

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA ESCUELA "LUIS RAZETTI"
CÁTEDRA DE OBSTETRICIA

**ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGÉNITAS POR
DEFICIENCIAS DE ERITROENZIMAS
EN VENEZUELA**

**(5 TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PUBLICADOS EN LA
REVISTA HEMOS DE LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE
HEMATOLOGÍA CUYO AUTOR PRINCIPAL ES LA DRA.
AIXA MÜLLERDE SOYANO Y CORRESPONDE A SU LÍNEA
DE INVESTIGACIÓN)**

Dra. AIXA MÜLLER DE SOYANO

INDICE

1. Anemias e Ictericias por Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G-6-Pd) en Venezuela	3
2. Detección de Variantes Bioquímicas de Glucosa-6-Fosfato Dehidrogenasa (G-6-Pd) en Venezuela	37
3. Anemia Hemolítica por Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Dehidrogenasa G-6-Pd) asociada con clínica de Enfermedad Granulomatosa Crónica	55
4. Anemia Hemolítica por Deficiencia de Piruvato Quinasa en Venezuela	82
5. Anemia Hemolítica Congénita por Deficiencia de Hexoquinasa	106

**ANEMIAS E ICTERICIAS POR DEFICIENCIA
DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
(G-6-PD) EN VENEZUELA**

ANEMIAS E ICTERICIAS POR DEFICIENCIA DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G-6-PD) EN VENEZUELA

Aixa Müller, Andrés Soyano, Gisela Méndez, Benita Ponte, Rosa Somoza, Irene Tamí, A. E. Soyano M.

Instituto de Oncología y Hematología, M.S.D.S-U.C. V, y Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas

RESUMEN

La deficiencia de la glucosa-6-josjato deshidrogenasa es una de las causas de anemias hemolíticas congénitas y se encuentra distribuida a nivel mundial.

El objeto de este trabajo es presentar el estudio clínico, bioquímico realizado a 251 pacientes con deficiencia de G-6-PD.

Se estudiaron 2069 pacientes con anemia hemolítica congénita. Los métodos empleados fueron: historia clínica, hematologías, electroforesis de Hb, cuantificación de la Hb A2 y Fetal, curva de fragilidad globular en fresco e incubada, determinación de los niveles de las enzimas de las vías glicolíticas y hexosa monofosfato y la movilidad electroforética), Se diagnosticaron 287 eritroenzimopatías. De estas 251 correspondieron a deficiencia de G-6-PD. Los pacientes deficientes fueron clasificados en 133 hemicigotos y 118 heterocigotos. El nivel intraeritrocítico de G-6-PD de los hemicigotos osciló 0-60% del valor normal y el de los heterocigotos desde menos de 10% hasta niveles normales.

El patrón de herencia en 155 familias deficientes de G-6-PD fue a través del cromosoma X.

Los pacientes hemicigotos se caracterizaron por ser asintomáticos y tener valor de Hb, Hto, contaje de reticulocitos, y niveles de bilirrubina sérica normales. Estos pacientes presentaron hemólisis cuando se expusieron a drogas oxidantes (sulfas, cloroquina, aspirina, acetofenetidina, fenildimetilpirazolona y difenil-piperidina-etil-acetamida (Baralcina), clorofeniramida, naftalina, etc.), durante períodos de infecciones, o al ingerir habas. Durante las crisis hemolíticas la Hb llegó a caer a niveles de 1,95g%, el Hto a 9% y los reticulocitos ascendieron a 22%.

Los motivos de consulta de los propósitos fueron: anemia hemolíticas por drogas oxidantes: 36,74%, %, ictericia neonatal: 30,72, anemias anemia hemolítica por infección: 6,02% etc.

La ictericia neonatal se presentó en el 80% de los casos durante el 2º y el 3er. día de vida. La mayoría de los neonatos presentaron más ictericia que anemia, ameritando fototerapia el 50% de ellos y exanguinotransfusión el 30% de ellos.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) es la enzima que cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato a 6-P-gluconolactona, al mismo tiempo que reduce el NADP a NADPH. Los pacientes con deficiencia hereditaria de esta enzima suelen presentar crisis hemolíticas cuando se exponen a drogas oxidantes, infecciones, acidosis o ingieren habas (1-4).

La deficiencia de G-6-PD se encuentra distribuida en todo el mundo siendo la más frecuente deficiencia eritroenzimática asociada con anemia hemolítica. Su incidencia varía de acuerdo a la población estudiada, pero se ha estimado que 400 millones de personas están afectadas (5, 6).

En Venezuela muy pocos autores se han dedicado al estudio de este tipo de anemia hemolítica; Boada (7) fue el primero que reportó la presencia de deficiencia de G-6-PD en nuestro país, encontrando en Barquisimeto un 6% de deficientes. Posteriormente, Acquatella (8) encontró un 2% de deficientes en donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Caracas y su ausencia en indios paraujanos y maquiritaes. Por su parte, Müller (9) encontró una frecuencia de 10% en la población negroide de Tapipa (Edo. Miranda) y su ausencia en indios Yanomamis y Waraos.

