

1990-2

82345884

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



“DISEÑO, ESTANDARIZACION Y EVALUACION DE UN METODO
FLUOROMETRICO PARA GLUCOSA-6-FOSFATO
DESHIDROGENASA”.

SILVIA JOSEFINA LOPEZ PEREZ

ESTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA I DE LA DIVISION DE GENETICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE DEL I.M.S.S., BAJO LA DIRECCION DE LA M.C. LOURDES RAMIREZ DUEÑAS Y CON LA ABESORIA DE LA M.C. CLAUDIA MEDINA LOZANO.

DISEÑO, ESTANDARIZACION Y EVALUACION DE UN METODO FLUOROMETRICO
PARA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

SILVIA JOSEFINA LOPEZ PEREZ.

A G R A D E C I M I E T O S :

A MI MADRE :

De quien he tomado ejemplo de amor, fortaleza, dedicación y sacrificio, y a quien debo y dedico mi vida y mi hacer.

A MI PADRE:

Quien me ha enseñado que la perseverancia y el trabajo nunca han hecho ningún derrotado. ¡La meta esta cumplida!

A MI ESPOSO:

Porque fué de tu voz que yo supe
compañero de la libertad
porque juntos hacemos la historia
de una vida con más claridad....
A tí dedico mis mayores esfuerzos por superarme y
poder alcanzar tu calidad humana. Te amo.

A MIS HERMANOS:

Siempre presentes en mis pensamientos y en mi
realidad.

A JORGE Y ANA VICTORIA:

La nueva oportunidad que nos dá la vida.
Aprovechémosla.

A M.C. CLAUDINA MEDINA LOZANO:

Por su hermosa labor en la formación de los estudiantes que tenemos la suerte de cruzarnos en su camino, de quien he aprendido lo hermoso de trabajar arduamente para alcanzar un lugar en el mundo.
¡Gracias Clau!

A M.C. LOURDES RAMIREZ DUEÑAS:

Profesora y amiga que tiene siempre una palabra de aliento y un buen consejo para sus alumnos, a quien agradezco profundamente su confianza y su guía.

A M.C. GERARDO VACA:

Por su amabilidad y dedicación en la enseñanza de sus pupilos.

A MI ALMA MATER Y A LA FACULTAD DE CIENCIAS.

A LAS AUTORIDADES DEL ZOOLOGICO DE GUADALAJARA:

Por las facilidades prestadas para la elaboración de este trabajo.

I N D I C E .

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	6
JUSTIFICACION.....	9
OBJETIVOS.....	10
HIPOTESIS.....	11
MATERIAL Y METODO.....	12
RESULTADOS.....	20
DISCUSION.....	26
CONCLUSIONES.....	27
BIBLIOGRAFIA.....	28

I N T R O D U C C I O N :

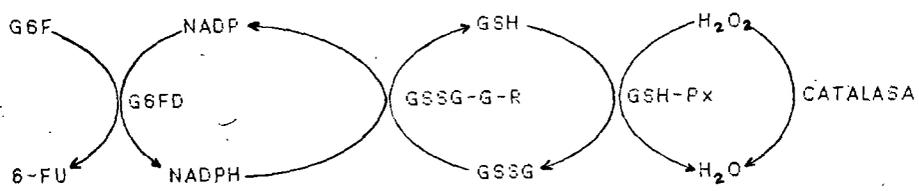
El estudio de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FD: E.C. 1.1.1.49) se inició en 1931, cuando Warburg y Cristian la identificaron en la levadura de cerveza y en el eritrocito humano, posteriormente se le ha encontrado en todos los organismos con este fin estudiados (1).

La amplia distribución de la G6FD en el reino vegetal y animal se debe a su relevante participación en el metabolismo intracelular. Algunas de sus funciones más importantes conocidas en el humano son (Fig. 1).

- 1.- Regular y catalizar la primera reacción de la vía oxidativa de la hexosa monofosfato (vía de las pentosas), donde se producen, entre otras cosas, los azúcares pentosas necesarios para la síntesis de Acidos Nucleicos (1,2).
- 2.- Producir NADPH, una de las principales coenzimas donadoras de hidrogenenos en numerosas reacciones enzimáticas:
 - a) En algunos pasos esenciales de diferentes vías biosintéticas (2).
 - b) En la reacción catalizada por la glutatión reductasa para la regeneración de glutatión reducido, el cual es indispensable para:
 - Mantener en estado activo reducido los grupos sulfhidrilo de la hemoglobina y de ciertas enzimas y proteínas de la membrana celular.
 - La detoxicación de bajos niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (3).

Además, el NADPH forma parte de la estructura de la catalasa (4 moléculas de NADPH por mol de enzima dimérica), enzima que cataliza la vía alterna para la detoxicación de peróxido de hidrógeno (2).

Por lo anteriormente mencionado, queda evidente que la G6FD es esencial para los mecanismos celulares que contrarrestan el daño oxidativo, de manera especial en el eritrocito humano maduro, ya que es extremadamente sensible a un ataque oxidativo por carecer de otras enzimas generadoras de NADPH.



vía de las pentosas

coenzima de

- β-CACPR, EACPR → Acidos grasos
- DHFR → Purinas y Pirimidinas
- HMGCoAR → Colesterol
- Diferentes enzimas → Esteroides

FIG. 1 Principales funciones metabólicas de la G6FD. De los productos, el 6-fosfogluconato (6-FG) continúa por la vía de las pentosas, y el NADPH es indispensable tanto para la regeneración de glutación reducido (GSH), la detoxificación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y para una variedad de reacciones biosintéticas.

Abreviaciones:

- G6F = Glucosa-6-fosfato
- GSSGR = Glutación reductasa
- GSH-Px = Glutación peroxidasa
- DHFR = Dihidrofolato reductasa
- CACPR = β-cetoacil-ACP-reductasa
- EACPR = enoil-ACP-reductasa
- HMGCoAR = β-hidroxi-β-metilglutaril CoA reductasa

ESTRUCTURA DE LA G6FD.

La forma activa de la G6FD puede ser dimérica o tetramérica, ambas constituidas por subunidades idénticas; la existencia de una u otra es dependiente del pH, alcanzando proporciones iguales a pH neutro. Existen dos moléculas de NADPH unidas fuertemente a cada molécula dimérica, sin embargo, se desconoce la relación entre NADPH estructural y NADPH sustrato (2).

