

Deficiencia de la deshidrogenasa de la Glucosa - 6 - Fosfato " G6PD " eritrocítica

Dr. German F. Sáenz R.*

Dr. Mario Chaves V.*

I. Generalidades bioquímicas del eritrocito, papel de la G6PD, variantes genéticas y hemólisis, aspectos clínicos, diagnóstico.

RESUMEN

El descubrimiento en 1956 de que la anemia hemolítica inducida por primaquina (13) estaba asociada con una deficiencia hereditaria de la deshidrogenasa de la Glucosa-6-Fosfato (G6PD) (D-Glucosa-6-Fosfato: NADP oxidoreductasa, E.C. 1.1.1. 49), promovió en los años subsiguientes una gran investigación en torno al metabolismo glucosídico de los eritrocitos, y al esclarecimiento de muchas formas de anemia hemolítica previamente inexplicables, señalándose como hecho histórico que la G6PD fue la primera enzima del glóbulo rojo que claramente se caracterizó como causa de fenómeno hemolítico, sirviendo luego de modelo de estudio para la investigación de otras eritroenzimopatías y de varios aspectos del metabolismo y la fisiopatología eritrocitarias. En la actualidad se han descrito más de 170 variantes o mutantes de la enzima, siendo la mayoría inocuas.

La anemia hemolítica frecuente por deficiencia de G6PD es de carácter episódico, pero algunas variantes pueden causar anemia hemolítica congénita crónica no esferocítica. En general, y de acuerdo con la prevalencia

de las dos variantes más frecuentes en todo el mundo —la africana y la mediterránea—, la hemólisis se asocia con algún tipo de stress, notablemente con la administración de drogas o medicamentos (real problema de salud pública en países tropicales o semitropicales), infecciones, período neonatal y en ciertos individuos caucásicos que se exponen a los frijoles de fava (*vicia fava*). No persigue esta revisión señalar en todos sus apartados la extensa bibliografía mundial sobre la G6PD. Se indicará la pertinente, y en los aspectos básicos generales se omitirán señalamientos bibliográficos cuando se trate de conocimientos hartamente conocidos.

GENERALIDADES SOBRE EL METABOLISMO GLUCOSIDICO Y EL MECANISMO REDUCTASICO DEL ERITROCITO

Las mitocondrias y los microsomas se pierden cuando el reticulocito madura hacia eritrocito; consecuentemente las células rojas maduras consumen poco oxígeno y no sintetizan proteínas. La glucosa, el principal sustrato metabólico de los glóbulos rojos, se metaboliza a través de dos vías mayores: la vía anaerobia o Ciclo de Emben-Meyerhof en donde aproximadamente el 90-95% de la glucosa se metaboliza a lactato, y la vía de los monofosfatos de hexosa, ciclo oxidativo o vía de las pentosas fosforadas (VPF).

Es en la vía anaerobia en donde únicamente se puede sintetizar ATP en los glóbulos rojos maduros (2 moles de ATP se

*Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA), Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios.

generan por mol de glucosa consumida). Si se compara con otras células que poseen mitocondrias y un ciclo activo de Krebs (el cual genera 38 moles de ATP por mol de glucosa consumida) la producción de ATP por esta vía glicolítica es altamente ineficiente.

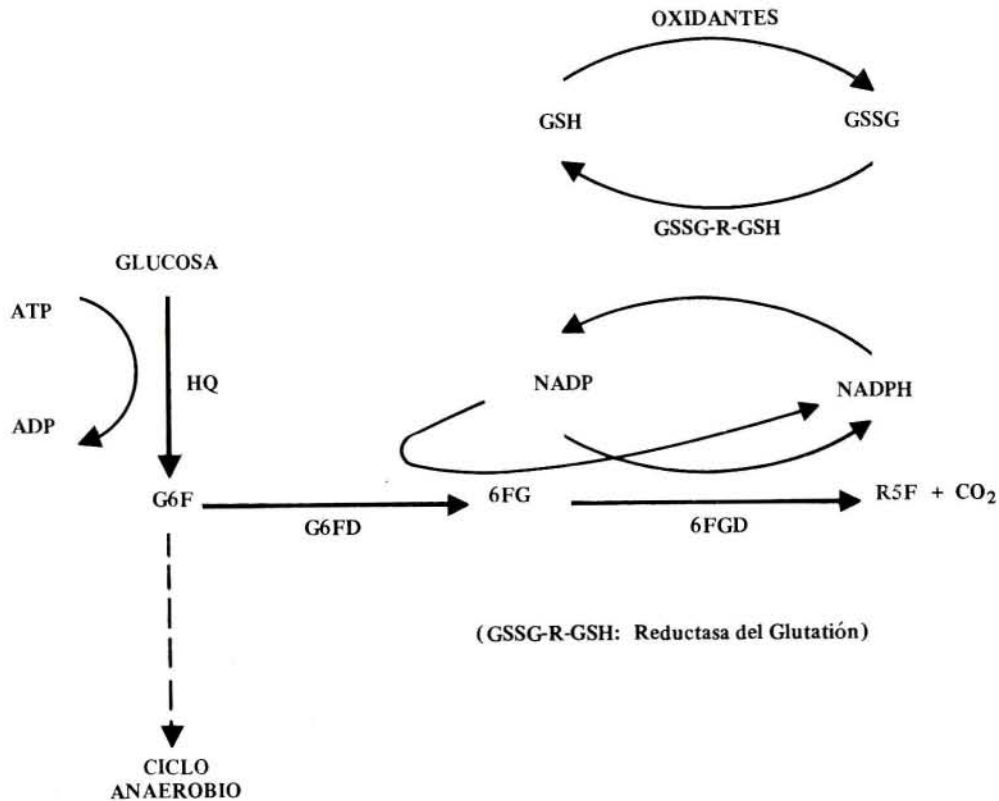
Las funciones importantes del ATP eritrocítico incluyen transporte activo de Na^+ y K^+ , mantenimiento de bajos niveles de calcio, fosforilización de las proteínas de la membrana y mantenimiento en sí misma de la glucólisis. También a través de la glucólisis se obtiene la mayor fuente de NADH, un cofactor esencial en una gran variedad de reacciones de oxidoreducción, siendo una de las principales el mantenimiento del hierro del heme en forma reducida a través de un proceso enzimático que es mediado por la diaforasa (NADH-metahemoglobina

reductasa). Los glóbulos rojos poseen una alta concentración de 2,3 DPG (4,5 mMoles/L de glóbulos rojos), que se forman en el desvío conocido como de Rapaport-Luebering. El 2,3 DPG es un modulador del transporte de O_2 por la Hb. Es un éster orgánico de fosfato, y un intermediario glucolítico. Su concentración en los glóbulos rojos normales es igual a la de la Hb (aprox. 5mM). Es anión altamente cargado. El 2,3 DPG se une a un sitio específico de la desoxiHb (más ávidamente que con la oxiHb), en una relación molar de 1:1, de acuerdo con la siguiente reacción:



Aproximadamente de 5-15% de la glucosa utilizada es normalmente catabolizada a través de la vía oxidativa de las pentosas fosforadas (VPF) (Fig. 1). Esta vía es la