Más de 370 variantes de G-6-PD han sido descritas y se han denominado de acuerdo a sus propiedades electroforéticas o se le ha asignado nombres propios de acuerdo a la región en que han sido detectadas (10).

El objeto de este trabajo es presentar el estudio hematológico y bioquímico realizado a 251 pacientes con deficiencia de G-6-PD detectados entre 2069 pacientes estudiados.

MATERIALES

Se estudiaron 2069 pacientes con diagnóstico de anemia hemolítica, referidos al Instituto de Oncología y Hematología del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (M.S.D.S-UCV.) para dilucidar etiología de la hemólisis y que provenían del Dto Federal, Edo Miranda, Edo Aragua

MÉTODOS

1. Historia clínica.
2. Rutina hematológica, recuento de reticulocitos, concentración sérica total y fraccionada de bilirrubina.
3. Curva de fragilidad globular en fresco e incubada.
4. Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa Gelman, realizadas en cámara
5. Cuantificación de la hemoglobina A2, aislada por cromatografía usando columnas de Sephadex de intercambio aniónico (Lab. Helena), según la técnica de Bernini (12).
6. Cuantificación de la hemoglobina fetal por inmunodifusión usando geles con anticuerpos anti-hemoglobina fetal (Lab. Helena).
7. Cuantificación de la concentración intraeritrocítica de enzimas de los ciclos glicolítico y de la hexosa monofosfato por espectrofotometría usando un espectrofotómetro Gilford con registrador (13).

SEPARACIÓN DE ERITROCITOS SANGUÍNEOS PARA ESTUDIO DE ENZIMAS

Sangre proveniente de pacientes con anemia hemolítica y de sus familiares, y de donantes de Banco de Sangre, que sirvieron como controles, fue recolectada en tubos de ensayo con EDTA. Los eritrocitos fueron separados mediante columnas de celulosa y Sigmagel y luego hemolisados en una solución de agua con beta-mercaptoetanol. En estos hemolisados recién obtenidos se realizó la cuantificación enzimática (14, 15). Se cuantificaron las siguientes enzimas de la vía de la hexosa monofosfato: 1. glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 2. 6-fosfoglucosa deshidrogenasa, y 3. Glutación reductasa, y las siguientes enzimas de la vía glicolítica: 1. hexoquinasa, 2. glucosa-fosfato-isomerasa, 3. gliceraldehido-fosfato-deshidrogenasa, 4. fosfogliceroquinasa, 5. difosfogliceromutasa, 6. monofosfogliceromutasa, 7. enolasa, 8. Piruvatoquinasa y 9. deshidrogenasa láctica

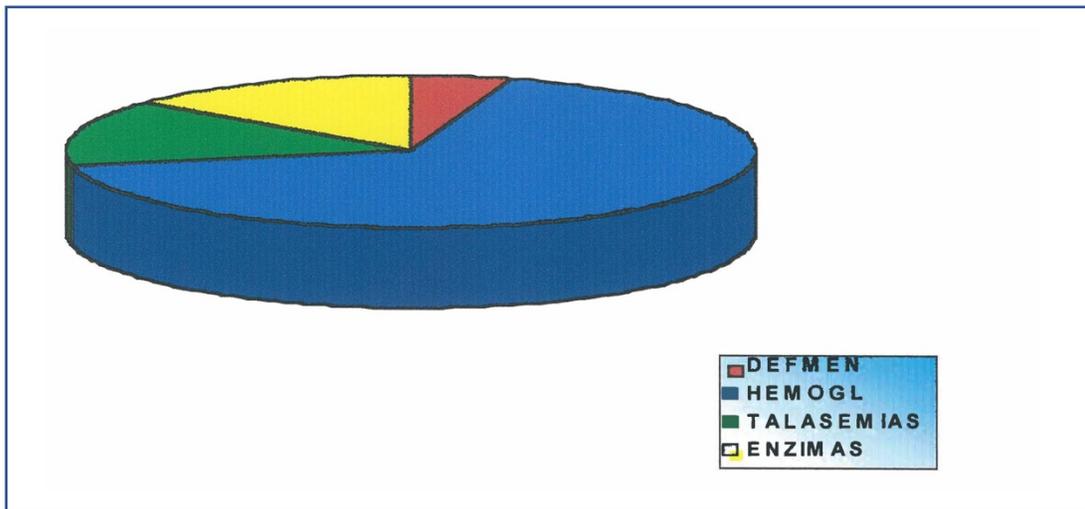
RESULTADOS

ETIOLOGÍA DE LA HEMÓLISIS DE 2.069 PACIENTES

El estudio clínico, hematológico y bioquímico de 2.069 pacientes con anemias hemolíticas congénitas permitió establecer los siguientes diagnósticos:

1. Defectos de la membrana del eritrocito (anemia hemolítica por esferocitosis congénita, anemia hemolítica por ovalocitosis congénita): 100 pacientes.
2. Defectos estructurales de la hemoglobina (anemias hemolíticas congénitas por drepanocitosis, hemoglobinas "C", hemoglobinas de migración electroforética rápida, combinaciones de hemoglobinopatías, etc.): 1.386 pacientes.
3. Defectos en la síntesis de las cadenas de globina (anemias hemolíticas por talasemias): 296 pacientes.
4. Deficiencias de eritroenzimas: 287 pacientes [Fig. 1].

