

## LAS ERITROENZIMOPATIAS HEREDITARIAS. II. METODOS Y PROCEDIMIENTOS DE TAMIZAJE<sup>1</sup>

Gerardo Vaca,<sup>2</sup> Ana Lilia Velázquez<sup>2</sup> y José Maria Cantú<sup>2</sup>

*Se describen los métodos y procedimientos enzimáticos de tamizaje por fluorescencia para la detección de 9 de las 14 eritroenzimopatías hereditarias asociadas con hemólisis, y se discuten las diferentes fases que comprende la detección y caracterización de estos defectos enzimáticos.*

### Introducción

En los últimos años se han descrito más de 20 diferentes deficiencias hereditarias de enzimas del eritrocito y por lo menos 14 de ellas están asociadas con hemólisis aguda o crónica (1, 2). En ausencia de información proporcionada por los estudios enzimáticos, es difícil distinguir un defecto de otro. La realización de estos estudios enzimáticos en casos con sospecha de eritroenzimopatías asociadas a síndromes hemolíticos es laboriosa puesto que es necesario cuantificar por lo menos 14 actividades diferentes de una sola vez para determinar si está presente una de las múltiples deficiencias notificadas. Además, no compensa la cantidad de tiempo invertido debido a la prevalencia relativamente baja de una eritroenzimopatía particular; es probable que esta sea una de las razones por las que muchas instituciones limitan sus programas a un solo defecto, en general la defi-

ciencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-FD).

Si bien se han descrito varios métodos de tamizaje para la detección individual de algunos errores congénitos del metabolismo del eritrocito (3-6), esa búsqueda puede ser más fructífera mediante el uso de procedimientos de tamizaje que saquen provecho de la interdependencia de las vías metabólicas de tal forma que, con un mínimo de ensayos, se pruebe la integridad de múltiples reacciones enzimáticas. Este enfoque eliminaría a la mayoría de las muestras de estudios adicionales y, en los casos positivos, se facilitaría la selección de la metodología cuantitativa específica con fines confirmatorios. Recientemente, entre 1980 y 1981, el grupo de trabajo de los autores ha ideado varios procedimientos de tamizaje (7, 8) que reúnen dichas características y que, usados en combinación con los diferentes métodos individuales descritos en la literatura, permiten la detección de 9 diferentes eritroenzimopatías hereditarias asociadas con anemia hemolítica. Las características de esta metodología cualitativa son tales que por su versatilidad, sencillez y economía pueden llevarse a la práctica en laboratorios con recursos mínimos.

La Unidad de Investigación Biomédica

<sup>1</sup> Este artículo es el segundo de dos que se publican en el *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. El primero, donde se presentan los aspectos bioquímicos y genéticos, apareció en el Vol 97, N° 3, 1984.

<sup>2</sup> Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico de Occidente, Unidad de Investigación Biomédica, División de Genética, Guadalajara. Dirección postal: Apartado postal 1-3858, Guadalajara, Jalisco, México.

del Centro Médico de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Guadalajara, lleva a cabo un programa para la detección de eritroenzimopatías hereditarias en pacientes con anemia hemolítica y en recién nacidos con ictericia cuyos objetivos son diagnóstico y prevención, y determinación de la frecuencia relativa para evaluar la magnitud como problema médico.

En relación con el programa, el objetivo de este trabajo consiste en presentar, con fines de divulgación entre un público especializado más amplio, una recopilación de las técnicas cualitativas de fluorescencia a la luz ultravioleta para la detección de las eritroenzimopatías hereditarias asociadas con anemia hemolítica.

## Materiales y métodos

### *Fundamento y procedimientos generales*

En los métodos cualitativos se aprovecha la propiedad que tienen los nucleótidos de piridina reducidos (NADH, NADPH) de fluorescer intensamente cuando se activan con luz ultravioleta de onda larga (3). Los ensayos se basan en la reducción de un nucleótido de piridina oxidado (NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup>) en los métodos para las deficiencias de adenilato de kinasa (AK), hexokinasa (Hx), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-FD), glucosa fosfato isomerasa (GFI), fosfofructokinasa (FFK), aldolasa (AL) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAFD) y en la oxidación de un nucleótido de piridina reducido (NADH) en los métodos para las deficiencias de triosa fosfato isomerasa (TFI), fosfoglicerato kinasa (FGK) y piruvato kinasa (PK). El mismo procedimiento general se usa en todos los métodos; un volumen de sangre se agrega a 10 volúmenes de mezcla de reacción que contiene el sustrato de la enzima correspondiente,

el nucleótido de piridina y un agente hemolítico (3).

Inmediatamente después de la adición de la muestra de sangre a la mezcla de reacción se toma una alícuota (5 a 10  $\mu$ ) de la mezcla de incubación y se coloca sobre papel filtro (tiempo 0); la mezcla de incubación se introduce en un baño a 37 °C y después de períodos de tiempo específicos para cada método se toman alícuotas adicionales que se colocan sobre papel filtro. Después de que se han secado las manchas se examina el papel filtro en la oscuridad bajo luz ultravioleta de onda larga para observar la aparición o desaparición de fluorescencia según el método específico (3). El volumen de sangre necesario para la realización de todos los procedimientos de tamizaje es mínimo, de 3 a 4 capilares de sangre heparinizada obtenida por punción con lanceta del pulpejo de un dedo o del talón. Esto es particularmente ventajoso cuando se desea estudiar recién nacidos. Sin embargo, es conveniente disponer de más sangre (un par de capilares, por ejemplo) por si fuese necesario repetir alguno de los métodos.