Figura 1
CICLO O VIA DE LAS PENTOSAS FOSFORADAS
Y DEL GSH



principal fuente de NADPH en los glóbulos rojos (2 moles de NADPH son producidos por cada mol de glucosa metabolizada). Bajo condiciones en las cuales la oxidación del NADPH se encuentra acelerada, el metabolismo a través de la VPF se encuentra estimulado. Las más importantes reacciones asociadas con la oxidación del NADPH son aquellas relacionadas con el metabolismo del glutatión (GSH). Los glóbulos rojos contienen una concentración relativamente alta (2mM) de GSH, un tripéptido (δ -glutamyl-cisteinil-glicina) el cual es sintetizado de nuevo por los glóbulos rojos maduros. Su vida media es de cuatro días. El GSH es un tampón intracelular que protege a los glóbulos rojos contra injurias por oxidantes endógenos y exógenos. Oxidantes tales como el anión superóxido (O_2^-) y el H_2O_2 son producidos por macrófagos en asociación con infección, y por los glóbulos rojos en presencia de ciertas drogas (Fig. 2). Las drogas oxidantes en su mayoría producen H_2O_2 ó O_2^- , o ambos, y el O_2^- puede convertirse en H_2O_2 por la dismutasa del superóxido, una enzima presente en muchas células incluyendo los glóbulos rojos y leucocitos (9). El ión superóxido se forma cuando el O_2 es reducido por un electrón. Si estos agentes se acumulan habrá daño en las proteínas de las membranas. Normalmente esto es prevenido por el GSH el cual inactiva tales oxidantes. Esta detoxificación puede ocurrir espontáneamente pero es ampliada por la peroxidasa del GSH. La catalasa también degrada H_2O_2 , pero bajo condiciones fisiológicas su papel es menos importante dada su baja afinidad por el H_2O_2 (9). La peroxidasa del GSH requiere GSH y en vista del bloqueo que existe para la generación de éste en los pacientes con deficiencia de G6PD, el stress oxidante lleva a daño oxidativo dado el defectuoso sistema reductor del glóbulo rojo. En los procesos de reducción de H_2O_2 , el GSH es en sí mismo convertido a su forma oxidada (GSSG) y en mezclas inestables de disulfuro con grupos tioles de la Hb y de otras proteínas (GS-S-proteínas) (6).

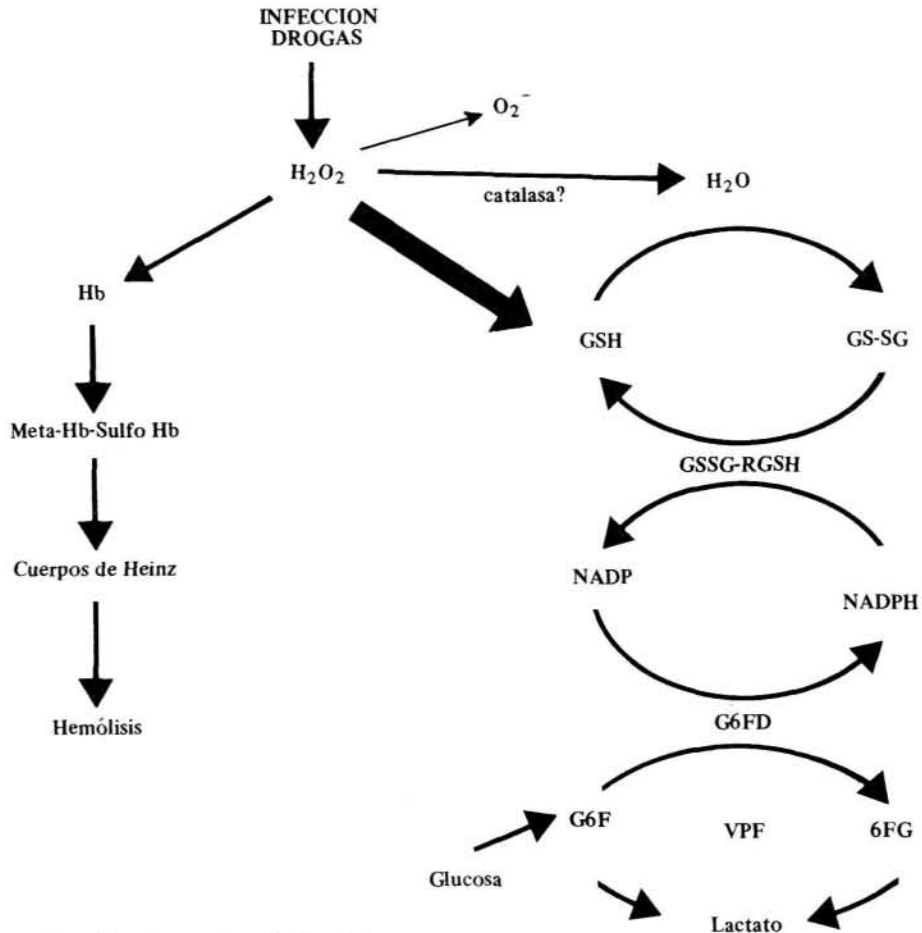
Algunas drogas pueden formar radicales libres que oxidan al GSH sin que se forme H_2O_2 como intermediario (6). Los niveles de GSH deben ser mantenidos en orden de ofrecer una adecuada protección contra la

ofensa oxidante. Esta acción se halla modulada por la reductasa del glutatión, la cual cataliza la reducción del GSSG y las mezclas de disulfuro a GSH, mediando el NADPH. La oxidación del NADPH estimula la actividad del VPF, el cual genera NADPH. Por lo tanto, existe una total y absoluta relación entre el VPF y el metabolismo del glutatión, coordinación bioquímica que normalmente protege a los glóbulos rojos de la oxidación ofensiva. Cualquier defecto en uno y otro sistema dificulta la habilidad de los glóbulos rojos para defenderse contra los insultos oxidativos, incrementándose la vulnerabilidad de sus proteínas hacia el daño oxidativo. La anomalía más común asociada con hemólisis oxidativa es la deficiencia de G6PD, la primera enzima de la vía oxidativa del VPF. La fisiopatología del daño oxidativo celular descansa en la siguiente secuencia de eventos, los cuales ocurren en el curso de la depleción de GSH (3):

1. Oxidación de la Hb a metaHb.
2. Mayor desnaturalización oxidativa de la Hb a sulfoHb.
3. Precipitación intracelular de la Hb así oxidada.
4. Agregación de la Hb degradada en grumos llamados cuerpos de Heinz.
5. Fijación de los cuerpos de Heinz a la membrana celular.

In vitro, los cuerpos de Heinz afectan adversamente varias propiedades de la membrana celular: disminuyen su desformabilidad, incrementan su permeabilidad a cationes e incrementan su fragilidad osmótica. In-vivo, los cuerpos de Heinz son eliminados de los glóbulos rojos circulantes por acción de los macrófagos del bazo por un proceso de picoteo (6). Dichos cuerpos, por tal motivo, son más numerosos en pacientes esplenectomizados y no se observan con las tinciones hematológicas convencionales, por lo que para poder observarlos deben usarse técnicas supravitales como las del azul cresil o del violeta de metilo. En los frotis de sangre teñidos con Wright no es infrecuente ver glóbulos rojos con bocas marginales o células triangulares, como producto presumiblemente de la remoción de cuerpos de Heinz en pacientes con hemólisis inducida por oxidantes. La presencia de esferocitos es factible también de ser detectada en vista de

Figura 2
FISIOPATOLOGÍA DE LA HEMOLISIS
ASOCIADA CON DEFICIENCIA DE G6FD (3)