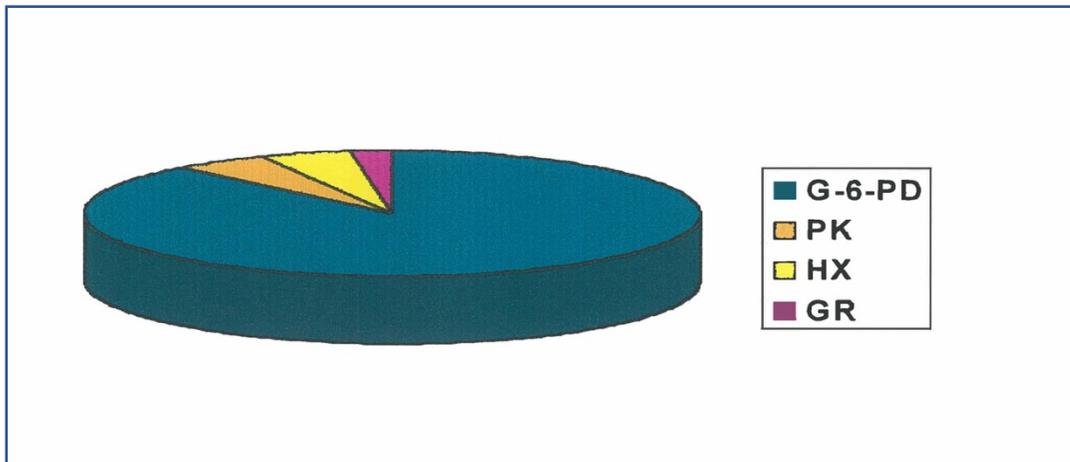
FIGURA 1
ETIOLOGÍA DE LA HEMOLISIS EN
2069 PACIENTES CON ANEMIA



INCIDENCIA DE LA DEFICIENCIA DE G-6P-D EN 2069 PACIENTES Y FAMILIARES

En 2069 pacientes y familiares referidos al Instituto de Oncología y Hematología con sospecha de anemia hemolítica congénita no autoinmune se detectaron 287 individuos con deficiencia de eritroenzimas de la vía glicolítica y de la vía de la hexosa monofosfato. De estos 287 individuos, 251 entre propósitos y familiares presentaron deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Fig.2).

FIGURA 2
CLASIFICACIÓN DE 287 PACIENTES
DEFICIENTES DE ERITROENZIMAS.



CLASIFICACIÓN DE LOS DEFICIENTES DE G-6-PD SEGÚN LA CONCENTRACIÓN INTRAERITROCÍTICA DE LA ENZIMA

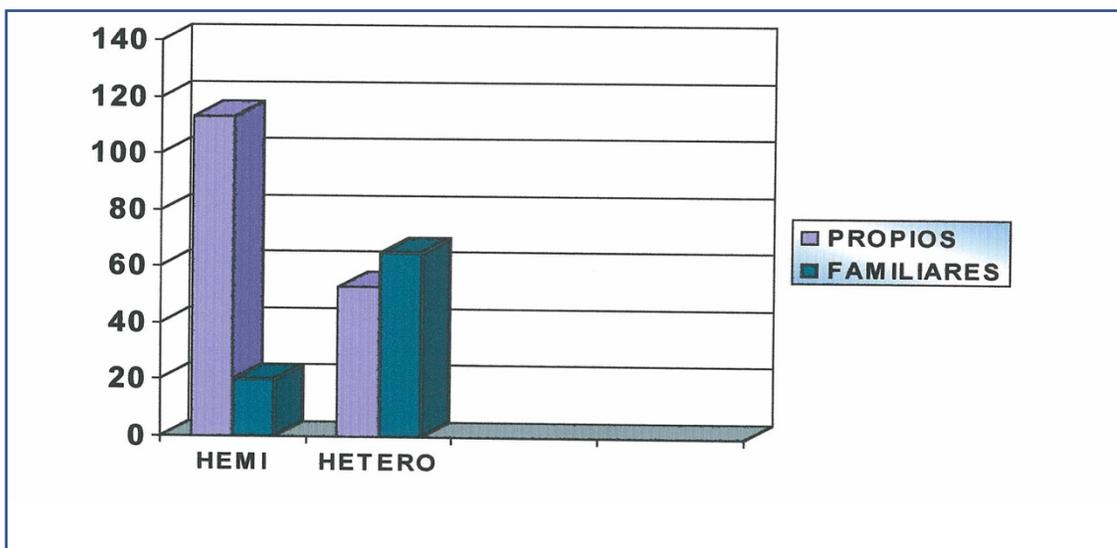
La cuantificación de la concentración intraeritrocítica de la G-6P-D residual permitió clasificar los pacientes y familiares, provenientes de 155 familias, en:

deficientes hemicigotos (varones): 133 individuos

deficientes heterocigotos (mujeres): 118 individuos

De los 133 individuos hemicigotos, 113 eran propósitos y 20 eran familiares. De los 118 heterocigotos, sólo 53 eran propósitos y el resto (65) eran familiares de los propósitos hemicigoto o heterocigotos (Fig. 3).

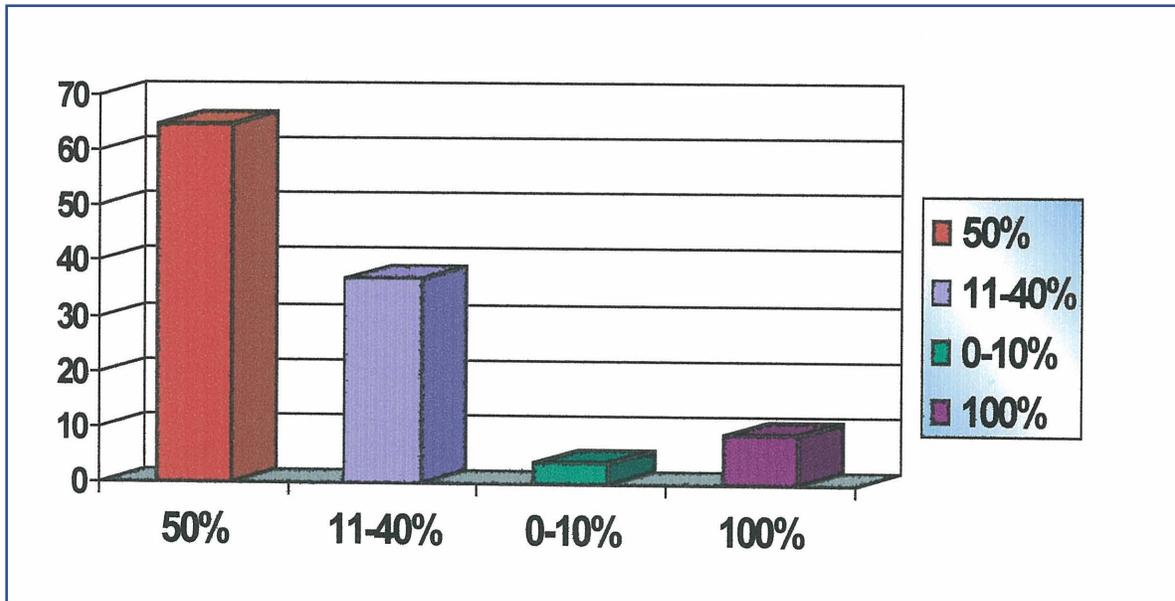
FIGURA 3
CLASIFICACIÓN DE 251 DEFICIENCIA EN G-6-PD



Se detectaron en 4 familias, que tanto la madre como el padre eran deficientes en G-6-PD. Estas parejas tuvieron hijas heterocigotas e hijos hemicigotos. No se encontró hijas homocigotas para la deficiencia de G-6-PD.

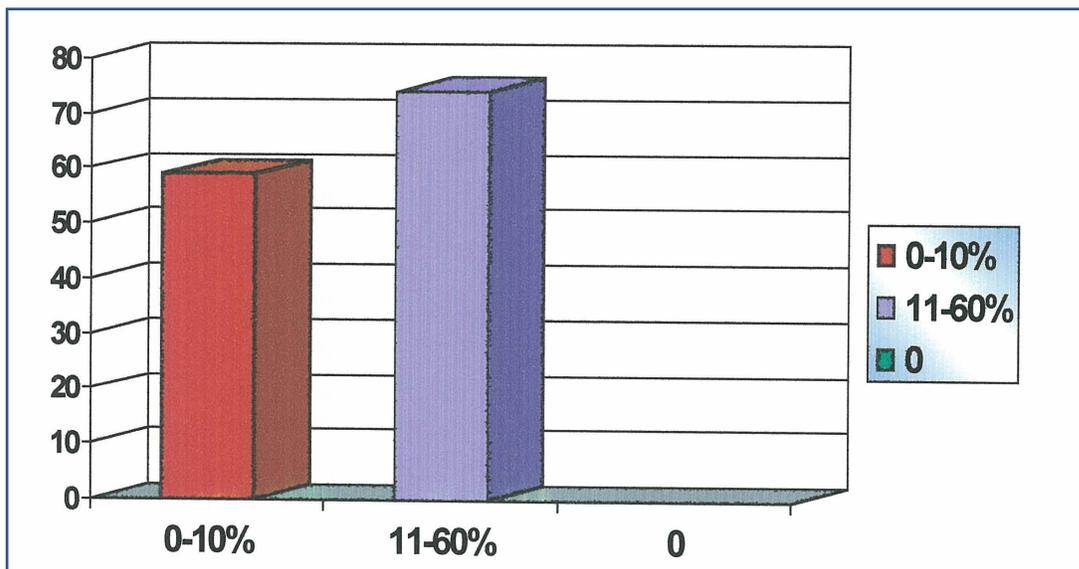
La concentración intraeritrocítica de G-6-PD varió ampliamente en las 118 mujeres heterocigotas estudiadas, desde valores normales hasta valores disminuidos, por debajo del 40%, como si fuesen varones hemicigotos. Así tenemos que, aunque la mayoría presentó valores de G-6-PD intraeritrocítica intermedios (alrededor del 50%), hubo 37 mujeres heterocigotas que presentaron valores entre 11-40% de la actividad normal, 3 presentaron valores menores del 10% y por último 9 de estas mujeres (7 madres de propósito) presentaron valores normales (Fig. 4).