El diagnóstico de algunas eritroenzimopatías durante crisis hemolíticas agudas con frecuencia se dificulta al encontrar niveles de actividad enzimática falsamente normales. En general, la distribución de actividad enzimática en la población de eritrocitos depende de la "edad" pues corresponde mayor actividad a las células jóvenes y menor actividad a las células viejas. Estas son eliminadas preferencialmente de la circulación en las crisis hemolíticas, lo que produce un número desproporcionado de eritrocitos jóvenes con niveles elevados de actividad enzimática, por lo tanto, la medición de actividades enzimáticas en muestras de sangre total durante crisis hemolíticas puede resultar en valores dentro del rango normal. Para hacer posible el reconocimiento del defecto enzimático, a pesar de la crisis hemolítica, se mide la actividad enzimática en los eritrocitos

viejos persistentes para cuya separación se emplea un método basado en los cambios de densidad asociados con el envejecimiento del eritrocito (9-11).

Para preparar una suspensión al 20% de eritrocitos viejos se usa sangre heparinizada, se llena un capilar y se centrifuga durante 5 min a 15 000 rpm en una centrífuga de microhematocrito; se suspende el 30% inferior del paquete globular en 4 volúmenes de NaCl, 0,15 M. Esta suspensión se usa como fuente de enzimas en los procedimientos para las deficiencias de adenilato kinasa, hexokinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; glucosa fosfato isomerasa, fosfofructokinasa, aldolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; piruvato kinasa. En los métodos individuales para las deficiencias de glucosa fosfato isomerasa, fosfoglicerato kinasa y triosa fosfato isomerasa, se usa sangre total heparinizada y diluida con agua a 1:21, 1:51 y 1:301, respectivamente.

De forma invariable, cada vez que se estudia a un paciente con sospecha de una eritroenzimopatía hereditaria por medio de estos procedimientos es conveniente examinar simultáneamente una muestra de un control normal. Si se desea establecer un programa masivo para la detección de eritroenzimopatías hereditarias en poblaciones seleccionadas (por ejemplo, recién nacidos con hiperbilirrubinemia) de tal manera que en un día de trabajo se analicen múltiples muestras, no es necesaria la inclusión de un control normal, ya que muchas de las muestras darán resultados negativos y, por lo tanto, servirán como controles.

(En el programa donde se origina el presente trabajo, los proveedores comerciales de este procedimiento fueron: lámpara ultravioleta de onda larga, Ultraviolet Products, Inc. San Gabriel, California, EUA; reactivos: Sigma Chemical Co., 3500 Dekalb St., St. Louis, Missouri, EUA, y Calbiochem, 10933 N. Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, EUA.)

### *Procedimientos específicos*

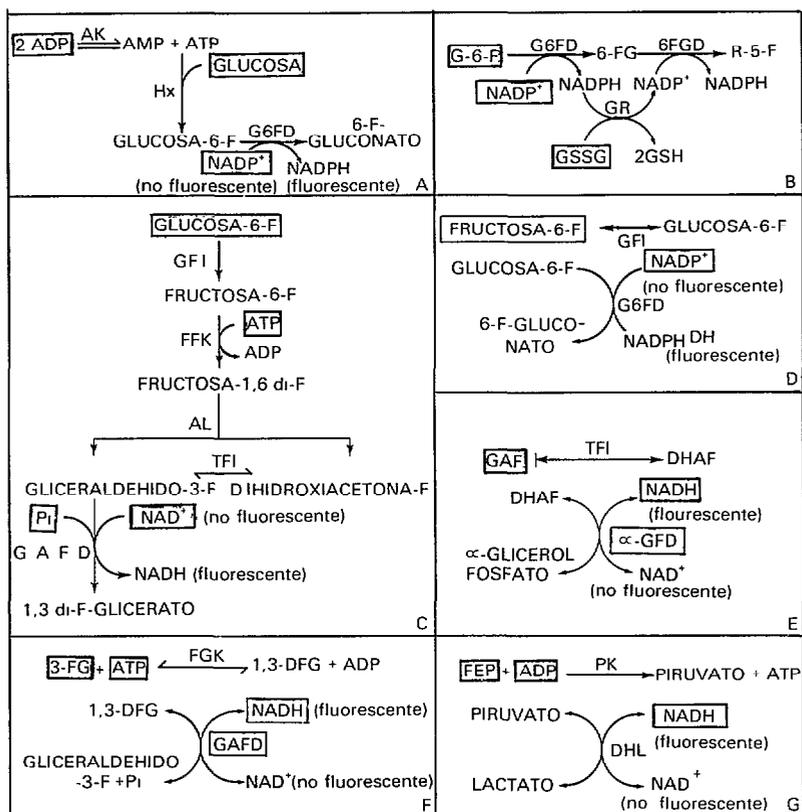
A. Procedimientos de tamizaje para las deficiencias de adenilato kinasa, hexokinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (7).

*Fundamento* (figura 1, sector A). El procedimiento consta de dos pasos: *Paso 1*. La adenilato kinasa (AK) cataliza la dismutación del ácido adenosindifosfórico (ADP) en ácido adenosinomonofosfórico (AMP) y ácido adenosintrifosfórico (ATP); el ATP formado se acopla a la hexokinasa (Hx) en presencia de glucosa para que ocurra la formación de glucosa-6-fosfato, la cual se acopla a la G-6-FD en presencia de NADP<sup>+</sup>. Si las tres actividades enzimáticas están presentes en la muestra de sangre, el NADP<sup>+</sup> será reducido a NADPH, que es un compuesto fluorescente, y el procedimiento de tamizaje habrá terminado. En ausencia de cualquiera de las tres enzimas, el NADP<sup>+</sup> no se reducirá y por lo tanto no aparecerá fluorescencia, en cuyo caso se procede a realizar el paso 2 (figura 2). *Paso 2*. La Hx cataliza la fosforilación de la glucosa por el ATP con formación de glucosa-6-fosfato; este último compuesto se acopla a la G-6-FD en presencia de NADP<sup>+</sup> el cual se reducirá a NADPH si ambas actividades están presentes en la muestra. La ausencia de fluorescencia indicará deficiencia de Hx o de G-6-FD (figura 2). Ambos pasos, dados en combinación con el método de tamizaje para la deficiencia de G-6-FD, permiten la detección de cualquiera de las tres eritroenzimopatías (figura 2).