(VPF: Vía de las pentosas fosforadas)

que la remoción de los cuerpos de Heinz lleva a la pérdida de membrana y por lo tanto a una disminución de la relación superficie:volumen (3). La historia de algunas drogas, en términos de su potencial hemolítico en la deficiencia de G6PD, ha sido confusa, y ha sido a través de recientes trabajos que al menos en parte se puede explicar dicha situación. En muchos casos un metabolito más que la droga como tal parece ser el agente hemolítico (16). Las drogas son metabolizadas primordialmente en el hígado, donde ellas pueden dar lugar hacia la formación de un intermediario hemolítico o ser detoxificada. Por lo tanto, hay oportu-

nidad para la interacción del sistema hepático metabolizante de la droga con la deficiencia eritrocítica de G6PD, en el sentido de que se produzca o no una respuesta hemolítica. Un buen ejemplo de lo anterior lo ofrece una de las sulfonas, la tiazosulfona, la cual causaba hemólisis en aproximadamente la mitad de los pacientes deficientes en G6PD con el fenotipo GdA⁻. Esta droga es un sustrato para la enzima N-acetil transferasa hepática, siendo la mitad de la población de raza negra rápida acetiladora de la droga. Por estudios in-vitro, en donde la tiazosulfona se incubó con microsomas de hígado de ratón (9), se ha concluido que dicha droga

es probablemente hidroxilada por el sistema de citocromo P450, convirtiéndose en un compuesto hemolítico para eritrocitos deficientes, al contrario de la acetil-tiazosulfona que es mucho menos tóxica. De esto se deduce que si un sujeto es un rápido acetilador, se protege contra la producción importante del derivado hidroxilado, y por lo tanto de fenómeno hemolítico. Para la dapsona, que todavía se usa, así como otras sulfas que también son sustrato para acetilación, se presenta una historia similar. Por lo tanto, variaciones genéticas en el sistema de acetilación hepática y, posiblemente influencias genéticas y ambientales en el sistema de hidroxilación del citocromo P450, contribuyen a la variabilidad en la respuesta hemolítica de algunas drogas.

DEFICIENCIA DE G6PD (Gd)

La deficiencia de la G6PD (Gd) es la anomalía enzimática más común asociada con anemia hemolítica, afectando millones de personas en todo el mundo. Se han reconocido más de 170 variantes de la enzima con base en propiedades bioquímicas anormales tales como movilidad electroforética, pH óptimo, inhibición por NADPH, termoestabilidad, y la Km para su sustrato (G6PD) o su cofactor (NADP) (29,30,46,48).

La mayoría de tales mutantes no se hallan asociadas con desorden clínico; otras sí, con anemia hemolítica crónica y/o episódica.

VARIANTES

Una gran parte de las variantes conocidas de la Gd son enzimáticamente normales y por lo tanto no provocan problemas clínicos (Cuadro I). Existen dos tipos importantes de enzimas anormales, que se designan G6PD (A⁻), GdA⁻ o variante africana, y G6PD (B⁻), GdB⁻, o Gd mediterránea. La enzima normal se denomina G6PD (B⁺) ó GdB. La variante GdA⁺, cuya movilidad electroforética es mayor que la GdB, es muy común, ocurriendo en un 20% de los negros americanos. Ella posee propiedades catalíticas normales y por lo tanto no hay problema de hemólisis. Su estructura difiere de la normal (GdB) por la sustitución de asparagina por aspartato en la secuencia de aminoácidos (30).

La GdA⁻ es la variante más común asociada con hemólisis episódica y se encuentra en un 13% de los negros americanos (9). Su movilidad electroforética es idéntica a la GdA⁺, pero su actividad catalítica se halla disminuida. La enzima anormal GdA⁻ posiblemente se sintetiza en cantidades normales, pero tiene disminuida su estabilidad in vivo

Cuadro 1
VARIANTES GENÉTICAS DE G6PD HASTA 1978
(30,47)

	GRAN TOTAL DE CADA GRUPO (%)	GRAN TOTAL (%)
I. Deficiencia enzimática con AHCNE (*)	46	27.3
II. Deficiencia enzimática severa (1)	50	29.5
III. Deficiencia enzimática ligera a mod. (2)	47	27.8
IV. Actividad enzimática normal	25	14.8
V. Actividad enzimática incrementada	1	0.6
TOTAL	169	100

(*) AHCNE = Anemia hemolítica congénita no esferocítica.

(1) Actividad < 10% de la normal.

(2) Actividad 10-60% de la normal.

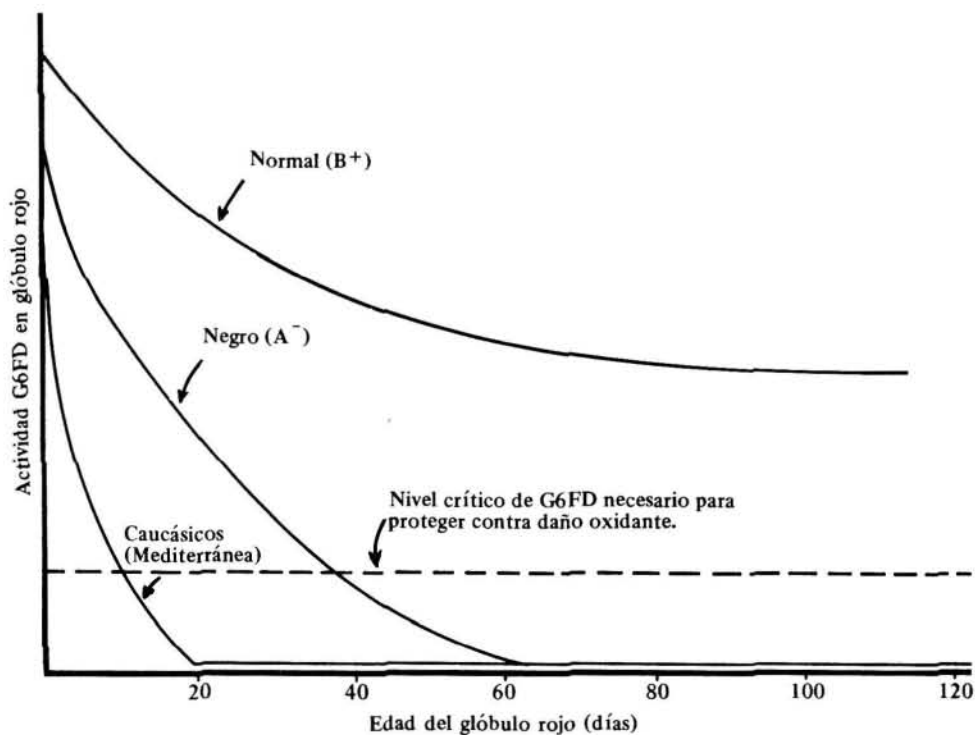
(6). La GdA y la GdA⁻ se pueden separar por cromatografía. La GdB⁻ o Gd mediterránea, es la segunda variante más común, encontrándose en los pueblos del área mediterránea (Sardinianos, judíos sefartidas, árabes, etc.). Su movilidad electroforética es idéntica a la enzima normal o GdB, pero su actividad catalítica es marcadamente disminuida. La GdB⁻ parece resultar de la formación de moléculas con una actividad enzimática disminuida (6). La deficiencia de G6PD también se ve en poblaciones orientales, en las cuales la variante más común es la Gd-Canton, una mutante con propiedades similares a la Gd-mediterránea o GdB⁻ (Cuadro 2).