FIGURA 4
VALORES DE G-6-PD EN HETEROCIGOTOS



Los individuos hemicigotos se caracterizaron por presentar valores de G-6-PD intraeritrocítica variables entre cero y 60%. Se detectaron 59 hemicigotos con valores menores del 10% y 74 individuos hemicigotos con valores entre 10-60% (Fig. 5).

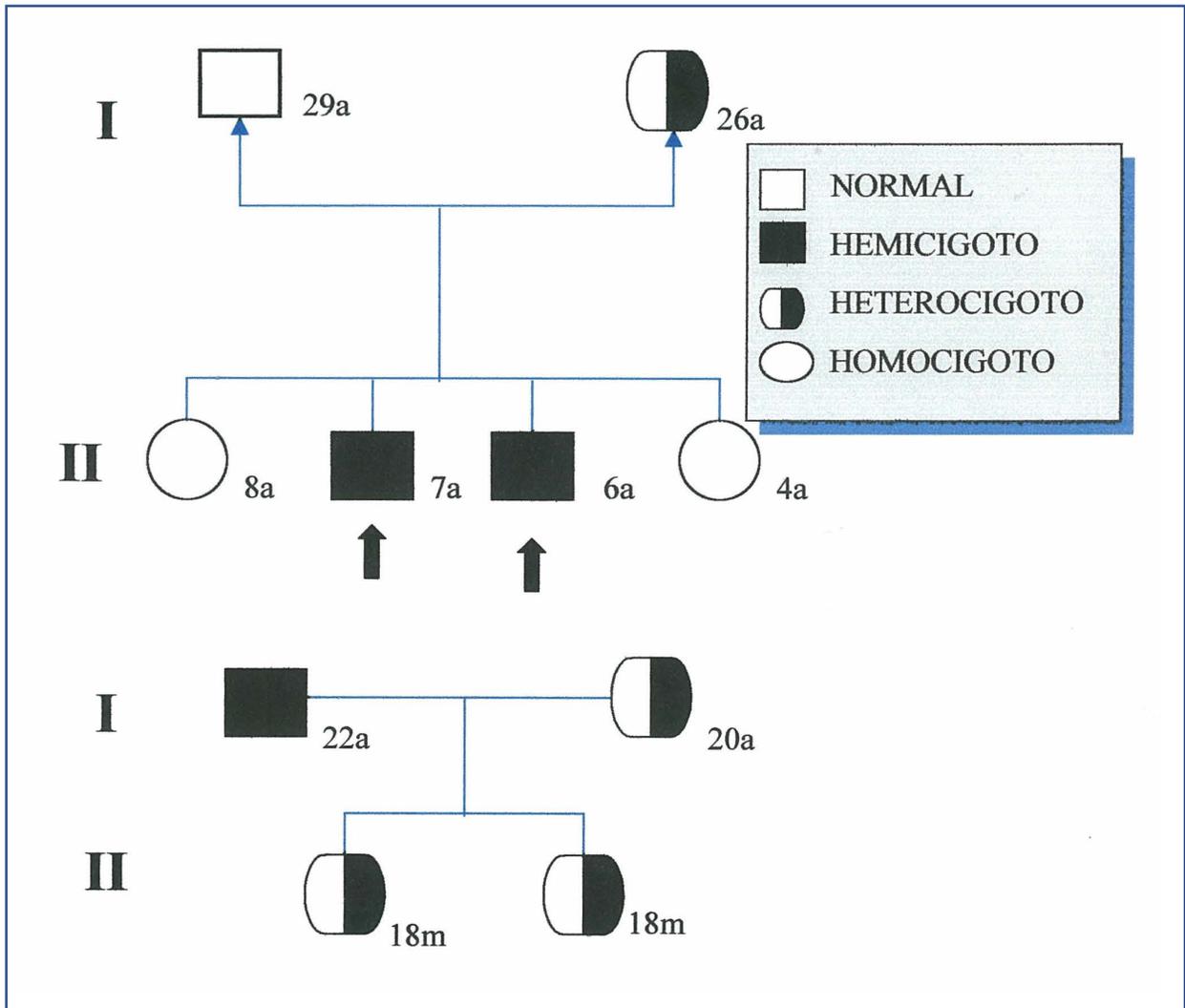
FIGURA 5
VALORES DE G-6-PD HEMIGOTOS



PATRONES DE HERENCIA DE LA DEFICIENCIA DE G-6-PD

En las 155 familias estudiadas el gen para la deficiencia de G-6-PD se heredó a través del cromosoma X. El padre, en esos casos, siempre presentó valores de G-6-PD intraeritrocítica normales. En sólo cuatro familias encontramos que tanto el padre como la madre tenían valores de G-6-PD compatibles con la deficiencia (Fig. 6).

FIGURA 6
PATRONES DE HERENCIA DE 251 PACIENTES
VENEZOLANOS DEFICIENTES EN G-6-PD



MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA DEFICIENCIA DE G-6 PD

El 36,74% de los pacientes consultó por síntomas de anemia hemolítica inducida por ingestión de drogas oxidantes (Tabla 1). Es de hacer notar que todos los pacientes ingirieron la droga excepto un paciente que inhaló naftalina y otro que se aplicó la droga en la piel. La severidad de la hemólisis no guardó relación con el tipo de droga oxidante.

TABLA I
MOTIVO DE CONSULTA DE 166 PACIENTES
PROPOSITOS DEFICIENTES EN G-6-PD.

Nº Pacientes	CLÍNICA	PORCENTAJE
61	ANEMIA HEMOLÍTICA POR DROGAS OXIDANTES	36,76
51	ICTERICIA NEONATAL	30,72
10	ANEMIA HEMOLÍTICA INDUCIDA POR INFECCIONES	6,02
10	HIPERBILIRRUBINEMIA	6,02
7	DONANTES DE SANGRE	4,21
4	ANEMIA HEMOLÍTICA INDUCIDA POR DROGAS OXIDANTES MAS INFECCIÓN	2,40
4	ANEMIA HEMOLÍTICA CRÓNICA	2,40
4	FAVISMO	2,40
2	DESPISTAJE DE DEFICIENCIA DE 6-G-PD	1,2
1	ASOCIADA A DREPANOCITOSIS	0,60
1	ASOCIADA A DREPANOCITOSIS	0,60
1	ASOCIADA A ESFEROCITOSIS CONGÉNITA	0,60