*Composición de 1 ml de mezcla de reacción. Paso 1*. Solución amortiguadora Tris-HCl, 1M, pH 8,0, 0,30 ml; ADP<sup>3</sup> (neutralizado) 250 mM, 0,20 ml; glucosa 100 mM, 0,10 ml; NADP<sup>+</sup> 7,5 mM, 0,10 ml; MgCl<sub>2</sub> 100 mM, 0,10 ml; saponina 1%, 0,20 ml. *Paso 2*. Solución amortiguadora Tris-HCl, 1M, pH 8,0, 0,30 ml;

<sup>3</sup> (Neutralizar con NaOH 0.2 N entre pH 7-8 medido con papel pH)

**FIGURA 1—Reacciones enzimáticas involucradas en los diferentes métodos de tamizaje. (Los componentes de las mezclas de reacción aparecen encerrados en rectángulos.)**



ATP<sup>s</sup> (neutralizado) 250 mM, 0,20 ml; glucosa 100 mM, 0,10 ml; NADP<sup>+</sup> 7,5 mM, 0,10 ml; MgCl<sub>2</sub> 100 mM, 0,10 ml; saponina 1%, 0,20 ml.

**Procedimiento.** Los métodos 1 y 2 se realizan adicionando 0,010 ml de suspensión de eritrocitos al 20% a 0,100 ml de la mezcla de reacción correspondiente e incubando a 37 °C durante 2 horas (paso 1) y 1 hora (paso 2). En el paso 1 se toman alícuotas de la mezcla de incubación, que se colocan sobre papel filtro a los 0,60 y 120 min de incubación y en el paso 2 a los 0,30 y 60 min. Se dejan secar las manchas y se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

**Interpretación.** Las manchas de tiempo cero no deberán fluorescer; las muestras

de sujetos normales fluorescerán a partir de los 30 min (paso 2) y 60 min (paso 1) y la fluorescencia será muy intensa a los 60 min (paso 2) y 120 min (paso 1).

Como se mencionó anteriormente, la aparición de fluorescencia en el paso 1 indicará que las actividades de AK, Hx y G-6-FD están presentes en la muestra de sangre. Sin embargo, la ausencia de fluorescencia puede deberse a la deficiencia de cualquiera de las tres enzimas; en este caso deberán darse el paso 2 y el procedimiento para la deficiencia de G-6-FD (ver procedimiento B); si ambos pasos dan resultados negativos (pues aparece fluorescencia), la deficiencia probable es de AK. Si el paso 2 da un resultado positivo y el método para la deficiencia de G-6-

**FIGURA 2—Resultados posibles en el procedimiento de tamizaje para las deficiencias de AK, Hx y G-6-FD.**

Deficiencia probable	Sustratos		
	ADP + Glucosa	ATP + Glucosa	Glucosa-6 F
Ninguna	F		
AK	NF	F	
Hx	NF	NF	F
G-6-FD	NF	NF	NF

Reacciones enzimáticas involucradas	$2 \text{ ADP} \xrightarrow{\text{AK}} \text{ATP} + \text{AMP}$ $\text{Glucosa} \xrightarrow{\text{Hx}} \text{GLU-6 P}$ $\text{GLU-6 P} \xrightarrow{\text{G6FD}} \text{6 F Gluconato}$ $\text{NADP}^+ \text{ (NF)} \xrightarrow{\text{G6FD}} \text{NADPH} \text{ (F)}$
-------------------------------------	---

FD da un resultado negativo, la deficiencia probable es de Hx. Ambos pasos darán resultados positivos en la deficiencia de G-6-FD (figura 2).

B. Procedimiento de tamizaje para la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-FD) (3, 12).

*Fundamento* (figura 1, sector B). Cuando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-FD) está presente en el hemolizado, la glucosa-6-fosfato (G-6-F) es oxidada a 6-fosfogluconato (6-FG) y el  $\text{NADP}^+$  es reducido a NADPH. Ya que la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-FGD) está presente virtualmente en todos los hemolizados, ocurre una reducción adicional del  $\text{NADP}^+$  en la reacción catalizada por la 6-FGD. En hemolizados medianamente deficientes de G-6-FD, incubados en presencia de G-6-F y  $\text{NADP}^+$  se forma una pequeña cantidad de NADPH. En presencia de glutatión oxidado (GSSG), que forma parte de la mezcla de reacción, el NADPH es reoxidado en la reacción catalizada por la glutatión reductasa (GR). Por lo tanto, el método de tamizaje mide la diferencia entre aproximadamente dos veces la actividad de G-6-FD y la actividad de GR.

*Composición de 1 ml de mezcla de reacción.* G-6-F 10 mM, 0,10 ml;  $\text{NADP}^+$  7,5 mM, 0,10 ml; saponina 1%, 0,20 ml; solución amortiguadora Tris-HCl 750 mM, pH 7,8, 0,30 ml; GSSG 8 mM, 0,10 ml; agua, 0,20 ml.

*Procedimiento.* El ensayo se realiza adicionando 0,010 ml de suspensión de eritrocitos al 20% a 0,100 ml de mezcla de reacción e incubando a 37 °C durante 10 min; se toman alícuotas de la mezcla de incubación a los 0 y 10 minutos y se colocan sobre papel filtro Whatman. Una vez secas las manchas se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

*Interpretación.* En muestras normales, la primera mancha puede fluorescer ligeramente y la mancha correspondiente a los 10 min de incubación fluorescerá intensamente. Las muestras deficientes mostrarán poca o ninguna fluorescencia en ambas manchas.