RELACION ENTRE ENZIMA ANORMAL Y HEMOLISIS

En las células rojas normales, in vivo, la actividad intracelular de la GdB decae lentamente con una T 1/2 de 60 días (3,30). A despecho de esta pérdida de actividad enzimática las células retienen suficiente

actividad de Gd como para producir NADPH y mantener por ende glutatión como GSH ante un stress oxidante. El defecto en GdA⁻ da como resultado una variante con una estabilidad enzimática anormal y una T 1/2 de 13 días. Por lo tanto, las células jóvenes presentan una actividad enzimática normal en tanto las viejas se encuentran muy deficientes y por lo tanto anormalmente sensibles a agentes oxidantes. La Gd mediterránea es aún más inestable, siendo baja la actividad en eritrocitos jóvenes y no hay virtualmente actividad en las células maduras. Como consecuencia, la población eritrocítica total de los individuos con la variante GdB⁻ es susceptible de daño oxidativo (Fig. 3). Se ha estimado que la T 1/2 de la GdB (normal) es de 60 días, 13 días la de la GdA⁻, de 8.5 la de la GdB⁻, y la de la mayoría de las variantes que cursan con AHCNE, menor de 8.5 días (30). Mientras que la hemólisis inducida por medicamentos es clásicamente intravascular, la hemólisis crónica que se presenta en enfermos con AHCNE es princi-

Figura 3
DISMINUCION INTRACELULAR DE LA G6PD EN EL GLOBULO ROJO EN FUNCION A LA EDAD DE LA CELULA (3)



Cuadro 2
CARACTERISTICAS DE LA G6PD NORMAL Y DE ALGUNAS VARIANTES
(46)

Enzima	Actividad (% de lo normal)	Km para G6P (uM)	Km para NADP (uM)	Estabilidad calor	pH óptimo
Variantes no asociadas con anemia hemolítica crónica					
B ⁺ (normal)	100	50-70	2.9-4.4	Normal	8-9
A ⁺	80	Normal	Normal	Normal	8-9
A ⁻	8-20	Normal	Normal	Normal	8-9
Unión	< 3	8-12	3.6-5.2	Baja	Bifásico
Markham	1.5-10	4.4-6.3		Baja	Bifásico
Mediterránea	< 5	19-26	1.2-1.6	Baja	Bifásico
Variantes asociadas con anemia hemolítica crónica (AHCNE)					
Bat-Yam	0	27		Muy baja	Bifásico
Ramat-Gan	0	35		Muy baja	Bifásico
Worcester	0	11.6	61	Muy baja	8.0
Oklahoma	4-10	127-200	20	Baja	8.2
Ashdod	10	100		Lig. baja	Bifásico
Freiburg	10-20	87-118	4		Bifásico
Albuquerque	1	115	11	Muy baja	8.2
Milwaukee	0.5	224			8.0
Clichy	2	178			9-10
Strasbourg	6	96	13	Baja	9.0
Bangkok	5	60	5.3	Muy baja	8.5
Torrance	2.4	48-60	2.4	Muy baja	8.5
Manchester	25-30	64	6	Baja	Bifásico
Alhambra	9-20	55	2.6	Baja	Truncado
Tripler	35	30		Muy baja	Bifásico

palmente extravascular, como lo prueban la ausencia de hemoglobinuria crónica y, por lo tanto, una deficiencia de hierro superpuesta (29).

En la mayoría de los pacientes con las variantes GdA⁻ y GdB⁻ la sobrevida de los glóbulos rojos es cercana a la normal en ausencia de drogas oxidantes o de infección. En algunos pacientes deficientes en G6PD ocurre hemólisis crónica en ausencia de medi-

camentos o de otros factores oxidativos para el glóbulo rojo. Estos casos se caracterizan por una enzima anormal que es incapaz de mantener la producción basal de NADPH. Estas variantes generalmente presentan una alta Km para NADP o una baja Ki para NADPH (es decir, son inhibidas a una baja concentración de NADPH). Consecuentemente, la actividad enzimática medida bajo condiciones ideales in-vitro (alto NADP y

Cuadro 3
COMPUESTOS QUE INDUCEN HEMOLISIS
EN GLOBULOS ROJOS DEFICIENTES EN LA ENZIMA G6FD
(3,45)

ANALGESICOS:

Acetanilida
Acido Acetilsalicílico*
Fenazona
Aminofenazona
Fenacetina
Antipirina**
Aminopiridina (Pyramidon)**

SULFONAMIDAS Y SULFONAS:

Sulfanilamida
Sulfapiridina
N₂-Acetilsulfanilamida
Sulfacetamida
Sulfafurazole*
Tiazosulfona (Promizole)
Salicilazosulfapiridina (Azulfadine)
Aldesulfona sódica
Sulfametoxipiridazina (Kynex)
Sulfoxone (Dapsone)
Diaminofenilsufona (DDS)
2-amino-5-Sulfaniltiazole
Sulfisoxasol (Gantrisin)

ANTIMALARICOS:

Primaquina
Pamaquina
Pentaquina
Mecacrina*
Quinocida
Quimacrina (Atabrina)

AGENTES ANTIBACTERIANOS

NO SULFAMIDICOS:

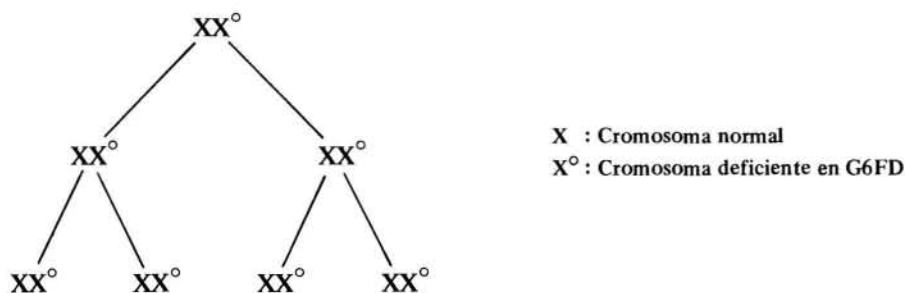
Furazolidona (Furoxone)
Nitrofurantoina (Furadantin)
Cloranfenicol**
Acido para-aminosalicílico
Furaltadona (Altafur)
Nitrofurazona (Furadin)

MISCELANEOS:

Naftaleno
Vitamina K (análoga soluble en agua)
Probenecid (Benemid)
Trinitrotolueno
Azul de Metileno
Dimercaprol (BAL)
Fenilhidrazina
Quinina**
Quinidina**
Frijoles de Fava
Acido Nalidixico (Wintomilon)

* Discretamente hemolíticos en poseedores de la variante africana; sólo a grandes dosis son nocivos.
** Hemolíticos en sujetos con la variante mediterránea, no con la variante africana.

Figura 4
DEFICIENCIA DE G6FD EN MUJERES
DE ACUERDO A LAS PREDICCIONES DE LA HIPOTESIS DE LYON (3)



INACTIVACION DE CROMOSOMA X				% DE CELULAS ANORMALES
X	X	X	X	0
X°	X	X	X	25
X°	X°	X	X	50
X°	X°	X°	X	75
X°	X°	X°	X°	100

bajo NADPH) puede ser cercana de lo normal, a pesar de que la misma enzima in-vivo, bajo condiciones fisiológicas (bajo NADP, alto NADPH), se comporte como marcadamente disminuida. Es claro entonces que el grado de deficiencia enzimática no se correlaciona bien con la severidad clínica de la enfermedad hereditaria, siendo este uno de los problemas en la patología molecular de los desórdenes genéticos (46). Por lo tanto, algunas variantes asociadas con deficiencia severa de G6PD, tales como Gd Markham y la Gd Unión no causan problema hemolítico, en tanto que otras asociadas con una menor severa deficiencia, tales como Gd Manchester, Gd Alhambra y Gd Tripler causan anemia hemolítica crónica aun en ausencia de agentes exógenos. En algunas oportunidades las manifestaciones clínicas pueden ser explicadas por una inusual baja afinidad de una determinada variante por su sustrato (G6P) o coenzima (NADP), es decir con altos valores de la Km. Estas discrepancias han sido en gran parte resueltas al estimarse la actividad fisiológica de la G6PD a través de

estudios cinéticos simulados en donde han mediado concentraciones fisiológicas del sustrato, de las coenzimas y de varios metabolitos que pueden afectar la actividad de la enzima. Estos análisis han demostrado que las variantes enzimáticas hemolíticas son fuertemente inhibidas por el NADPH a concentraciones fisiológicas en vista de su alta Km para NADP o su baja Ki para NADPH, y que ellas son más fuertemente inhibidas por el ATP que las enzimas normales. De ello se deriva, que estas variantes enzimáticas no pueden generar una cantidad suficiente de NADPH a fin de mantener una concentración adecuada de GSH (46,48). Por otro lado, las variantes no hemolíticas son mucho menos sensitivas a la inhibición por NADPH en vista de su baja Km para NADP y su alta Ki para NADPH. Estas variantes también son más resistentes a la inhibición por ATP, y la actividad de las mismas se estima que es mayor del 30% de los niveles normales. En personas de raza negra la variante común en ellas, la GdA, es también menos sensitiva a la

inhibición por NADPH y es probablemente tan activa como la normal bajo condiciones fisiológicas.