Las drogas ingeridas fueron: sulfas administradas para el tratamiento de infecciones urinarias, cloroquina administrada como profilaxis de la malaria, acetofenitidina, aspirina, dipirona como analgésico o antipirético, azul de metileno, vitamina C, fenildimetilpirazolona y difenil-piperidino-etil-acetamida (Baralcina®), clorofeninamina y salicilato de sodio (Coricidin®), diclorhidrato de N (dimetilamino etil) 2 metoxi-4-amino- 5-clorobenzamida (Primperán®), clorhidrato de ceclizina y piridoxina (Bonadoxina®) y nistatina.

La dosis medicamentosa que causó la hemólisis varió en cada paciente; en algunos fue la dosis estándar, mientras que en otros fue supraestándar. Dependiendo de la severidad de la reducción de la Hb y Hto se administró transfusión de concentrado globular.

Las crisis hemolíticas no guardaron relación con la edad del paciente, presentándose tanto en lactantes como en niños mayores y adultos. Las drogas oxidantes precipitaron la crisis hemolítica en 7 pacientes heterocigotas para la deficiencia de G-6P-D y la ingestión de habas en una de ellas. Las drogas oxidantes que precipitaron las crisis hemolíticas en las heterocigotas fueron: Difenilpiperidino etil-acetarnida (Baralcina) (1 paciente), Naftalina (1 paciente), Keforal (1 paciente), Aspirina (1 paciente), Furoxona (1 paciente), Nistatina + Mezclizina + Piridoxina + Metocloropramida (1 paciente), Sulfa (1 paciente).

Tres pacientes heterocigotas que presentaron crisis hemolítica fueron transfundidas con concentrado globular. Una de estas pacientes había inhalado naftalina, otra había recibido dosis elevadas de Baralcina para dolores cólicos por litiasis vesicular, y la tercera dosis elevadas de furoxona por infección urinaria.

Una niña de 4 años recibió sulfa en dos oportunidades; presentó crisis hemolítica acompañada de hematuria en ambas oportunidades, con reducción de la Hb hasta 8 g/dl. La segunda causa de consulta fue ictericia neonatal con aumento de la concentración sérica de bilirrubina indirecta en el 30,72% de los casos (Tabla I). Se estudiaron 51 neonatos deficientes en G-6P-D: de 41 neonatos hemicigotas, 19 ameritaron fototerapia, 9 exanguinotransfusión y 13 sólo observación. De los 10 neonatos heterocigotas, 9 ameritaron fototerapia y 1 exanguinotransfusión.