La estructura primaria está constituida por 515 aminoácidos y un peso molecular de 59,265 daltones. Varios autores han dado a conocer la secuencia específica de aminoácidos en la proteína primaria y de nucleótidos en el ADN complementario de G6FD, proveniente de diferentes tipos de células humanas como de diversos organismos. De las distintas secuencias consensus conocidas, existen algunas diferencias, principalmente hacia el extremo 5', pero también existen secuencias altamente conservadas entre diferentes especies, en particular la que involucra los aminoácidos 199 al 209, sitio de unión para el fosfato de piridoxal, componente esencial para la actividad enzimática que se encuentra probablemente cerca del sitio de unión para la glucosa-6-fosfato (2,4,5).

G E N E T I C A :

En mamíferos, el gen estructural de la G6FD (Gd) se localiza en el cromosoma X, y el humano se encuentra en la región telométrica del brazo largo (banda Xq28). El gen Gd está estrechamente cercano a otros segmentos de considerable interés médico, como son: los genes de la hemofilia A (factor VIIIc), adrenoleucodistrofia, ceguera al color (deutrano, propano y monocromatismo azul) y distrofia muscular tipo Emery-Dreifuss, entre otros (6).

La G6FD es la enzima más susceptible a mutaciones; en el humano es la proteína con más variantes conocidas (más de 370) y ejemplo de múltiples mutaciones en una sola cadena polipeptídica codificada por un solo gen (5).

El análisis bioquímico-genético de los organismos mutantes de G6FD con actividad disminuida o ausente, han permitido comprobar su papel esencial en la bioquímica celular. En algunos organismos la deficiencia total de G6FD no es absolutamente letal, pero da lugar a una variedad de anomalías metabólicas (1, 7, 8); en cambio, en los mamíferos la ausencia total puede ser letal (1,9).

De las diversas mutantes en el humano, algunas de ellas dan lugar a variantes deficientes en actividad, que alteran particularmente la función del eritrocito, y cuya manifestación clínica principal es la anemia hemolítica en diversos grados, la cual es desencadenada generalmente por factores exógenos (exposición a drogas u otros agentes oxidantes, incluyendo antimaláricos); otras variantes son detectadas únicamente por electroforesis, debido a que no son mutantes deficientes o por no tener efectos clínicos significativos (10).

La deficiencia en la actividad de G6Fd es el error congénito del metabolismo más frecuente en el humano, se ha estimado que existen alrededor de 400 millones de individuos afectados en el mundo; en algunas zonas (Africa Tropical, Medio Oriente, Asia Tropical y Subtropical, Mediterráneo y Nueva Guinea) el rango en la frecuencia de variantes deficientes llega a ser del 5 al 25% (2), de tal manera que en algunos países existen programas permanentes para la detección de individuos deficientes de G6FD.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que muchos de los trabajos realizados sobre genética de poblaciones de la G6FD han consistido generalmente en a detección de variantes deficientes a través de diferentes métodos cualitativos de tamizaje; pocos son los estudios que han incluido ensayos cuantitativos y electroforéticos a la vez; por ésta razón los estudios para describir la distribución de las variantes de G6FD están limitadas hacia aquellas involucradas con deficiencia enzimática mas o menos pronunciada, debido a que la metodología cualitativa es eficaz para identificar unicamente a los varones hemocigotos o a las mujeres homocigotas para la deficiencia. Posteriormente, las variantes deficientes detectadas cualitativamente requieren de una segunda etapa para estudios cuantitativos y electroforéticos confirmatorios (11).

Por último, es importante mencionar varios puntos de interés acerca de la G6FD:

- 1.- El grupo científico de la OMS enfatiza la necesidad de contar con modelos animales deficientes de G6FD, que permitirían avanzar en el estudio experimental de este desorden hereditario (11), en los campos de :
 - a) Mecanismos bioquímicos-fisiológicos involucrados en los procesos hemolíticos.
 - b).- Búsqueda de nuevos agentes desencadenantes de crisis hemolíticas.
 - c).- Análisis de otros tejidos que aparentemente no muestran anomalías metabólicas bajo el efecto de deficiencia de G6FD.
- 2.- La G6FD como marcador del cromosoma X se utiliza como referencia para realizar estudios con diferentes objetivos:
 - a).- En la identificación del cromosoma X en diversas especies (12).
 - b).- En la localización y determinación de la posición y orden de otros genes tanto en el humano (13,14,15,16) como en diversas especies (17,18,19,20,21).

- c).- En el estudio de los mecanismos de inactivación del cromosoma X, y análisis de los efectos de este mecanismo (22, 23, 24, 25, 26).
- 3.- El uso potencial de la G6PD como marcador clonal en los individuos heterocigotos, para el estudio y comprobación del origen monoclonal de una variedad de procesos neoplásicos (2).

ANTECEDENTES :

El fundamento químico de todos los métodos que se utilizan para la evaluación de la actividad de G6PD, se basan en la medición cualitativa o cuantitativa del NADPH generado en la reacción enzimática.

Los métodos cuantitativos miden espectrofotométricamente y en forma directa y precisa la cantidad de NADPH presente en el sistema de reacción. La ejecución de ésta metodología es de accesibilidad limitada general, ya que requiere de un espectrofotómetro de rango ultravioleta (340 nm) y otros equipos sofisticados que solo se encuentran en los laboratorios de grandes centros hospitalarios; además utiliza relativamente de grandes volúmenes de sistema de reacción (1-2 ml), que significa mayor gasto de reactivos, y por lo menos de 1 ml de sangre, la cual debe ser mantenida a 4°C hasta el ensayo enzimático. Por lo anteriormente mencionado, los métodos cuantitativos se realizan junto con estudios electroforéticos como pruebas confirmatorias.

Los diversos métodos cualitativos usados para el estudio masivo de la población, tienen como características generales ser simples, accesibles y de bajo costo, con la desventaja de que únicamente identifican a los homocigotos o hemocigotos deficientes de G6PD. En general, los métodos cualitativos de tamizaje son bastante eficaces para identificar aquellas variantes con una deficiencia mas o menos pronunciada, de lo contrario y bajo ciertas condiciones clínicas del individuo deficiente (por ejemplo, reticulocitosis) pueden dar resultados dudosos o falsos negativos para la deficiencia.