GENÉTICA

El gene de la G6PD se halla localizado en el cromosoma X, por lo que la herencia de esta enzima polimórfica se halla ligada al sexo. Los hombres presentarán un solo tipo de G6PD en tanto las mujeres pueden tener un fenotipo doble. Por ejemplo, en la raza negra de los Estados Unidos, el 70% de los hombres son GdB, el 20% GdA⁺ y el 10% son GdA⁻ (3). Las mujeres, por otro lado, pueden ser homocigotas o heterocigotas para dos de esas tres enzimas. De acuerdo con la hipótesis de Lyon —cuya validez ha sido fuertemente sustentada por los datos genéticos sobre G6PD—, solamente un cromosoma X es activo en cualquier célula somática. Por lo tanto, eritrocitos individuales de mujeres contienen solamente un tipo de G6PD. En vista de la hipótesis de Lyon, cualquier glóbulo rojo dado en una mujer heterocigota deficiente (por ej. GdA/GdA⁻) será normal (GdA) o deficiente (GdA⁻). La confirmación de que mujeres con el ejemplo señalado presentan una doble población celular se ve confirmada por tinción citoquímica de los glóbulos rojos. Estos fenómenos celulares han permitido útiles estudios acerca del origen celular de tumores.

Así, el aislamiento de estas enzimas de células tumorales en mujeres doble heterocigotas por ej. GdB⁺ y GdA⁻, han permitido demostrar el origen unicéntrico o multicéntrico del tumor.

La actividad enzimática en mujeres que poseen un gene de G6PD deficiente puede ser normal, moderadamente reducida (usual) o marcadamente deficiente (Figura 4). Obviamente, los glóbulos rojos defectuosos en la enzima son tan susceptibles a la hemólisis oxidativa como los de hombres deficientes en Gd. Sin embargo, por lo general, la magnitud absoluta de la hemólisis es generalmente menor en vista de que es menor la población celular vulnerable (3). Se ha señalado que alrededor de una tercera parte de todas las mujeres heterocigóticas, tienen una proporción de eritrocitos anormales suficientemente elevada para predisponerlas a sufrir hemólisis de importancia clínica (35). La hemofilia A, un desorden recesivo ligado al

sexo, está íntimamente ligado al locus de la G6PD (43), y fue anticipado que las variantes electroforéticas de ésta enzima podrían expresarse en células de líquido amniótico, éxito analítico-diagnóstico que fue hecho en una madre que tenía el fenotipo Gd AB y para la cual los estudios familiares indicaron que el locus de la hemofilia estaba acoplado con el fenotipo GdA (20). El fenotipo GdB de las células fetales estudiadas exactamente predijo que el niño in-utero no tendría hemofilia.

La distribución geográfica de la deficiencia de G6PD ha servido de soporte a la hipótesis de que los pueblos con este defecto enzimático son más resistentes a la malaria tal y como la insinuaron los estudios de Allison (1). Trager (42) encontró que los parásitos de la malaria requieren GSH y un mecanismo oxidativo óptimo derivado del metabolismo de la glucosa. El bajo contenido en GSH, y la actividad disminuida del ciclo oxidativo directo de los eritrocitos primaquina sensibles, son factores que aparentemente dificultan la vida intracelular de estos parásitos. Estos criterios se han soportado por estudios epidemiológicos y por observaciones en mujeres heterocigotas en donde se ha demostrado la resistencia de las células deficitarias en la enzima al comprometimiento malárico (3). Sin embargo, la prevalencia del fenotipo GdA⁺ en negros es inexplicable en términos de polimorfismo genético.

ASPECTOS CLINICOS

El descubrimiento de que la deficiencia de Gd es causa de hemólisis se debió a la observación inicial en soldados de raza negra de los Estados Unidos que manifestaron hemólisis luego de recibir primaquina como agente profiláctico contra la malaria. Posteriormente, numerosas otras drogas oxidantes han sido implicadas como agentes causales (Cuadro 3). Sin embargo, la infección es la causa más frecuente de hemólisis, estando implicada virtualmente cualquier tipo de infección (3,6,16,25,32,37,45). Presumiblemente son el anión superóxido y el H₂O₂ que se generan en los macrófagos en respuesta a infección, los agentes que dañan indirectamente los glóbulos rojos deficientes. La hemólisis en hombres de raza negra se halla limitada al 20-30% de sus glóbulos rojos que son los más viejos (más de 50 días)

y por ende deficientes en la Gd (35). Como los glóbulos rojos más jóvenes poseen una actividad enzimática cercana a la normal ellos no son susceptibles a la hemólisis aunque persistan, ya sea la administración de la droga oxidante, o un determinado proceso infeccioso. Los fenómenos hemolíticos importantes son inusuales en mujeres de raza negra a menos que haya una significativa lyonización del cromosoma anormal (3).

La hemólisis en caucásicos (GdB⁻) es generalmente más severa, toda vez que existe una marcada deficiencia de la enzima en todos los eritrocitos.

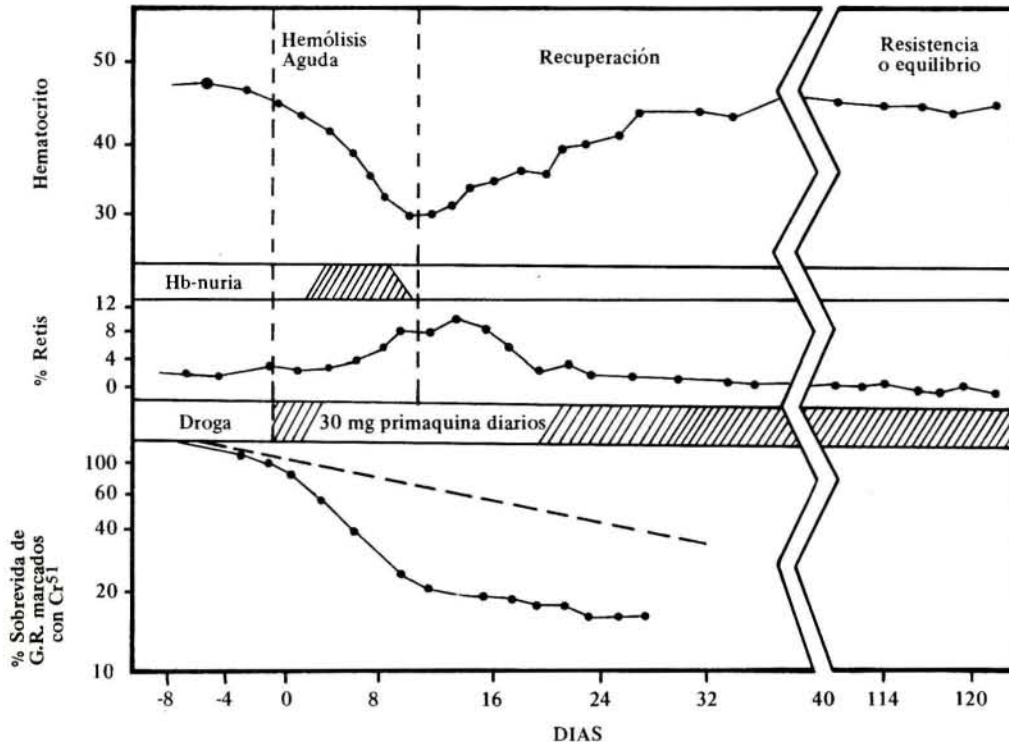
La persistencia de una infección o la administración continuada de una droga oxidante puede producir una anemia significativa (Cuadro 4). La muerte debida a deficiencia de G6PD es rara, pero cuando ésta ocurre es en el grupo de pacientes de raza blanca, (3,35). Las mujeres caucásicas pueden presentar episodios hemolíticos significativos, siendo la magnitud de la hemólisis propor-