El tiempo de aparición de la ictericia varió, siendo en el 80% de los casos durante el segundo o tercer día del nacimiento y el resto de aparición más tardía. No se detectó ictericia neonatal en los propósitos deficientes en G-6-PD en las primeras 24 horas de vida. En todos estos casos se descartó como causa de la ictericia anemia hemolítica por incompatibilidad del grupo ABO o del sistema Rh u otras deficiencias de enzimas intraeritrocíticas de los ciclos glicolítico y de la vía de la hexosa monofosfato. La mayoría de los neonatos presentaron un mayor grado de ictericia que de anemia.

La tercera causa de consulta fue ictericia sin anemia por aumento de la concentración sérica de bilirrubina indirecta (Tabla I). La mayoría de estos pacientes fueron detectados en exámenes de controles de rutina o durante exploraciones por otra patología. Estos pacientes presentan los niveles de Hb y Hto dentro de límites normales.

La infección, particularmente de tipo bacteriano o viral, actuó como precipitante de la crisis hemolítica en el 6,02% de los pacientes (Tabla I).

Se estudiaron 3 pacientes con favismo (Tabla I).

Se detectó un paciente con anemia hemolítica congénita por drepanocitosis y otro con anemia hemolítica congénita por esferocitosis asociados a la deficiencia de G-6-PD. Se estudiaron 4 pacientes con anemia hemolítica crónica congénita secundaria a deficiencia solamente de G-6-PD. Este grupo de pacientes lo describiremos en detalle más adelante. Dos (2) pacientes infectados con *M. leprae* que iban a recibir tratamiento con drogas oxidantes resultaron ser deficientes en G-6-PD.

Es de hacer notar que estos pacientes deficientes en G-6-PD fuera de las crisis hemolíticas son completamente asintomáticos. Tras haber ingerido la droga oxidante comenzaron a presentar (aprox. a las 24 horas) malestar general, cefalea, dolor lumbar y coluria; en otros casos una infección viral o bacteriana precipitó la crisis hemolítica, acudiendo a la consulta en promedio 3-5 días tras haber comenzado los síntomas. A veces se hizo difícil precisar si el desencadenante de la hemólisis fue la infección o la droga utilizada para combatirla, o ambos.

Entre los donantes de sangre utilizados como controles aparentemente sanos encontramos 9 individuos deficientes en G-6-PD, tanto homocigotos como heterocigotos (Tabla I).

HALLAZGOS DE LABORATORIO

1. Fuera de crisis hemolíticas

Los pacientes varones hemocigotos tanto niños como adultos en línea general fuera de crisis presentaron valores de Hb y Hto en el rango normal para su edad. El frotis de sangre periférica mostró en todos los pacientes eritrocitos morfológicamente normales, con sólo un discreto aumento de los reticulocitos (Tabla II).

TABLA II
VALORES HEMATOLÓGICOS EN PACIENTES HEMOCIGOTOS
DEFICIENTES EN G-6-PD

No.	EDAD	Hb (g%)	Hto (o/o)	RETICULOCITOS (%)
3	1-3 MESES	11	38	2
	Valores normales	11,5±2,5	35±7	0-1
3	4-6 MESES	11,2±0,7	36,3±1,7	2,4±0,6
	Valores normales	11,5±2,0	35,0±6,0	0-1
7	7m-2 años	11,4±0,9	36,6±2,3	2,0±0,7
	Valores normales	12,0±1,5	36,0±3,0	0,5-1,5
8	3-6 años	11,7±0,8	37,5±1,6	1,8±1,8
	Valores normales	12,5±1,0	34,0±3,0	0,5-1,5
5	7-12 años	12,3±0,71	38,0±2,3	3,9±2,7
	Valores normales	13,5±2,0	40,0±5,0	0,5-1,5
18	13-18 años	13,3±1,1	39,0±3,1	1,9±1,2
	Valores normales	14,0±2,0	41,0±5,0	0,5-1,5

La curva de fragilidad osmótica eritrocitaria fue normal, tanto en fresco como incubada.

Las pacientes heterocigotas también presentaron concentraciones de Hb y Hto normales para su edad (Tabla III).