C. Procedimiento de tamizaje para las deficiencias de glucosa fosfato isomerasa, fosfofructokinasa, aldolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (8).

*Fundamento* (figura 1, sector C). El procedimiento se basa en la conversión de la glucosa-6-fosfato a 1,3-difosfoglicerato



*Procedimiento.* El ensayo se realiza adicionando 0,010 ml de suspensión de eritrocitos al 20% (en recién nacidos) o 0,010 ml de sangre total heparinizada (individuos adultos) a 0,100 ml de mezcla de reacción (sustrato: glucosa-6-fosfato) e incubando a 37 °C durante 90 min. Se toman alícuotas de la mezcla de incubación a los 0, 30, 60 y 90 min y se colocan sobre papel filtro Whatman. Una vez secas las manchas se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

*Interpretación.* La primera mancha no debe fluorescer. Las muestras de sujetos normales fluorescerán a partir de los 30 min y a los 60 y 90 min la fluorescencia será muy intensa. Las muestras de sangre de individuos con deficiencia de GFI, FFK, AL o GAFD no mostrarán fluorescencia. La identificación del defecto específico se determina repitiendo el procedimiento de usar tres mezclas de reacción diferentes que contengan uno de los siguientes sustratos: fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-difosfato, gliceraldehído-3-fosfato (figura 3).

D. Método de tamizaje para la deficiencia de glucosa fosfato isomerasa (5).

*Fundamento* (figura 1, sector D). La glucosa fosfato isomerasa (GFI) cataliza la interconversión de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. En el método de tamizaje la fructosa-6-fosfato se usa como sustrato y la glucosa-6-fosfato formada se acopla a la G-6-FD en presencia de NADP<sup>+</sup> (no fluorescente). Si la actividad de GFI está presente en la muestra de sangre, se formará glucosa-6-fosfato, lo que puede ser visualizado por la reducción del NADP<sup>+</sup> a NADPH (fluorescente). En ausencia de actividad de GFI no ocurre formación de glucosa-6-fosfato, por lo tanto el NADP<sup>+</sup> no se reduce y no aparece fluorescencia.

*Composición de 1 ml de mezcla de reacción.* Solución amortiguadora Tris-HCl 1M- EDTA 5 mM, pH 8,0, 0,100 ml; MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, 0,100 ml; NADP<sup>+</sup> 2 mM,

0,200 ml; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 10 U/ml, 0,100 ml; agua, 0,400 ml; fructosa-6-fosfato 20 mM en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, 0,100 ml.

*Procedimiento.* Se agregan 0,005 ml de sangre a 0,100 ml de agua. El ensayo se realiza adicionando 0,005 ml de lisado a 0,100 ml de mezcla de reacción e incubando a temperatura ambiente durante 30 min. También se incuba un tubo control que solo contenga mezcla de reacción. Se toman alícuotas a los 0, 15 y 30 min de incubación, las que se colocan en papel filtro Whatman. Una vez secas las manchas se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

*Interpretación.* Las manchas de 0 min mostrarán poca o ninguna fluorescencia en ambos tubos. Las muestras normales fluorescerán fuertemente a los 15 y 30 min. Las muestras de pacientes con deficiencia grave de GFI mostrarán poca fluorescencia o no mayor fluorescencia que las manchas correspondientes a la mezcla de reacción sin hemolizado. Este control fluorescerá ligeramente debido a que las preparaciones comerciales de fructosa-6-fosfato invariablemente están contaminadas con glucosa-6-fosfato lo cual resultará en la reducción de algo de NADP<sup>+</sup> a NADPH.

E. Método de tamizaje para la deficiencia de triosa fosfato isomerasa (4).

*Fundamento* (figura 1, sector E). La triosa fosfato isomerasa (TFI) cataliza la interconversión de gliceraldehído-3-fosfato (GAF) y dihidroxiacetona fosfato (DHAF). En el método de tamizaje la reacción se ensaya en la dirección de formación de DHAF; este compuesto se acopla a la enzima  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GFD) en presencia de NADH (fluorescente). Si la actividad de TFI está presente en la muestra de sangre, se formará DHAF, lo que puede ser visualizado por la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> (no fluorescente). En ausencia de actividad de TFI, no ocurre formación de DHAF, por

lo tanto el NADH no se oxida y la fluorescencia persistirá.

*Composición de 1 ml de mezcla de reacción.* Solución amortiguadora trietanolamina 0,1 M, pH 8,0, 0,500 ml; NADH 7 mM, 0,100 ml; DL-gliceraldehído-3-fosfato 50 mg/ml ( $\sim$  290 mM), 0,010 ml;  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa 8 U/ml; 0,010 ml; EDTA 0,027 M, 0,200 ml; agua, 0,180 ml. Cuando se prepara la mezcla de reacción es importante que la solución amortiguadora se adicione a la mezcla primero, de tal forma que el NADH no sea destruido por el gliceraldehído-3-fosfato, que tiene un pH ácido.

*Procedimiento.* Se usa sangre recolectada en EDTA, heparina o solución de ACD. Se prepara un hemolizado adicionando 0,010 ml de sangre total a 3,0 ml de agua destilada y mezclando bien. El ensayo se realiza adicionando 0,010 ml de hemolizado a 0,100 ml de mezcla de reacción e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se toman alícuotas de la mezcla de incubación a los 0 y 30 min, que se colocan en papel filtro Whatman. Una vez secas las manchas se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

*Interpretación.* La mancha de 0 min fluorescerá con brillo. Normalmente la segunda mancha mostrará poca o ninguna fluorescencia. En sujetos con deficiencia de TFI la fluorescencia persistirá en ambas manchas.