En la tabla 1 se mencionan los métodos cuantitativos y cualitativos mas comunes, así como algunas de sus características principales (2, 27).

El diagnóstico de deficiencia de G6PD es relativamente fácil sin embargo es importante mencionar las siguientes consideraciones (2):

- 1.- Debido a la amplia distribución geográfica de éste defecto y a su alta prevalencia en ciertas regiones, es importante contar con métodos simples y económicos para su evaluación.
- 2.- Es de mayor importancia estimar la actividad catalítica de la G6PD que la cantidad de proteínas G6PD.
- 3.- El nivel de actividad enzimática es más alto en eritrocitos jóvenes que en los viejos; dada ésta circunstancia, una reticulocitosis puede encubrir una deficiencia y dar resultados falsos normales. Una manera de resolver este problema es centrifugando la muestra y medir separadamente la actividad enzimática en los eritrocitos

tos procedentes de la parte inferior (células viejas) y de la superior (células jóvenes) de la columna de células; también es recomendable medir la actividad de la muestra total (no fraccionada) de eritrocitos.

- 4.- Las mujeres heterocigotas presentan, como resultado de la inactivación al azar del cromosoma X, un mosaicismo celular, teniendo una mezcla de eritrocitos normales y deficientes (de origen materno y paterno respectivamente) la proporción entre los dos tipos de células puede variar enormemente, desde una actividad normal hasta una completa deficiencia. Un lisado de células puede no revelar heterocigosidad si la proporción de células deficientes es menor. Se recomienda realizar estudios citogenéticos para comprobar los estados heterocigotos para la deficiencia.

TABLA 1.

Métodos cuantitativos y cualitativos más comunmente usados en el diagnóstico de deficiencia de G6FD (Luzzato, 1989).

MÉTODOS	CARACTERÍSTICAS
CUANTITATIVOS	
O.M.S.	Método estándar recomendado por la OMS. Directo y definitivo. Requiere de espectrofotómetro. A 37°C mide las actividades de G6FD y cierta proporción de 6-FG deshidrogenasa.
Clock & McLean	Directo y definitivo. Requiere de espectrofotómetro. Mide las actividades de G6FD y 6FGD separadamente.
CUALITATIVOS	
Fluorescencia	Mismo principio que el ensayo definitivo. Requiere de lámpara manual de Luz Ultravioleta (UV). Es sencillo y de bajo costo. La muestra puede ser almacenada por varios días.
Cianuro-Ascorbato	Sencillo y de bajo costo. Requiere de sangre fresca.
Decoloración	Sencillo y de bajo costo. Requiere de tiempos prolongados de incubación y sangre fresca.
Reducción de Metahemoglobina	Sencillo y de bajo costo. Requiere de tiempos prolongados de incubación y sangre fresca. Se han reportado falsas positivas.
Reducción de MTT	Realizado como citoquímico, útil para detección de heterocigotas. Requiere de tiempos prolongados de incubación.

J U S T I F I C A C I O N :

La deficiencia en la actividad de G6PD es el error congénito del metabolismo mas frecuente en el humano, de tal manera que en algunos países existen programas permanentes para la detección de variantes deficientes. La metodología cualitativa que se utiliza para tamizar la población general identifica los hemocigotos deficientes unicamente, requiriendose una segunda etapa para estudios cuantitativos y electroforéticos confirmatorios.

Por otra parte, el grupo científico de la OMS hace patente la necesidad de contar con modelos animales deficientes de G6PD, que permitirían avanzar en el estudio de los diferentes puntos de interés acerca de ésta enzima, entre otros, los mecanismos bioquímico-fisiológicos involucrados en los procesos hemolíticos, la búsqueda de nuevos agentes desencadenantes de hemólisis y su importante utilidad como marcador del cromosoma X. Además, como una consecuencia de la búsqueda del modelo animal se aumentará el conocimiento de la G6PD en diferentes especies animales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS :

La función de los diversos métodos de tamizaje conocidos, es indicar cualitativamente la presencia o ausencia de actividad de G6PD; las características generales de éstos métodos son: sencillez, accesibilidad, bajo costo y en algunos de requerir de pequeños volúmenes de muestra.

Los métodos cuantitativos son los ensayos confirmatorios e indican en forma precisa la actividad enzimática de G6PD; sus características generales son: requerir de equipo sofisticado, mayores volúmenes de reactivos y de muestra, además, para su realización es necesario invertir un mayor número de horas de trabajo, por lo consiguiente sus costos son más elevados.

Considerando lo antes mencionado, el OBJETIVO PRINCIPAL de este trabajo es :

Diseñar, estandarizar y evaluar un nuevo método cuantitativo que ofrezca las ventajas principales de los métodos cuantitativos y cualitativos conocidos.

Como SEGUNDO OBJETIVO, se comprobará la utilidad del nuevo método cuantitativo, determinando la actividad específica de G6PD en eritrocitos de diversas especies animales, además del fenotipo electroforético.

H I P O T E S I S :

Es posible diseñar y estandarizar un nuevo método cuantitativo que ofrezca las ventajas de los métodos cualitativos (sencillez, requerir de pequeños volúmenes de sistema de reacción y de muestra y bajo costo), y cuyos resultados expresados como actividad específica, correlacionen adecuadamente con el método cuantitativo estandar de la OMS.

