rev.* 18:1091.
- (29) Krupp, Marcus. A. 1985. "Diagnóstico clínico y tratamiento". 23a. edición, Ed. El manual moderno. México, D.F.
- (30) Kuma, F., Ishiawa, S., Hirayama, K. y Nakajima, H. 1972. Studies on Methemoglobin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 247(2): 550-555.
- (31) Kuma, F., Prough, R.A. y Masters, B.S. 1976. Studies on methemoglobin reductase. *Archives of Biochemistry and Biophy.* 172:600-607.
- (32) Loomis, Ted. A. 1982. "Fundamentos de toxicología". 3a. edición, Ed. Acribia. España.
- (33) Marden, Michael. C., Kister, J. Bohn, B. y Poyart, C. 1991. Allosteric transition in triply Methaemoglobin. *J. Mol. Biol.* 217:303-306.
- (34) Mertz, E.T. 1985. "Bioquímica". 1a. edición, Publicaciones Culturales. México, D.F.
- (35) Meyers, Frederik. H. 1980. "Manual de farmacología clínica". 5a. edición, Ed. el manual moderno. México, D.F.

- (36) Papandreou, P. y Rakitzis, E. 1989. determination of  $\text{NADH}_2$ -ferricyanide oxidoreductase. Activity of human erythrocytes by an analysis of the time-dependence of  $\text{NADH}_2$  oxidation. *Clinica Chimica Acta*. 181:189-196.
- (37) Peters, J.P. y Vanslyke, D.D. 1981. "Hemoglobin and oxygen carbonic acid and acid-base balance". 1a. edición, The Williams and Wilkins Company. U.S.A.
- (38) Ranney, H.M., Nagel, R.L. Heller, P. y Uden, L. 1965. Oxygen equilibrium of hemoglobin Mhyde park. *Biochim. Biophys. Acta*. 168:262.
- (39) Rapaport, S.I. 1981. "Introducción a la hematología". 1a. edición, Ed. Salvat. Barcelona España.
- (40) Scott, E.M. y Griffith, I.V. 1959. The enzymic defect of hereditary methemoglobinemia:Diaphorase. *Biochim. et. Biophys. Acta*. 34:600-607.
- (41) Scott, E.M. 1960. The relation of Diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. *J. Clin. Invest.* 39:117.
- (42) Sugita, Y., Nomura, S. e Yoneyama, Y. 1971. Purification of reduced purine nucleotide deshydrogenasa from human erythrocytes and methemoglobin reduction by the enzyme. *The Journal of Biol. Chemistry*. 246(19):6072-6078.
- (43) Sugita, Y. e Yoneyama, Y. 1971. Mehtemoglobin reduction in normal and congenital methemoglobinemic eritrocytes. *J. Biol. Chem.* 246:287-294.
- (44) Woodliff, H.J. 1981. "Hematología clínica". 1a. edición, Ed. El manual moderno. México, D.F.