F. Método de tamizaje para la deficiencia de fosfoglicerato kinasa (6).

*Fundamento* (figura 1, sector F). La enzima fosfoglicerato kinasa (FGK) cataliza la fosforilación de ADP a ATP por el 1,3-difosfoglicerato (1,3-DFG) con formación de 3-fosfoglicerato (3-FG); la reacción es reversible. En el método de tamizaje, la reacción se ensaya en la dirección de formación de 1,3-DFG, compuesto que se acopla a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAFD) en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) el cual es un compuesto fluores-

cente. Si la actividad de FGK está presente en la muestra de sangre, se formará 1,3-DFG, lo que puede ser visualizado por la oxidación de NADH a  $\text{NAD}^+$ ; este último compuesto no es fluorescente. En ausencia de actividad de FGK no hay formación de 1,3-DFG, por lo tanto el NADH no se oxida y la fluorescencia persistirá.

*Composición de 1 ml de mezcla de reacción.* Solución amortiguadora Tris-HCl, 1M, pH 8,0, 0,30 ml; cloruro de magnesio 100 mM, 0,10 ml; ATP (neutralizado) 80 mM, 0,10 ml; 3-fosfoglicerato 500 mM, 0,20 ml; NADH 5 mM, 0,10 ml; gliceraldehído fosfato deshidrogenasa 40 U/ml, 0,10 ml y agua, 0,10 ml.

*Procedimiento.* Se utiliza como fuente de FGK un hemolizado que se prepara adicionando 0,010 ml de sangre heparinizada a 0,500 ml de agua. El ensayo se realiza agregando 0,010 ml de hemolizado a 0,100 ml de mezcla de reacción e incubando a 37 °C durante 90 min. Se toman alícuotas de la mezcla de incubación a los 0, 30, 60 y 90 min, y se colocan sobre papel filtro Whatman. Una vez secas las manchas se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

*Interpretación.* La mancha del tiempo 0 fluorescerá con intensidad; normalmente la intensidad de la fluorescencia irá disminuyendo en las manchas de los 30 y 60 min y en la de 90 min no habrá fluorescencia. En sujetos con deficiencia de FGK persistirá la fluorescencia en todas las manchas.

G. Método de tamizaje para la deficiencia de piruvato kinasa (3).

*Fundamento* (figura 1, sector G). La piruvato kinasa (PK) cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (FEP) al ADP, formando piruvato y ATP. La deshidrogenasa láctica (DHL) presente en el hemolizado cataliza la reducción del piruvato a lactato y la concomitante oxidación del NADH (fluorescente) a  $\text{NAD}^+$  (no fluorescente). Si la actividad de PK está presente en la muestra de sangre, se formará piruvato, lo que puede

ser visualizado por la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup> con desaparición de la fluorescencia. En ausencia de actividad de PK, no hay formación de piruvato, por lo tanto el NADH no se oxida y la fluorescencia persistirá.

*Composición de 1 ml de mezcla de reacción.* Fosfoenolpiruvato<sup>5</sup> 0,15 M (neutralizado), 0,030 ml; ADP<sup>5</sup> 30 mM (neutralizado), 0,100 ml; NADH 15 mM (neutralizado), 0,100 ml; MgCl<sub>2</sub> 80 mM, 0,100 ml; solución amortiguadora K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 M, pH 7,4, 0,050 ml; agua, 0,620 ml.

*Procedimiento.* El ensayo se realiza adicionando 0,010 ml de suspensión de eritrocitos al 20% a 0,100 ml de mezcla de reacción e incubando a 37 °C durante 30 minutos. Se toman alícuotas de la mezcla de incubación a los 0 y 30 min que se colocan en papel filtro Whatman. Una vez secas las manchas se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

*Interpretación.* Todas las manchas de 0 minutos fluorescerán intensamente. En muestras de sujetos normales la fluorescencia desaparece en la mancha de 30 minutos. En muestras de sujetos deficientes de PK, la fluorescencia persistirá en ambas manchas.

El programa ya citado del Centro Médico de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social para la detección de eritroenzimopatías hereditarias incluye la detección de 9 de las 14 eritroenzimopatías hereditarias asociadas con hemólisis por medio de la metodología descrita anteriormente. Hasta la fecha han sido estudiados los siguientes individuos: grupo A) 1 022 recién nacidos a término sin ictericia; grupo B) 872 recién nacidos a término seleccionados al azar; grupo C) 3 243 recién nacidos a término con ictericia, y grupo D) 54 pacientes con anemia hemolítica en quienes previamente se habían excluido causas adquiridas de hemólisis.

## Resultados

Los resultados parciales del programa mencionado llevado a cabo en Guadalajara han sido motivo de varias comunicaciones (13-15), razón por la cual en este artículo los autores se limitan a señalar los hallazgos más relevantes: a) 1% de la ictericia neonatal en varones parece deberse a la deficiencia de G-6-FD; este hallazgo por sí solo justifica la búsqueda sistemática de este defecto enzimático en neonatos con ictericia; b) las eritroenzimopatías hereditarias como causa de ictericia neonatal parecen no ser un problema de salud pública en la población estudiada, y c) en 12 individuos del grupo de pacientes con anemia hemolítica se identificaron eritroenzimopatías: 2 de ellos, de sexo femenino, tuvieron deficiencia de PK y 10 varones tuvieron deficiencia de G-6-FD; estos datos permiten recomendar la búsqueda sistemática de eritroenzimopatías hereditarias en pacientes con anemia hemolítica. Se insiste en el hecho de que los pacientes de este grupo constituyen una población sumamente seleccionada ya que en todos ellos previamente se habían excluido causas adquiridas de anemia hemolítica. El estudio ha mejorado la calidad del diagnóstico, con una consecuente optimización del manejo médico de los pacientes, así como la implantación de las medidas preventivas adecuadas.