cional al grado de lyonización. La anemia hemolítica crónica (AHCNE) debida a variantes severas de G6PD se ve solamente en individuos de raza blanca. En algunos sujetos con AHCNE la esplenectomía ha sido beneficiosa (4). En algunos individuos la mutante GdB⁻ puede originar AHCNE (6, 47). Ocasionalmente se observa un severo episodio hemolítico en algunos sujetos caucásicos o caucasoides con la variedad Gd mediterránea luego de la exposición a los frijoles de fava o su polen (5). Es posible que otros factores como alergia estén comprometidos en esta condición clínica severa conocida como favismo. Es intrigante el hecho de que los frijoles de fava sean ricos en L-Dopa y el de que un metabolito de este compuesto, la dopaquinona, sea un potente oxidante (3). De allí que tal vez la limitada sensibilidad a dichos frijoles pueda ser debida a diferencias individuales en el metabolismo de la L-Dopa. La observación de una excreción aumentada de ácido glucárico en pacien-

Cuadro 4
ALGUNOS ASPECTOS DE LAS VARIANTES POR DEFICIENCIA DE G6PD,
CLINICA Y BIOQUIMICAMENTE BIEN CARACTERIZADAS
Y ASOCIADAS A UNA HEMOLISIS AGUDA,
PERO NO CON LA CRONICA O CLINICAMENTE SIGNIFICATIVA (29).

	Africana (A ⁻)	Canton	Mahidol	Mediterránea (B ⁻)
Pueblos donde es corriente:	Africanos o descendientes de africanos	Chinos	Tai	Griegos, sardos, israelíes, iraquíes, etc.
Límites de actividad de la G6PD del glóbulo rojo, % de lo normal	10-20	4-24	5-16	0-5
Asociación con hemólisis provocada por medicamentos, infección	Sí	Sí	Sí	Sí
Asociación con favismo	?	Sí	?	Sí
Asociación importante con ictericia neonatal	Sí	Sí	Sí	Sí
Actividad aumentada de la G6PD en los glóbulos rojos restantes después del ataque hemolítico	Sí		Sí	Mínima
Descenso de la hemoglobina, g/dl, observado frecuentemente en el ataque hemolítico	2-5	4-10	2-8	4-10

Figura 5
CURSO CLINICO DE LA HEMOLISIS PROVOCADA POR PRIMAQUINA
EN INDIVIDUOS DE RAZA NEGRA CON EL GENOTIPO GdA⁻
(tomado de -45-)



tienen un papel importante. Pero en la actualidad, y como se ha reiterado, se conoce con exactitud que los alimentos (*vicia fava*) y los medicamentos no son los únicos causantes, y que infecciones como la fiebre tifoidea y la hepatitis vírica pueden ser tan importantes o más en la epidemiología de las manifestaciones de deficiencia de G6PD.

Probablemente, la más importante es la existencia mayoritaria de gente anémica en la población. Clásicamente se ha podido constatar, por ejemplo, que en individuos con deficiencia de G6PD de tipo Africano (A⁻) la hemólisis es en general muy leve (29). Pero claro está que el peligro potencial de un ataque hemolítico agudo viene sustancialmente ampliado cuando va superpuesto a una anemia preexistente: un descenso de hemoglobina de 4 a 5 g/dl tiene muy diferentes implicaciones en el diagnóstico y pronóstico si el nivel inicial es de 15, o si es de 7.5 g/dl. En tercer lugar, la deficiencia de G6PD

desempeña un importante papel patogénico con respecto a un también importante problema de salud pública en pediatría, en especial en la ictericia neonatal. Ahora ya se sabe que en varios lugares del mundo, por ejemplo en algunas áreas del Mediterráneo, en Africa Occidental y en el lejano Oriente, la deficiencia de G6PD, y no la isoimmunización de grupo sanguíneo, es la causa más simple y corriente de la ictericia neonatal (12,19,22,23,28,44). También se presenta en áreas en las cuales antes ni se había pensado, por ejemplo, en El Salvador (7).

La ictericia puede ser lo suficientemente severa por requerir la exanguíneo-transfusión. La susceptibilidad de los niños deficientes en G6PD hacia la hemólisis ha sido atribuida a sus bajos niveles de glucosa, "inmadurez enzimática", bajos niveles de peroxidasa del GSH y tal vez también a drogas, tales como la vitamina K, cuando se da estando el sistema de detoxificación hepática incomple-

tamente desarrollado (45). Un aspecto curioso de este síndrome es que, a pesar de su gran asociación con la deficiencia de G6PD, no todos los niños con deficiencia de G6PD presentan luego ictericia, lo que viene a indicar que otros factores adicionales, genéticos, de desarrollo o ambientales también intervienen (11,22,29,33,36,44). Con respecto a este problema se citan algunos puntos importantes para establecer medidas preventivas (29):

1. No sólo la exposición del niño, sino también la administración de medicamentos muy activos o peligrosos a la madre en el período prenatal pueden ir seguidas de ictericia en el recién nacido.
2. La incidencia de la ictericia neonatal entre los niños deficientes de G6PD se presenta mucho más entre los africanos que entre los americanos antiguos descendientes de africanos, aun cuando poseen la misma variante de la enzima. Esto pone de relieve la importancia del medio ambiente.
3. Meloni et al. (31) han proporcionado hace poco una notable evidencia de que la hiperbilirrubinemia de los niños deficientes de G6PD puede con mucho no ser hemolítica de origen, señalando una posible implicación del hígado. Los mismos autores han demostrado que el fenobarbital puede ayudar a prevenir que la bilirrubinemia alcance un nivel peligroso, lo que constituye un importante medio de disminuir al mínimo la necesidad de las transfusiones.
4. Por último, en el lado positivo, se puede decir que las manifestaciones clínicas de deficiencia de G6PD son menos prominentes de lo que cabría esperar. Por ejemplo, en Nigeria, con alta frecuencia de deficiencia de G6PD tendría que ser una de las causas más corrientes de anemia hemolítica aguda. De hecho, se presentan ataques hemolíticos típicos que pueden ser fatales. No obstante, la experiencia de Luzatto (29) no los detecta tan frecuentemente como sería de esperar si tenemos en cuenta la gran población que corre este riesgo. Hasta cierto punto, la discrepancia puede ser sólo aparente, porque frente a una prevalencia de anemia en

general alta, el papel de varios factores que participan puede ser difícil de desentrañar. Pero esta alta prevalencia de anemia puede también, paradójicamente, producir otro efecto protector; en especial, que un buen número de individuos de la comunidad tienen altos niveles de enzimas de los eritrocitos, incluyendo la G6PD, y, por consiguiente, una compensación parcial de su rasgo genético anormal, al ser deficientes de G6PD.