M A T E R I A L Y M E T O D O :

MATERIAL :

1.- Equipos:

Espectrofotómetro Zeiss, modelo PMQ-3
Fluorómetro Turner, modelo 110
Baño MARIA 37°C
Microcentrifuga
Cámara de electroforesis Beckman-microzone
Estufa de incubación A 37°C

2.- Reactivos:

Membranas de acetato de celulosa Beckman-microzone
Buffer TRIS-HCL 1M, EDTA 5mM, pH 8.0
Buffer TRIS-HCL 0.1 M, pH 8.0
Buffer de corrimiento (TRIS-EDTA-AC. BÓRICO)
Buffer de saturación (Buffer de corrimiento + NADPH)
Buffer Fosfato de Potasio 0.01M, pH 7.4
Glucosa-6-fosfato 6mM
NADP 6mM
MgCl 100 mM
MTT
PMS (Fenazina Metiosulfato)
Saponins 1%
NaCl 0.15M
Agua destilada

3.- Universo de trabajo:

- a).- El diseño, estandarización y evaluación del nuevo método cuantitativo se realizó, en primera instancia, en 10 muestras de sangre de humano con un fenotipo electroferético de G6FD correspondiente a la variante B (normal), elegidos al azar de una población normal, ya que los eritrocitos humanos son más accesibles, y debido al hecho de que existe mayor información de G6FD en el humano, esto permitirá una adecuada interpretación de resultados.
- b).- Como segunda etapa, se ensayó el nuevo método en muestras obtenidas de diferentes especies animales, algunas de las cuales solo fué posible muestrear un solo individuo, debido al grado de dificultar en la obtención de la muestra por dificultad intrínseca del sujeto, o por escasez de los mismos. Este muestreo se llevó a cabo en el Zoológico de Guadalajara y en el Bioterio de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente, del Centro Médico de Occidente, IMSS.

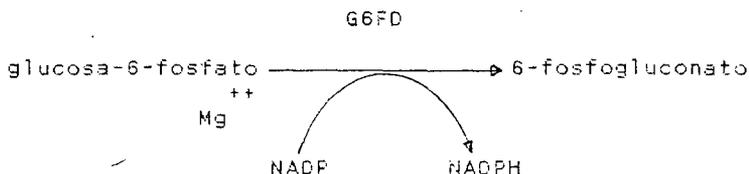
Se analizaron un total de 108 muestras de sangre correspondientes a las especies que se enlistan en la Tabla 2.

METODO :

Bajo la experiencia de nuestro grupo de trabajo en el manejo de diseño de métodos cuantitativos fluorométricos (28, 29), y considerando las ventajas que ofrecen estos métodos (gran sensibilidad y sencillez), el nuevo método cuantitativo para G6FD se basó en el principio general de los métodos fluorométricos.

PRINCIPIO DEL METODO:

La actividad de G6FD se estima cuantitativamente midiendo el NADPH que se genera en la reacción enzimática.



Los nucleótidos de piridina reducidos (NADP y NADPH) tienen la propiedad de fluorecer intensamente cuando se activan con luz ultravioleta de onda larga (30).

Después de que la mezcla de reacción se ha incubado con la muestra de sangre, la reacción se para por dilución y el NADPH formado se mide fluorométricamente. Usando la misma muestra diluida, se estima la concentración de hemoglobina, midiendo absorbancia a 410nm (28).

TABLA 2.

PROCEDENCIA: ZOOLOGICO DE GUADALAJARA

E S P E C I E	INDIVIDUOS MUESTREADOS.
Mono Diana	<u>Cercopithecus diana</u> 2
Mono Araña	<u>Atales geoffroyi</u> 4
Mono Verde	<u>Cercopithecus pygerythrus</u> 2
Bisonte	<u>Bisón bison</u> 1
Llama	<u>Lama glama glama</u> 5
Antilope Lichi	<u>Kobus leche</u> 1
Antilope Nilgo	<u>Boselaphus tragocamelus</u> 1
Venado Cola Blanca	<u>Odocoileus virginianus</u> 2
Venado Tamazate	<u>Cervus elaphus</u> 1
Borrego	<u>Ovis canadensis</u> 3
Tigre de Bengala	<u>Panthera tigris tigris</u> 1
Zorro Gris	<u>Urocyon cinereoargenteus</u> 2
Pavo Ocelado	<u>Agriocharis ocellata</u> 4
Faisán Dorado	<u>Chrysolophus pictus</u> 3
Pato de Pekín	<u>Anas acuta</u> 5
Ganso	<u>Anser anser</u> 5
Halcón Harris	<u>Parabuteo unicinctus</u> 2
Halcón Cola Roja	<u>Buteo jamaicensis</u> 1
Gallina de Guinea	<u>Rhynchotus us</u> 4
Martinete	<u>Nyctocorax nicticorax</u> 1
Codorniz	<u>Conturnix conturnix</u> 10
Paloma	<u>Columba leucocephala</u> 7
Loro	<u>Amazona ochrocephala</u> 2

E S P E C I E		INDIVIDUOS MUESTREADOS.
PROCEDENCIA: BIOTERIO U.I.B.O.		
Perro	<u>Canis sp</u>	4
Hamster	<u>Crisetus crisetus</u>	3
Rata Común	<u>Rattus rattus</u>	2
Rata Spray Dowley		5
Rata Wistar		5
Ratón 2/NU		5
Ratón C57/BL-6		4
Ratón DB-A2		5
Ratón BAB/C		5

COMPOSICION DE LA MEZCLA DE REACCION :

Se basa, con algunas modificaciones, en el sistema de reacción usado en el método espectrofotométrico de la CMS (27).

Composición de 1.0 ml de mezcla de reacción:

	<u>Volumen μl</u>
TRIS-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8.0	100
Glucosa-6-fosfato 6mM.....	100
NADP ⁺ 6 mM.....	100
MgCl ₂ 100 mM.....	100
Zaponina 1%.....	200
Agua Destilada.....	400

PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra de sangre contenida en tubos capilares heparinizados es centrifugada por 5 minutos en una centrifuga para hematocrito. Después de eliminar el suero y la porción de leucocitos, se hace una suspensión 1:10 en NaCl 0.15 M con el paquete total de eritrocitos.

PROCEDIMIENTO :

Se agregan 10 μ l de suspensión de eritrocitos 1:10 a 100 μ l de mezcla de reacción, se toma inmediatamente 20 μ l de sistema de reacción y se diluyen en 4.0 ml de Buffer fosfatos 0.01 M, pH 7.4 (Problema a tiempo 0 = P₀); después el sistema de reacción restante se incuba a 37°C por 5 minutos, e inmediatamente se toman de nuevo 20 μ l y se diluyen en 4.0 ml de Buffer fosfatos (Problema a tiempo 5 = P₅). Se realiza un blanco de sistema de reacción, sustituyendo el volumen de suspensión de eritrocitos por 10 μ l de solución de NaCl 0.15 M; tomar 20 μ l de este sistema y diluirlos en 4.0 ml de Buffer de fosfatos (Blanco de sistema de reacción = B).