## Discusión

Recientemente se ha descrito en la literatura (16) un método de tamizaje para la cuantificación de glutatión (GSH) en muestras de sangre recogidas en papel filtro. Este método ofrece la posibilidad de identificar a individuos con deficiencia de cualquiera de las dos enzimas que participan en la síntesis de GSH: la  $\gamma$ -glutamilmcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa. Ambas deficiencias enzimáticas se aso-

<sup>5</sup> Neutralizar con NaOH 0,2 N entre pH 7-8 medido con papel pH.

cian con anemia hemolítica. Este método, usado en combinación con los métodos enzimáticos fluorescentes, hace posible la detección de 11 de las 14 eritroenzimopatías hereditarias asociadas a hemólisis. Es evidente que cuando se estudia a un paciente con anemia hemolítica o con hiperbilirrubinemia neonatal, el diagnóstico diferencial debe contemplar no solo las causas adquiridas, sino también las causas hereditarias de hemólisis. Para el diagnóstico de anemias hemolíticas hereditarias por defectos en la membrana del eritrocito (esferocitosis hereditaria) son útiles las pruebas de fragilidad osmótica (17) y de autohemólisis (18), así como la observación de la morfología de los eritrocitos. Sáenz *et al.* (19) del Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines de la Universidad de Costa Rica han propuesto un excelente protocolo analítico de fácil aplicación para el diagnóstico de los defectos hereditarios en la síntesis o en la estructura de la hemoglobina. El diagnóstico y caracterización de las eritroenzimopatías hereditarias comprende tres fases:

*Fase I.* Tamizaje por métodos enzimáticos de fluorescencia para las deficiencias de AK, Hx, G-6-FD, GFI, FFK, AL, TFI, FGK y PK (3-8) y cuantificación de los niveles de GSH para la detección de las deficiencias de  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa o glutatión sintetasa (16); esta fase es de fácil realización en laboratorios con recursos mínimos y posibilita el tamizaje de 11 deficiencias enzimáticas. Se enfatiza el hecho de que la función primaria de las pruebas de tamizaje es de selección y solo las pruebas confirmatorias específicas permiten establecer un diagnóstico definitivo a través de cuantificar la actividad de la enzima afectada.

*Fase II.* Cuantificación de la actividad de la enzima deficiente. Para que los resultados de diferentes laboratorios sean comparables, es conveniente utilizar la

metodología recomendada por el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología (20). Esta fase también incluye la determinación del fenotipo electroforético de la enzima deficiente. El compendio sobre electroforesis de enzimas de Harris y Hopkinson (21) constituye una fuente de información metodológica muy útil.

*Fase III.* Cuantificación de los intermediarios glicolíticos y no glicolíticos, así como purificación de la enzima deficiente para caracterizar sus propiedades bioquímicas y cinéticas. Para la ejecución de esta fase se recomienda solicitar el apoyo de alguno de los siguientes Centros de Referencia:

1) Dr. Ernest Beutler, Scripps Clinic and Research Foundation, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, EUA;

2) Dr. William N. Valentine, University of California, Center for the Health Sciences, Los Angeles, California 90024, EUA;

3) Dra. Marianela Estrada, Apartado postal 8070 (Instituto de Hematología e Inmunología), La Habana, Cuba.

Cuando se identifica a un individuo con una eritroenzimopatía hereditaria es necesario estudiar también a sus familiares con fines diagnósticos y de asesoramiento genético. Finalmente, cabe señalar que actualmente es imperativo considerar a las eritroenzimopatías hereditarias como posibilidad diagnóstica al evaluar a un paciente que presenta anemia hemolítica o hiperbilirrubinemia, o ambas. La identificación de la etiología exacta de la hemólisis permitirá un manejo adecuado del paciente.

*Otros errores congénitos del metabolismo del eritrocito*

Varios defectos enzimáticos hereditarios, sin expresión hematológica o con expresión

**CUADRO 1—Otras deficiencias enzimáticas hereditarias del eritrocito susceptibles de diagnóstico.**

Enfermedad	Enzimas deficientes	Modo de herencia <sup>a</sup>
Acatalasemia	Catalasa	AR
Síndrome de Lesch-Nyhan	Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa	LX
Inmunodeficiencia (inmunidad de células T defectuosa)	Purina nucleósido fosforilasa	AR
Acidosis tubular renal	Anhidrasa carbónica-I	AR
Metahemoglobinemia	NADH-metahemoglobina reductasa	AR
Galactosemia	Galactokinasa, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa o uridina difosfato galactosa-4-epimerasa	AR
Inmunodeficiencia combinada grave	Adenosina desaminasa	AR
Hiperargininemia	Arginasa	AR

<sup>a</sup> AR: autosómico recesivo. LX: ligado al sexo.

hematológica diferente de hemólisis, pueden diagnosticarse usando al eritrocito como material de estudio para medir actividades enzimáticas específicas (cuadro 1). Existen procedimientos enzimáticos de tamizaje por fluorescencia para la identificación de varias de las enfermedades indicadas en el cuadro 1, tales como la metaemoglobinemia (22), la galactosemia (23, 24), la inmunodeficiencia combinada grave (25, 26) y la hiperargininemia (27). Por la gravedad del cuadro clínico y por la posibilidad de terapia, la detección temprana es particularmente importante en las tres últimas enfermedades.