En cuanto a los bancos de sangre, conviene detectar esta deficiencia en los donadores. ya que los eritrocitos deficientes tienen solamente días de sobrevida y por lo tanto podrían ser destruidos o eliminados de la circulación especialmente en receptores que se encuentran bajo cierta terapéutica química o que estén sufriendo infección severa, insuficiencia renal, enfermedad hepática o acidosis diabética (10, 14). Asimismo, parece importante evitar las transfusiones, pues estos enfermos son propensos a la evolución grave o fatal, cuando desarrollan enfermedades hepáticas (37).

ANORMALIDADES EN EL METABOLISMO DEL GSH

La primera línea de defensa del glóbulo rojo contra agentes oxidantes es el GSH, por lo que anomalías en su metabolismo pueden estar asociadas con proceso hemolítico. La disminución de la síntesis de GSH se ha reportado en muy pocos pacientes que presentan una anemia hemolítica ligera o moderada, siendo la condición droga-oxidante-sensible. También son raros los casos de hemólisis debidos a deficiencia de peroxidasa del GSH. Los insólitos casos reportados de deficiencia de reductasa del GSH no parecen vinculados con hemólisis. Se sabe que el dinucleótido de flavina-adenina es un cofactor para la reductasa del GSH (3).

Entre otras causas de daño oxidativo a los glóbulos rojos, se citan la administración de drogas oxidantes en altas dosis, condición que sobrepasa la capacidad protectora de eritrocitos normales. Por otra parte, algunas hemoglobinas anormales, por su configuración molecular inestable, son muy susceptibles aun a un ligero stress oxidativo condicio-

nándose regularmente un accidente hemolítico importante.

Para terminar, Luzzato (29) hace una corta lista esquemática de los problemas sobresalientes que pueden ocupar a nuestros clínicos, a nuestros laboratorios y nuestra inteligencia durante bastante tiempo, en torno a la G6PD:

1. La química de la molécula de G6PD debe ser aclarada. La información sobre su estructura primaria y sobre la configuración espacial nos ayudará a interpretar de modo más concreto el caudal de datos que podemos obtener sobre la cinética de los tipos normales y anormales de esta enzima la cual es hasta ahora única en la genética bioquímica humana.
2. Todavía no está claro, si el número de variantes conocidas de G6PD es muy grande sólo porque el sistema ha recibido más atención que otros y porque hay inherentemente una mayor mutabilidad en este locus genético.
3. La coexistencia de dos tipos de células en los heterocigotos puede constituir una base para el estudio de los papeles relativos del cambio y de la selección, operante en las células más que en la población de los organismos. Estos procesos, escalonados en tiempo y tamaño, pueden ser ahora analizados en el laboratorio en cultivos celulares y la importancia del medio ambiente puede ser estudiada mediante la selección de los medios apropiados.
4. A pesar de los conocimientos generales que se han logrado sobre la naturaleza de los procesos hemolíticos asociados con la deficiencia de G-6-PD la secuencia precisa de los acontecimientos que conducen a una masiva o repentina destrucción de glóbulos rojos bajo una gran variedad de circunstancias no ha sido todavía del todo dilucidada. Esto resulta en cierto modo paradójico, ya que uno creería que la hemólisis intravascular debería ser el modo más fácil de imitar en el tubo de ensayo (como lo es, por ejemplo, en la hemoglobinuria paroxística nocturna). Evidentemente, algún momento de nuestro sistema in vitro no imita en forma adecuada la situación in vivo.
5. Para algunas medidas pertinentes a la

prevención y tratamiento podrá aplicarse en un futuro algún sistema específico de estudio. Por ejemplo, pueden encontrarse o prepararse agentes que puedan disminuir la evolución rápida, asociada con la edad del glóbulo rojo, de ciertas variantes inestables de la G6PD. También es concebible que puedan existir verdaderos antídotos, que contrarrestaran los efectos de stress producidos por los medicamentos ofensivos sobre los glóbulos rojos G6PD-deficientes, y, de este modo, poder prevenir o limitar las hemólisis agudas. Mientras que por el momento, la aplicación de una cirugía genética parece remota y cuestionable, en cierto modo, alguna suerte de cura fenotípica está quizás a la vista.

Para terminar, creemos importante mencionar lo que en relación a la deficiencia de G6PD se ha investigado en nuestro país. En 1966, Alvarado (2) trabajó en una tesis de grado sobre actividad de G6PD en recién nacidos normales e ictericos de la provincia de San José, no encontrándose ningún caso positivo de ictericia neonatal por deficiencia de G6PD. En 1971 (38) encontramos en población de raza negra de Limón una frecuencia de 14.5% en varones y de 3.3% en mujeres homocigotas. Posteriormente, en 1973 (39) se obtuvo un 4.3% de varones deficientes en población mestiza de Santa Cruz, Guanacaste, y de 0.2% en caucásicos de San José. En un estudio de 12.000 escolares (40) se logró demostrar un 2.3% de varones deficientes, al margen de su condición racial. El análisis de G6PD por electroforesis y actividad enzimática de 25 muestras de sangre de individuos de nuestros laboratorios, 13 varones y 12 mujeres, nos permitió encontrar 21 casos con el fenotipo GdB, uno GdAB y GdA. Los poseedores del fenotipo GdA eran de carácter racial mestizo; el resto caucásicos. En 1974, Castro y Snyder (16) reportaron una nueva variante de la G6PD en un varón caucásico costarricense, que era indistinguible de la GdA⁻ por electroforesis, pero diferente por estudios de inhibición con NADPH. A la mutante se le denominó Gd San José.

En nuestros laboratorios y en asocio con el Instituto de Hematología de La Habana, Cuba, hemos encontrado una variante de migración semejante a la GdB y por cuyo compartimiento físico-químico se le ha caracterizado como mutante nueva, de gran

expresividad clínica, originando en el propo-
situs una forma de AHCNE. Se le ha desig-
nado como Gd Costa Rica (21).

DIAGNOSTICO

Existen varias pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la deficiencia de la G-6PD (34). En nuestro laboratorio usamos de rutina la del cianuro-ascorbato (26), como también las de la reducción de la metahemoglobina (8) y del azul de metileno (41). La sensibilidad de estas pruebas es variable, especialmente en la detección de heterocigotas. Por ello, la utilidad de una u otra la determina la situación clínica, es decir, el sexo del paciente, su extracción racial y la potencialidad de que se desarrolle o se esté ante un episodio hemolítico.