A los sistemas de reacción diluidos P₀ y P₅ se les mide primero por ciento de fluorescencia en el Fluorómetro Turner (modelo 110), usando los filtros 110-811 y 110-817 como filtro primario y secundario respectivamente. Medir absorbancia a 410 nm del sistema diluido P₅ contra B.

CALCULOS :

La actividad específica de G6FD (E), expresada como micromoles de producto formado por gramo de hemoglobina por minuto a 37°C (UI/gr Hb) se calcula aplicando la siguiente fórmula :

$$E = \frac{F C}{A}$$

donde:

F= fluorescencia neta del problema por minuto
($P_5 - P_0 / 5$)

C= factor de calibración

A= Absorvancia neta del problema ($P_5 - B$)

FACTOR DE CALIBRACION :

El factor de calibración debe ser determinado por cada laboratorio con el fluorómetro y colorímetro que se utilizarán para la ejecución del método.

- 1.- Se realiza una curva de calibración con una serie de diluciones de NADH de concentraciones conocidas: a partir de una solución con 1 mg/ml aproximadamente se prepara diluciones en Buffer fosfato con un rango de 0 a 1.5 μ M, las lecturas de fluorescencia se hacen contra un blanco de Buffer. Se determina sobre la curva (% de fluorescencia vs μ M) el % de fluorescencia correspondiente a 1 μ M de NADH, designándose a este valor como F_1 .
- 2.- Una segunda curva de calibración debe realizarse para hemoglobina: se preparan diluciones con un rango de 0 a 1:400 en Buffer fosfato, a partir de un hemolisado 1:10 en asponina al 0.133%. Se determina sobre la curva (g Hb/lit vs absorvancia) la absorvancia correspondiente a 0.1 g Hb/lit, este valor corresponderá a la constante A_1 .

El factor de calibración (C) se calcula de la siguiente manera:

$$C = \frac{10 \times A_1}{F_1}$$

METODO ELECTROFORETICO :

El estudio electroforetico de la G6PD eritrocitaria de las diversas especies animales analizadas se realizó bajo el método descrito por Sparkes (31). Considerando la distancia recorrida (Rf) por la variante humana "B" como el 100%, se calcularon los porcentajes de migración para los fenotipos electroforéticos que mostraron las especies animales estudiadas.

RESULTADOS :

I.- En la evaluación del método cuantitativo se analizaron las siguientes condiciones :

1.- Efecto del tiempo de incubación sobre la velocidad de la reacción.

El sistema de reacción, bajo las condiciones descritas en la sección de Material y Método, se incubó a 37°C por 10 minutos, cada dos minutos se tomaron alícuotas de 20 µl diluyéndolas en 4.0 ml de Buffer fosfatos. La actividad específica se calculó para punto de incubación. Los resultados se muestran en la figura 2, en donde se observa la manera evidente que la actividad de la enzima es lineal por lo menos en 10 minutos de incubación a 37°C.

2.- Efecto de la actividad de la enzima sobre la velocidad de la reacción.

Tres sistemas de reacción fueron preparados de acuerdo a la sección de Material y Método usando tres diferentes diluciones de suspensión de eritrocitos (1:5, 1:10 y 1:20, correspondiendo a un rango aproximado de concentración de hemoglobina de 2.5 a 10 g/dl), la reacción se paro por dilución a los 4 y 6 minutos de incubación a 37°C. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 3, observándose claramente que la actividad enzimática es proporcional a la concentración de hemoglobina hasta concentraciones de 8 g/dl en la suspensión de eritrocitos, y por lo menos 6 minutos de incubación.

3.- Cuando la glucosa-6-fosfato se omite de la mezcla de reacción, substituyéndose por un volumen igual de agua destilada, el sistema de reacción diluido presenta una ligera fluorescencia, que no se incrementa aún después de 10 minutos de incubación del sistema de reacción.

Los resultados de los ensayos anteriores nos permiten confirmar que las condiciones elegidas para la realización del método cuantitativo fluorométrico (suspensión de eritrocitos 1:10, que corresponden a una concentración aproximada de 2.5g de hemoglobina/dl, y un tiempo de incubación de 5 minutos), están dentro del rango de linealidad de la actividad enzimática contra tiempo y concentración de hemoglobina en el sistema de reacción.

- II.- La actividad específica de G6FD eritrocitaria obtenida por los métodos espectrofotométricos (CMS) y fluorométricos en las 10 muestras de individuos normales (fenotipo electroforético "b"), fueron resultado de ensayos por duplicado; en la tabla 3 se muestran los valores individuales; el valor promedio y desviación estándar ($\bar{X} \pm \sigma$) fueron de 11.6 ± 2.04 y de 9.7 ± 1.77 , con un rango de 9.09 a 15.2 y de 8.1 a 13.5 para los métodos espectrofotométricos y fluorométrico respectivamente. La correlación entre ambos métodos dió una $r = 0.90$ con un $p = 0.001$.
- III.- En la determinación fluorométrica de la actividad específica de la G6FD eritrocitaria en las 108 muestras analizadas, cada ensayo se realizó por duplicado. La tabla 4 muestra los valores promedio y desviación estándar correspondiente a las 32 especies animales; en algunas de ellas solo fué posible muestrear a un individuo, debido a su difícil manejo o a su inaccesibilidad. Considerando la actividad de G6FD en el humano como referencia, las actividades que mostraron el borrego (Cvis canadensis) el faisán (Chrysolophus pictus) y el loro (Amazona ochrocephala) (0.74, 0.45 y 1.70 UI-g Hb/min respectivamente) corresponderían a actividades deficientes de G6FD en el humano.
- IV.- La tabla 5 presenta el fenotipo electroforético de las diferentes especies estudiadas; el porcentaje de migración referido para cada especie se calculó considerando como el 100% a la distancia recorrida por la variante "E" humana, que se incluía como control en cada corrimiento electroforético. La mayoría de los fenotipos muestran una sola banda y una migración más catódica que la hemoglobina, de la misma manera que la variante humana; algunos presentan una banda con migración menos catódica que la hemoglobina, y otras muestran más de una banda con actividad de G6FD, más o menos catódica.