## Resumen

En relación con un programa de detección de eritroenzimopatías, se revisan los métodos y procedimientos de tamizaje. Se han descrito más de 20 diferentes eritroenzimopatías hereditarias. El denominador común en 14 de estas, es la presencia de anemia hemolítica, razón por la cual no es posible distinguir un defecto de otro sin practicar estudios enzimáticos específicos, generalmente laboriosos y que requieren de recursos no disponibles en todos los laboratorios. Se presentan nuevos proce-

dimientos enzimáticos de tamizaje por fluorescencia para la detección de eritroenzimopatías hereditarias. Dichos procedimientos se basan en la interdependencia de las vías metabólicas, de tal forma que con un número mínimo de ensayos se prueba la integridad de múltiples reacciones enzimáticas. Estos procedimientos, usados en combinación con otros métodos de tamizaje notificados, hacen posible la detección de las siguientes eritroenzimopatías asociadas con hemólisis: deficiencias de adenilato kinasa, hexokinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa fosfato isomerasa, fosfofructokinasa aldolasa, triosa fosfato isomerasa, fosfoglicerato kinasa, piruvato kinasa,  $\gamma$ -glutamilmisteína sintetasa y glutatión sintetasa. Las características de esta metodología son tales que por su versatilidad, sencillez y economía pueden aplicarse en laboratorios con recursos mínimos y harán posible el tamizaje de 11 eritroenzimopatías. Se describen detalladamente cada uno de los métodos y procedimientos de tamizaje; se mencionan los resultados obtenidos con dicha metodología en el programa para la detección de eritroenzimopatías hereditarias y por último se discuten brevemente las diferentes etapas que comprende la detección y caracterización de las eritroenzimopatías hereditarias. ■

## REFERENCIAS

1. Valentine, W. N. y Tanaka, K. R. Pyruvate kinase and other enzyme deficiency hereditary hemolytic anemias. In: Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. y Fredrickson, D. S. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill, 1978. pp. 1410-1429.
2. Gilman, P. A. Hemolysis in the newborn infant resulting from deficiencies of red blood cell enzymes: Diagnosis and management. *J Pediatr* 84:625, 1974.
3. Beutler, E. A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency. *Blood* 28:553-562, 1966.
4. Kaplan, J. C., Shore, N. y Beutler, E. The rapid detection of triose phosphate isomerase deficiency. *Am J Clin Pathol* 50:656-658, 1968.
5. Blume, K. y Beutler, E. Detection of glucose-phosphate isomerase deficiency by a screening procedure. *Blood* 39:685-687, 1972.
6. Vaca, G., Wunsch, C., Medina, C., García-Cruz, D., Sánchez-Corona, J. y Cantú, J. M. A screening test for phosphoglycerate kinase deficiency. *Ann Genet (Paris)* 24(3):191-192, 1981.
7. Vaca, G., Sánchez-Corona, J., Olivares, N., Medina, C. y Cantú, J. M. A simple screening procedure for adenilate kinase, hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiencies. *Ann Genet (Paris)* 23(3):190-192, 1980.
8. Vaca, G., Medina, C., Wunsch, C., García-Cruz, D., Sánchez-Corona, J. y Cantú, J. M. A simple screening procedure for glucose-phosphate isomerase, phosphofruktokinase, aldolase, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiencies. *Ann Genet (Paris)* 24(4):251-253, 1981.
9. Jandl, J. H. y Cooper, R. A. Hereditary spherocytosis. In: Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. y Fredrickson, D. S. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill, 1978. pp. 1396-1409.
10. Beutler, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. y Fredrickson, D. S. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill, 1978. pp. 1430-1451.
11. Hertz, F., Kaplan, E. y Scheye, E. S. Diagnosis of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Negro male despite hemolytic crisis. *Blood* 35(1):90-93, 1970.
12. International Committee for Standardization in Haematology. Recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Br J Haematol* 43:465-467, 1979.
13. Vaca, G., Ibarra, B., Hernández, A., Olivares, N., Medina, C., Sánchez-Corona, J., Wunsch, C., Godínez, B., Martínez-Basalo, C. y Cantú, J. M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and abnormal hemoglobins in Mexican newborns with jaundice. *Rev Invest Clin (México)* 33:259-261, 1981.
14. Vaca, G., Ibarra, B., Romero, F., Olivares, N., Cantú, J. M. y Beutler, E. G-6-PD Guadalajara. A new mutant associated with chronic nonspherocytic hemolytic anemia. *Hum Genet* 61:175-176, 1982.
15. Vaca, G., Ibarra, B., Hernández, A., Velázquez, A. L., González-Quiroga, G., Romero, F., Medina, C., Zúñiga, P., Martínez, G., Alvarez-Arratia, M. C. y Cantú, J. M. Screening for inborn errors of the erythrocyte metabolism in Northwestern Mexico. *Acta Anthropogenet* 6(4):255-264, 1982.
16. Orfanos, A. P., Naylor, E. W. y Guthrie, R. Ultramicromethod for estimation of total glutathione in dried blood spots on filter paper. *Anal Biochem* 104:70-74, 1980.
17. Beutler, E. Osmotic fragility. In: Williams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J. y Rundles, R. W. eds. *Hematology*. New York, McGraw-Hill, 1977. p. 1609.
18. Beutler, E. Autohemolysis. In: Williams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J. y Rundles, R. W. eds. *Hematology*. New York, McGraw-Hill, 1977. p. 1610.
19. Sáenz, G. F., Elizondo, J., Arroyo, G., Jiménez, J., Montero, G. y Valenciano, E. Diagnóstico de hemoglobinopatías y de trastornos afines. Enfoque poblacional del problema. *Bol Of Sanit Panam* 90(2):127-143, 1981.
20. International Committee for Standardization in Haematology. Recommended methods for red cell enzyme analysis. *Br J Haematol* 35:331-340, 1977.
21. Harris, H. y Hopkinson, D. A. *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. Amsterdam, North-Holland, 1976.
22. Kaplan, J. C., Nicolas, A. M., Hanzlickova-Leroux, A. y Beutler, E. A simple spot screening test for fast detection of red cell NADH-diaphorase deficiency. *Blood* 36:330-333, 1970.
23. Beutler, E. y Baluda, M. C. A simple spot screening test for galactosemia. *J Lab Clin Med* 68:137-141, 1966.
24. Vaca, G., Sánchez-Corona, J., Olivares, N., Medina, C., Ibarra, B. y Cantú, J. M. A simple