La segunda parte de esta investigación ofrecerá la oportunidad a los lectores de conocer el uso de nuestra metodología, tanto de escrutinio como de certeza, al abordarse un protocolo sobre la prevalencia y la identificación fenotípica de la G6PD en diversas regiones de nuestro país.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allison, A.C. Malaria and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Nature*, 197:609, 1963.
- 2.- Alvarado, E. Contribución al estudio de la G6PD eritrocítica (Tesis de Grado). Universidad de Costa Rica, 1966.
- 3.- Beck, W.S. Hematology. 2nd Edit. 282-294 pp. Mass. Inst. Tech.; The Alpine Press Inc., 1977.
- 4.- Benbassat, J. & Ben-ishay, D. Hereditary hemolytic anemia associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. (Mediterranean Type). *Israel J. Med. Sci.*, 5:1053, 1969.
- 5.- Beutler, E. Pathogenesis and diagnosis of spontaneous and drug-induced hemolytic anemia due to lack of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the erythrocyte. *Relazione al VI Congresso Internazionale di Patología Clínica, Roma 3-8 Ottobre, 1966.*
- 6.- Beutler, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Chapter 50, 466-479 pp. In: Williams, W.J. et al.: *Hematology 2nd Ed.*, 1977. Mc Graw-Hill, Inc.
- 7.- Block, M., Sancho, G. & Rivera, H. Ictericia neonatal y deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. *Sangre*, 16: 253, 1971.
- 8.- Brewer, G.J., Tarlov, A.R. & Alving A.S. The methemoglobin reduction test for primaquine type sensitivity of erythrocytes. *J.A.M.A.*, 180:386, 1962.
- 9.- Brewer, G.J. Inherited Erythrocyte metabolic and membrane disorders, 579-591 pp. In: *The Medical Clinics of North America*, Vol. 64, No.4, 1980. W.B. Saunders Co.
- 10.- Bowman, T.E., P.E., Carson, H. Frischer, M., Kahn & Ajmar, F.A. A capillary tube, Nile blue methemoglobin reduction test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc. 10 th. Congr. Int. Soc. Blood Trans.*, Stockholm, 592, 1965.
- 11.- Brown, A.K. & Cevil, N. Hemolysis and Jaundice in the Newborn following maternal Treatment with sulfamethoxypridazine (Kynex). *Pediatrics*, 36:742, 1965.
- 12.- Capps, F.P. Gilles, H.M., Jolly, H. & Worlledge, S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Nigeria. *Lancet* 379, 1963.
- 13.- Carson, P.E., Flanagan, C.L. Ickes, C.D. & Alving, A.S. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*, 124:484, 1956.
- 14.- Carson, P.E. & Frischer, H. Glucose-6-dehydrogenase deficiency and related disorders of the pentose phosphate pathway. *Am. J. Med.*, 41: 744, 1966.
- 15.- Cassimos, C.H.R., Malaka-Zafiriou, K. & Tsiures, J. Urinary D-glucuric acid excretion in normal and G-6-PD deficient children with favism. *J. Pediatr.*, 84: 871, 1974.
- 16.- Castro, G.A.M. & Snyder, L.M. G6PD San José: A New Variant. Characterized by NADPH inhibition Studies. *Humangenetik* 21:361, 1974.
- 17.- Dern, R.J., Weinstein, J.M., Leroy, G.V. Talmage, D.W., & Alving, A.S. I. The localization of the drug-induced hemolytic defect in primaquine sensitive individuals. *J. Lab. Clin. Med.*, 43:303, 1954.
- 18.- Dern, R.J., Beutler, E. & Alving, A.S. The hemolytic effect of primaquine. II. The natural course of the hemolytic anemia and the mechanisms of its self-limited character. *J. Lab. Clin. Med.*, 45:30, 1955.
- 19.- Doxiadis, S.A., P.H. Fessas, Valaes, T. & Mastrakalos, N. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. A new aetiological

- factor of severe neonatal jaundice. *Lancet*, 1: 297, 1961.
- 20.- Edgell, E.J.S., Kirkman, H.N., Clemons, E., et al. Prenatal diagnosis by linkage: hemophilia A and polymorphic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J. Hum. Genet.*, 30: 80, 1978.
 - 21.- Elizondo, J., Sáenz, G.F. Estrada, M., et al. Una nueva variante de G6FD en un caucásico costarricense: Gd Costa Rica (en desarrollo).
 - 22.- Fessas, P., Doxiadis, S.A. & Valaes, T. Neonatal jaundice in glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient infants. *Brit. Med. J.*, 2: 1359, 1962.
 - 23.- Flatz, G., Sringam, S., Premyothin, C., Penbarkul, S., Ketusingh, R. & Chulajata, R. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase. Deficiency and neonatal Jaundice. *Arch. Dis. Child.*, 38:566, 1963.
 - 24.- Freir, S., Mayer, K., Levence, C. & Abrahamov, A. Neonatal Jaundice associated with familial G6PD deficiency in Israel. *Arch. Dis. Child.*, 40:280, 1965.
 - 25.- Gulati, P.D. & Rizvi, S.N.A. Acute reversible renal failure in G-6-PD deficient sibilings. *Post. Med. J.*, 52:85, 1976.
 - 26.- Jacob, H.S. & Jandl, J.H. A simple visual screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, employing ascorbate and cyanide. *New Eng. J. Med.*, 274:1162, 1966.
 - 27.- Keller, D.F. G-6-PD Deficiency. The Chemical Rubber Co., Butterworths, 1971.
 - 28.- Lu, T.C., Wei, H. & Blackwell, Q. Increased incidence of severe hyperbilirubinemia among newborn chinese infants with G-6-PD deficiency. *Pediatrics*, 37:994, 1966.
 - 29.- Luzzatto, L. Estados hemolíticos hereditarios: Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Cap. 5, 83-109 p. En: *Clínica Hematológica (Anemias Hemolíticas)* 3/1. Salvat Ed., S.A.
 - 30.- Luzzatto, L. & Testa, U. Human Erythrocyte Glucose-6-Phosphate dehydrogenase. Structure and function in normal and mutant subjects. In: *Current topics in Hematology*, 1:1-70, 1978, Alan R. Liss, Inc., N.Y.
 - 31.- Meloni, T., Cagnazzo, G., Dore, A. & Cutillo, S. Phenobarbital for prevention of hyperbilirubinaemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient newborn infants. *J. Pediatrics*, 82: 1048, 1973.
 - 32.- Mengel, C.E., Metz, E. & Yancey, W.S. Anemia during acute infections. *Arch. Int. Med.*, 119: 287, 1967.
 - 33.- Mentzer, W.C. & Collier, E. Hydrops fetalis associated with erythrocyte G-6-PD deficiency and maternal infestation of fava beans and ascorbic acid. *J. Pediatrics*, 86:565, 1975.
 - 34.- OMS: Normalización de las técnicas de estudio de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. OMS. *Serv. Inf. Técn.*, No.366, 1967.
 - 35.- OMS: Tratamiento de las hemoglobinopatías y de los trastornos afines. OMS, *Serv. Inf. Técn.*, No.509, 1972.
 - 36.- Perkins, R.P. Hydrops fetalis and stillbirth in a male glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient fetus possibly due to maternal ingestion of sulfoxasole. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 111:379, 1971.
 - 37.- Phillips, S.M. & Silvers, N.P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, infections hepatitis, acute hemolysis and renal failure. *Ann. Intern. Med.* 70:99, 1969.
 - 38.- Sáenz, G.F., Brilla, E., Arroyo, G., Valenciano, E. & Jiménez, J. Deficiencia de la glucosa-6-fosfato (G6PD) eritrocítica en Costa Rica. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños*, 6:129, 1971.
 - 39.- Sáenz, G.F. (datos sin publicarse).
 - 40.- Sáenz, G.F., Elizondo, J., Arroyo, G., et al. Hemoglobinopatías en 12.000 escolares. *Acta Med. Cost.*, 23:89, 1980.
 - 41.- Sass, M.D. & Caruso, C.J. A simple and rapid dye test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency for routine use. *J. Lab. Clin. Med.* 76:523, 1980.
 - 42.- Trager, W. Studies on Conditions affecting the survival in vitro of a Malarial parasite (*Plasmodium lophurae*). *J. Exp. Med.* 74: 441, 1941.
 - 43.- UCLA Conference. Human Gene Mapping, Genetic Linkage and Clinical applications (R.S. Sparkes, moderator). *Ann. Int. Med.*, 93:469, 1980.
 - 44.- Valaes, T. Bilirubin and red cell metabolism in relation to neonatal Jaundice *Postgraduate Med. J.*, 45:86, 1969.
 - 45.- Wintrobe, M. *Clinical Hematology*. 7nd Edit. 779-788 pp. Lea & Febiger, Pha., 1974.

- 46.- Yoshida, A. & Lin, M. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Red Blood Cells From Hemolytic and Nonhemolytic variant subjects *Blood*, 41: 877, 1973.
- 47.- Yoshida, A., Beutler, E., & Motulsky, A.G. Human Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants, *Bull. World Health. Organ.*, 45: 243, 1971.
- 48.- Yoshida, A. Hemolytic anemia and G-6-PD deficiency. *Science*, 179: 532, 1973.