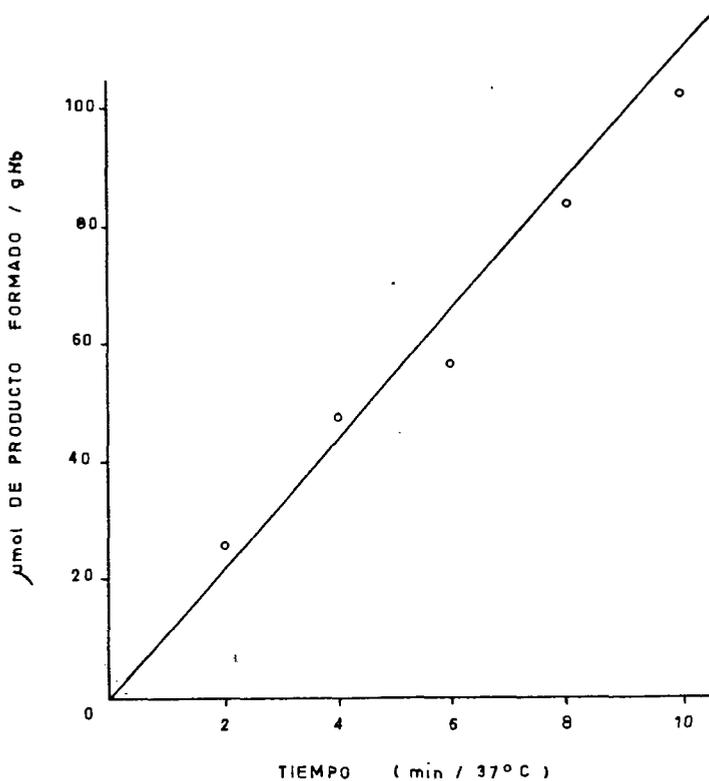


FIG. 2 EFECTO DE TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA VELOCIDAD DE LA REACCION. EL SISTEMA DE REACCION FUE PREPARADO COMO SE DESCRIBE EN LA SECCION DE MATERIAL Y METODO, USANDO HEMOLIZANDO 1 10 E INCUBADO POR 10 minutos, TOMANDO ALICUOTAS CADA 2 min LOS μ mol DE PRODUCTO EORMADO POR g Hb SE CALCULARON CON LA FORMULA MENCIONADA CADA PUNTO RERESENTA EL VALOR MEDIO DE UN ENSAYO POR DUPLICADO.

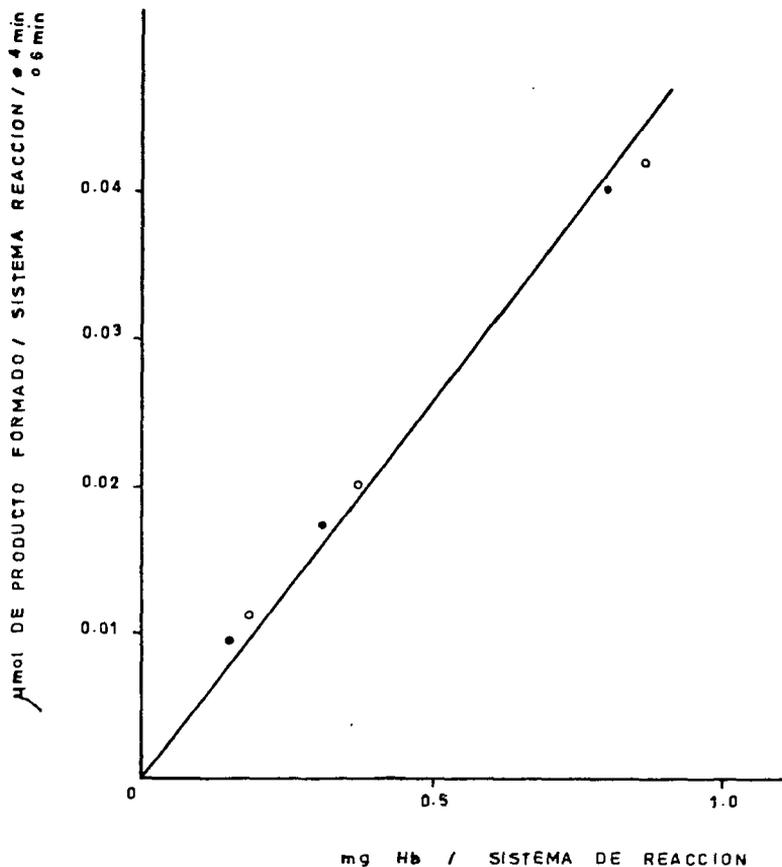


FIG 3 EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOBRE LA VELOCIDAD DE LA REACCION EL SISTEMA DE REACCION FUE PREPARADO COMO SE DESCRIBE EN LA SECCION DE MATERIAL Y METODO, USANDO DIFERENTES DILUCIONES DE HEMOLIZADO E INCUBANDO A 4 (●) Y 6 (○) MIN A 37°C. LA CONCENTRACION DE μmol DE PRODUCTO FORMADO Y DE Hb SE CALCULARON SOBRE LAS CURVAS DE CALIBRACION DE NADH Y Hb RESPECTIVAMENTE CADA PUNTO REPRESENTA EL VALOR MEDIO DE UN ENSAYO POR DUPLICADO.

TABLA 3.

CORRELACION ENTRE LOS METODOS FLUOROMETRICO (M.F.) Y ESPECTROFOTOMETRICO (M.E.)

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	\bar{X}	σ	r	P
M.E.*	10	9.09	14.5	11.3	10.4	11.0	12.5	11.6	13.9	15.2	11.6	2.04	0.90	<0.001
M.F.*	9.2	10.2	12.1	8.8	8.5	8.1	9.1	8.1	9.3	13.5	9.7	1.77		

* ACTIVIDAD ESPECIFICA COMO: $\mu\text{mol} / \text{gHb} / \text{min.}$

TABLA 4.