- assay for uridine diphosphate galactose 4-epimerase activity. *Ann Genet (Paris)* 23:(2):126-128, 1980.
25. Naylor, E. W., Orfanos, A. P. y Guthrie, R. An improved screening test for adenosine deaminase deficiency. *J Pediatr* 93(3):473-476, 1978.
26. Vaca, G., Sánchez-Corona, J., Olivares, N., Medina, C., Ibarra, B. y Cantú, J. M. A simple rapid fluorescent assay for adenosine deaminase activity. *Ann Genet (Paris)* 22(3):182-184, 1979.
27. Naylor, E. W., Orfanos, A. P. y Guthrie, R. A simple screening test for arginase deficiency (hyperargininemia). *J Lab Clin Med* 89:876-880, 1977.

## Hereditary red blood cell enzyme disorders. II. Screening methods and procedures (Summary)

Screening methods and procedures in a program for detecting red blood cell enzyme diseases are examined. The common denominator in 14 of the more than 20 different hereditary disorders of this type that have been described is hemolytic anemia, which makes it impossible to distinguish one disorder from another without conducting specific enzyme studies that are generally laborious and require the use of resources that are not available in every laboratory. New fluorescence enzyme screening procedures for detecting hereditary red blood cell diseases are presented. Since such procedures are based on the interdependence of the metabolic pathways, the integrity of multiple enzyme reactions may be established with a minimum number of tests. These procedures, used together with other reported screening procedures, provide the means for detecting

hemolysis-related red blood cell enzyme disorders characterized by deficiency of adenylate kinase, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose phosphate isomerase, phosphofructokinase, aldolase, triosephosphate isomerase, phosphoglycerate kinase or pyruvate kinase. Because of its versatility, simplicity and economy, this methodology can be applied in laboratories with limited resources making it possible to screen 11 red blood cell enzyme diseases. Each screening method and procedure is described in depth, the results obtained with this methodology in the program for detecting hereditary red blood cell enzyme disorders are reported, and the different stages included in the detection and identification of hereditary red blood cell enzyme diseases are discussed briefly.

## As eritroenzimopatias hereditárias. II. Métodos e procedimentos de crivagem (Resumo)

Reexaminam-se os métodos e procedimentos de crivagem em relação com um programa para a detecção das eritroenzimopatias. Mais de 20 diferentes eritroenzimopatias têm sido descritas. Em 14 delas o denominador comum é a presença de anemia hemolítica; por essa razão não é possível distinguir um defeito do outro sem fazer estudos enzimáticos específicos, geralmente trabalhosos e que exigem recursos que nem sempre estão disponíveis em todos os laboratórios. Apresentam-se novos procedimentos enzimáticos de crivagem por fluorescência para

a detecção de eritroenzimopatias hereditárias. Esses procedimentos baseiam-se na interdependência das vias metabólicas de tal maneira que, com um número mínimo de ensaios possa-se provar a integridade de múltiplas reações enzimáticas. Esses procedimentos usados em combinação com outros métodos de crivagem notificados, fazem possível a detecção das seguintes eritroenzimopatias associadas com hemólise: deficiências de adenilato cinase, hexocinase, glucose-6-fosfato desidrogenase, glucose fosfato isomerase, fosfofrutocinase,

aldolase, triose fosfato isomerase, fosfoglicerato cinase e pirovato cinase. São tais as características dessa metodologia que pela sua versatilidade, simplicidade e economia podem ser aplicadas em laboratórios com recursos mínimos e possibilitarão a crivagem de 11 eritroenzimopatias. Descrevem-se pormenorizadamente cada um dos métodos e

procedimentos de crivagem; mencionam-se os resultados obtidos com essa metodologia no programa para a detecção de eritroenzimopatias hereditárias e discutem-se brevemente, em último lugar, os diferentes estágios que abrange a detecção e caracterização das eritroenzimopatias hereditárias.

## **Érythroenzymopathies héréditaires. II. Méthodes et procédés de tamisage (Résumé)**

Les méthodes et procédés de tamisage utilisés dans le cadre d'un programme de détection d'érythroenzymopathies font l'objet d'une révision. Plus de 20 érythroenzymopathies héréditaires ont été décrites et du fait que l'anémie hémolythique est le dénominateur commun de 14 d'entre elles il est impossible de distinguer un défaut métabolique d'un autre sans avoir recours à des études enzymatiques spécifiques, généralement laborieuses et qui requièrent un équipement dont ne disposent pas tous les laboratoires. De nouveaux procédés sont exposés pour le tamisage par fluorescence dans la détection d'érythroenzymopathies héréditaires. Basés sur l'interdépendance des voies métaboliques, ces procédés permettent de tester l'intégrité de multiples réactions enzymatiques au moyen d'un nombre restreint de preuves de laboratoire. L'emploi de ces méthodes en combinaison avec d'autres techniques de

dépistage permet d'identifier les déficiences en adénylate kinase, hexokinase, glucose-6-phosphate deshydrogénase, glucose-phosphate isomérase, phosphofructo-kinase, aldolase, triose-phosphate isomérase, phosphoglycérate kinase et pyruvate kinase, qui constituent autant de facteurs d'érythroenzymopathies associées à un phénomène d'hémolyse. La simplicité, la versatilité et le moindre coût de ces techniques permettront à des laboratoires ne disposant que de modestes ressources d'identifier 11 de ces érythroenzymopathies. Méthodes et procédés sont minutieusement décrits. Les résultats obtenus grâce à cette méthodologie dans le cadre du programme pour la détection d'érythroenzymopathies sont mentionnés et les différentes étapes que comportent la détection et l'identification des érythroenzymopathies héréditaires font l'objet d'une brève discussion.