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE G6PD ERITOCITARIA EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES :

ESPECIE	n	ACTIVIDAD ESPECIFICA	
		(μ ml/g Hb/min) X	σ
Humano	10	9.70	1.77
Mono Diana	2	3.60	1.49
Mono Araña	4	15.26	1.28
Mono Verde	2	3.90	1.27
Bisonte	1	5.21	----
Llama	5	6.10	1.29
Antilope Lichi	1	22.73	----
Antilope Nilgo	1	7.11	----
Venado Cola Blanca	2	14.45	1.02
Venado Temazate	1	5.25	----
Borrrego	3	9.74	1.01
Tigre de Bengala	1	9.44	----
Zorro Gris	2	17.55	1.20
Pavo Ocelado	4	5.46	0.82
Faisán Dorado	3	0.45	0.01
Pato de Pekín	5	4.33	1.01
Ganso	5	4.40	0.93
Halcón Harris	2	6.20	1.20
Halcón Cola roja	1	7.05	----
Gallina de Guinea	4	7.28	2.11
Martinete	1	2.97	----
Codorniz	10	4.46	1.24
Paloma	7	15.23	1.72

ESPECIE	n	ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{ml/g Hb/min}$)	
		\bar{X}	σ
Loro	2	1.70	0.41
Perro	4	4.91	1.46
Hamster	3	10.05	0.70
Rata Común	2	15.82	3.20
Rata Spray Dowley	5	15.82	3.20
Rata Wistar	5	12.31	1.81
Ratón 2/NU	5	11.05	1.24
Ratón C57/BL-6	4	11.37	0.95
Ratón DB/A2	5	16.14	2.72
Ratón BAB/C	5	12.44	1.29

TABLA 5.

FENOTIPO ELECTROFORETICO DE G6PD ERITROCITARIA EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES :

ESPECIE	% MIGRACION	FENOTIPO ELECTROFORETICO ORIGEN	CATODO
Humano	100		
Mono Diana	74		
Mono Araña	116.8		
Mono Verde	74		
Bisonte	80		
Llama	97		
Antílope Lichi	60, 96.8		
Borrrego	86		
Tigre de Bengala	84		
Ferret	79.4		
Zorro Gris	100		
Pavo Ocellado	67.6		
Pato de Pekin	78.4, 92		
Ganso	79.4		
Halcón Harris	28.9		
Codorniz	65.6, 72.8, 81.2		
Paloma	83.6		
Hamster	120.7		
Rata Común	116.6		
Rata Spray Dowley	97		
Rata Wistar	100		
Ratón 2/NU	120.6		
Ratón C57/BL-6	120.7		

ESPECIE	% MIGRACION	FENOTIPO ELECTROFORETICO	
		ORIGEN	CATODO
Ratón DB/A2	126.6		■
Ratón BAB/C	117.6		■

G6FD ■

Hb ■

D I S C U S I O N :

Diversos son los métodos cuantitativos y cualitativos para la estimación de la actividad de G6FD (2), e independientemente que todos ellos se basan en la medición del NADPH generado en la reacción enzimática, ninguno tiene la combinación de ventajas que ofrecen ambos tipos de metodología.

Aún considerando que el número de muestras analizadas en la primera etapa de éste trabajo fué pequeño para determinar la correlación entre los métodos espectrofotométrico (OMS) y fluorométrico, la variación negativa que pueda obtenerse en el valor de "r" al aumentar el número de muestras, debe ser lo suficientemente significativa para afectar el valor obtenido con las 10 muestras analizadas ($r = 0.90$ y una $p = 0.001$); considerando además que tanto el método espectrofotométrico como el nuevo método fluorométrico, miden en forma directa la cantidad de NADPH presente en el sistema de reacción respectivo.

El método fluorométrico presente ofrece varias ventajas: ser directo y definitivo en la estimación de la actividad de G6FD como los métodos cuantitativos conocidos; y ser simple, rápido y de bajo costo, al igual que los métodos cualitativos; estas características le permitirán utilizarse como un método de tamizaje alternativo, con la cualidad de informar de la actividad específica de G6FD en las muestras analizadas.

Otra de las ventajas que ofrece este método es el de requerir para el ensayo enzimático de G6FD eritrocitaria, el paquete de eritrocitos procedentes de una muestra de sangre en un tubo capilar, lo que facilita el muestreo y permite el acceso a individuos en los que no es posible una punción venosa para la obtención de la muestra; además de facilitar la estimación de la actividad específica de G6FD en la diferente población eritrocitaria (jóvenes y viejos).

El estudio de G6FD eritrocitaria en diversas especies animales realizado en este trabajo, debe considerarse solo como una aportación más al conocimiento de ésta enzima, y de abrir nuevas expectativas de investigación para responder que significado bioquímico y metabólico tienen los hallazgos encontrados: en algunas especies animales la actividad de G6FD corresponde a niveles deficientes en el humano, y de que en otras, la enzima dá un fenotipo electroforético constituido por más de una banda de actividad enzimática.

C O N C L U S I O N E S :

Las conclusiones del presente trabajo son :

- 1.- El nuevo micrométodo propuesto es en realidad confiable, más económico y rápido para la medición de la G6FD eritrocitaria, comparado con el método espectrofotométrico estándar de la CNS, pudiéndose utilizar como método alternativo de tamizaje.
- 2.- Es factible la utilización del micrométodo presente en la búsqueda de un modelo animal que reúna las características necesarias para ser usado en el estudio de la deficiencia de G6FD humana.

B I B L I O G R A F I A :

- 1 .- Luzzatto L.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Genetic and haematological aspects. *Cell Biochem. Func.* 5:101-107,1987.
- 2 .- Luzzatto L., Mehta A.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, in Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (eds.): *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed. New York, Mc Graw-Hill, 1989.
- 3 .- Vaca G., Velázquez A.L., Cantú J. M.: Las eritroenzimopatías hereditarias. I. Aspectos bioquímicos y genéticos. *Bol.Of.Sanit. Panam.* 97:225-238,1984.
- 4 .- Takizawa T., Huang I-Y., Ikuta T., Yoshida A.: Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: Primary structure an cDNA cloning. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83:4157-4161,1986.
- 5 .- Beutler E., Yoshida A.: Genetic variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase: A catalog and future prospects. *Medicine* 67:311-334,1989.
- 6 .- Howard Hughes Medical Institute with assistance of The Human Gene Mapping 9th Workshop Committee: Regional Localization of genes and DNA segments on human chromosomes. Howard Hughes Medical Institute, May Haven, No. 3, Feb. 1989.
- 7 .- Fraenkel D.O.: Selection of *Escherichia coli* mutants lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase or gluconate-6-phosphate dehydrogenase. *J.Bacter.* 95:1267-1271,1968.
- 8 .- Iwabuchi M., Hori S.H., Yorimoto N.: X-linked mutations that give rise overproduction of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Biochem.Genet.* 24:319-327,1986.
- 9 .- Pretsch W., Charles D.J., Herkle S.: X-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in *Mus musculus*. *Biochem. Genet.* 26:89-1030,1988.
- 10 .- Beutler E.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, in Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S.: *The metabolic basis of inherited disease*, 4 th ed. New York, Mc Graw-Hill, 1978.
- 11 .- WHO Scientific Group: Standarization of procedures for the study of Glucose-6-phosphate dehydrogenase. WHO Technical Report Series No. 366,1967.

- 12 .- Vogel W., Steinbach P., Djalali M., Mehner K., Ali S., Epplen J. T.: Chromosome 9 of *Ellobius lutescens* is the X chromosome. *Chromosoma (Berl)* 96:112-119, 1988.
- 13 .- Hope R., Goss S., Solomon E., Ropers H.H., Banting G., Goodfellow P.N.: Localization of HIC5 to the region between HPRT and G6PD on the human X chromosome. *Ann.Hum.Genet.* 51:1-7, 1987.
- 14 .- Lyon M.F.: The William Allan Memorial Award Address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. *Am.J.Hum.Genet.* 42:8-16, 1988.
- 15 .- Mandel J.L., Willard H.F., Mussenbaum R.L., Davies K.E., Romeo G.: Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* (1-4):107-128, 1988.
- 16 .- Toniolo D., Persico M., Alcalay M.: A "housekeeping" gene on the X chromosome encode a protein similar to ubiquitin. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* 85:851-855, 1988.
- 17 .- Avner P., Amar L., Ansaud O., Hanauer A., Cambrou J.: Detailed ordering of markers localizing to the Xq26-Xqter region of the human X chromosome by use of an interspecific *Mus spretus* mouse cross. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84:1629-1633, 1987.
- 18 .- Brockdorff N., Cross S.S., Cavenns J.S., Fisher E.M.C., Lyon M.F., Davies K.E., Brown S.D.M.: The mapping of a cDNA from the human X-linked Duchenne muscular dystrophy gene to the mouse X chromosome. *Nature* 323:166-168, 1987.
- 19 .- Brockdorff N., Amar L.C., Brown S.D.M., Pulse-field linkage of the P3, G6PD and Cf-8 genes on the mouse X chromosome: demonstration of synteny at the physical level. *Nucleic Acid Res.* 17:1315-1326, 1989.
- 20 .- Heilig R., Lemaire C., Mandel J-L., Gondolo L., Amar L., Avner P.: Localization of the region homologous to the Duchenne muscular dystrophy locus on the mouse X chromosome. *323:166-170, 1987.*
- 21 .- Zhdanova N.S., Pack S.D., Mazurok N.A., Nesterova T.B., Gradov A-A-, Serov O.L.: Subchromosomal localization and order of GLA, PGKI, HPRT, and G6PD loci on the X chromosome of the American mink (*Mustela vison*). *Cytogenet. Cell Genet.* 48:2-5, 1988.
- 22 .- Chandra H.S.: X chromosomes and dosage compensation. *Nature* 319:18, 1986.

- 23 .- Marshall Graves J.A., Dawson G.W.: The relationship between position and expression of genes on the kangaroo X chromosome suggests a tissue-specific spread of inactivation from a single control site. *Genet. Res.Camb.* 31:103-109,1983.
- 24 .- Mohadas T., Geller R.L., Yen P.H., Rosendorff J., Bernstein R., Yoshida A., Shapiro L.J.: Cytogenetic and molecular studies on a recombinant human X chromosome: Implications for the spreading of X chromosome inactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:4954-4958,1987.
- 25 .- Mullins L.J., Veres G., Caskey C.T., Chipman V.: Differential of the ornithine carbamoyl transferase gene on active and inactive mouse X chromosomes. *Mol.Cell.Biol.* 7:3916-3922,1987.
- 26 .- Zakian S.M., Kulbakina N.A., Meyer M.N., Semanova L.A., Bochkarev M.N., Radjabli S.I., Serov O.L.: Non-random inactivation of the X-chromosome in inter-specific hybrid voles. *Genet.Res.Camb.*:23-27, 1937.
- 27 .- Beutler E.: Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. 2nd ed., Grune & Stratton,1975.
- 28 .- Beutler E., Mitchell M.: New rapid method for the estimation of red cell galactose-1-phosphate uridylyl-transferase activity. *J.Lab.Clin.Med.* 72:527-532, 1968.
- 29 .- Vaca R., Zuñiga P., Medina C., Alonso R., González-Quirós G., Ortiz-De Luna R.L., Cantó J.M.: A fluorometric method for red blood cell sorbitol dehydrogenase activity. *J.Clin.Pathol.* 36:697-700, 1983.
- 30 .- Beutler E.: A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and glutathione reductase deficiency. *Blood* 28:553,1966.
- 31 .- Sparkes R.S., Baluda M.C., Townsend D.E.: Cellulose acetate electrophoresis of human G6PD. *J.Lab.Clin.Med.* 73:531,1969.

GUADALAJARA, JAL., A 22 DE MAYO DE 1990.

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS C.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS.
P R E S E N T E .

Por medio de este conducto, comunico a usted que la C. Silvia Josefina López Pérez, pasante de la Lic. en Biología, con el No. de registro 82345034 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado "Diseño, estandarización y evaluación de un método fluorométrico para Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa".

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad que usted representa.

Sin mas por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un afectuoso saludo.

A t e n t a m e n t e .


M.C. LOURDES RAMIREZ DUEÑAS
DIRECTOR DE TESIS.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Sección
Expediente
Número 0314/90

SRITA. SILVA J. LOPEZ PEREZ
P R E S E N T E . -

Manifiestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "DISEÑO, ESTANDARIZACION Y EVALUACION DE UN METODO FLUOROMETRICO PARA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptada como Directora de dicha Tesis la Dra. Ma. de Lourdes Ramirez Dueñas.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Marzo 6 de 1990
EL DIRECTOR



~~ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS~~

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. La Dra. Ma. de Lourdes Ramirez Dueñas, Directora de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.