TABLA III
VALORES HEMATOLÓGICOS EN PACIENTES
HETEROCIGOTOS DEFICIENTES EN G-6-PD

No.	EDAD	Hb (go/o)	Hto (o/o)	RETICULOCITOS (o/o)
1	0-3 MESES	9,8	32,5	8
	Valores normales	11,5±2,5	35±7	0-1
2	4-6 MESES	10,5	34,0	0-1
	Valores normales	11,5±2	35,0±6	
2	7-23 MESES	9,7±0,6	33,7±2,3	4,9±0,91
	Valores normales	12,0±1,5	36,0±3,0	0,5-1,5
4	2-6 años	12,5±0,7	40,4±1,7	1,2±1,0
	Valores normales	12,5±1,0	34,0±3,0	0,5-1,5
2	7-12 años	12,0±2,0	37,5±1,8	1,0±0,5
	Valores normales	13,5±2,0	40,0±5,0	0,5-1,5
20	>13 años	12,0±2,0	39,0±3,1	1,9±1,2
	Valores normales	14,0±2,0	41,0±5,0	0,5-1,5

II. Durante períodos de crisis hemolítica

En los pacientes varones hemocigotos los valores de Hb y Hto disminuyeron durante la crisis hemolítica desde valores normales hasta 1,95 g/dl y 9%, respectivamente, y los reticulocitos aumentaron en algunos casos hasta 22%. La severidad del cambio varió según el paciente (Tablas IV y V).

TABLA IV
VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE
Y FUERA DE CRISIS HEMOLÍTICA EN ADULTOS
HEMICIGOTOS DEFICIENTES EN G-6-PD

PACIENTES	EDAD (años)	Hb (go/o)	Hto (o/o)	RETI. (%)	BT (mg%)	DI
CAR(1)	31	12,6	41,9	4,1	1,0	0,9
CAR (2)*		6,2	20,0	20,0	8,4	7,0
CB (1)	26	12,2	39,0	1,5	0,5	0,3
CB (2)*		4,6	15,0	22,0	10,0	8,9
ART (1)	23	13,0	42,0	1,5	1,0	0,9
ART(2)*		5,0	20,0	26,0	21,0	19,0
J.B. (1)	18	13,0	40,5	4,2	1,2	0,8
J.B. (2)		8,7	29,0	15,0	15,0	12,0

TABLA V
VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE
Y FUERA DE CRISIS HEMOLÍTICA EN NIÑOS
HEMICIGOTOS DEFICIENTES EN G-6-PD

PACIENTES	EDAD (meses)	Hb (go/o)	Hto (o/o)	RETI. (o/o)	BT (mgo/o)	BI
P.J. (1)	1	12	41	2	1	0,5
P.J. (2)*		7,5	29	22	17,0	14,0
D.P. (1)	3	11,8	38	3		
D.P. (2)*		9,1	28,5	10		
D.F. (1)	4	19,0	50	2,0	1,3	0,7
D.F. (2)*		6,0	23	26,0		
A.H. (1)	14	11,3	38	1,0	1,5	0,8
A.B. (2)		4,0	12	15,0	15,0	13,0
G.J. (1)	18	9,0	32	2,0	1,0	0,6
G.J.(2)*		4,0	13	17,0	22,0	20,0
J.C.. (1)	24	10,6	34,0	1,0	1,2	0,6
J.C.. (2)		1,95	9,1	30,1	6,9	5,8
A.F. (1)	42	12,3	39,0	1,2		
A.F. (2)*		5,5	17,0	5,5		
I.R.. (1)	42	13,0	40,0	1,1		
I.R.. (2)		8,3	25,0	5,0		
J.P. (1)	6 años	13,3	39,7	1.0		
		10,6	30,0	9.3		

La curva de fragilidad osmótica de los eritrocitos en fresco fue normal pero la incubada mostró un discreto aumento de la fragilidad osmótica, lo cual pudo correlacionarse con el aumento de la cantidad de esferocitos, pero muy diferente del patrón que se observa en la anemia hemolítica por esferocitosis hereditaria.

Estudiamos tres pacientes heterocigotas, en quienes los valores de Hb y Hto se redujeron hasta valores de 4,6 g/dl y 15%, respectivamente, con reticulocitosis de 18%, después de la ingestión o administración de drogas oxidantes (Tabla VI).

TABLA VI
VALORES HEMATOLÓGICOS DE PACIENTES HETEROCIGOTAS
PARA LA DEFICIENCIA DE G-6-PD DURANTE
Y FUERA DE CRISIS HEMOLÍTICAS

PACIENTES	EDAD (meses)	Hb (g%)	Hto (o/o)	RETICULOCITOS (o/o)
B.C. (1)	26	12,2	39,0	1,5
B.C. (2)*		4,6	15,0	18,0
M.R. (1)	6	13,0	40,0	1,2
M.R. (2)*		8,3	26,5	8,0
N.T. (1)	5	13,0	42,0	0,4
N.T. (2)*		7,2	23,0	22,0

ANEMIA HEMOLÍTICA CRÓNICA PRODUCIDA POR DEFICIENCIA DE G-6-PD

Detectamos anemia hemolítica congénita no esferocítica en 4 pacientes masculinos deficientes en G-6-PD no asociada a otras patologías, es decir, atribuible solamente a la deficiencia de G-6-PD. Estos pacientes presentaron antecedentes de ictericia neonatal que requirió exanguinotransfusión e ictericia crónica permanente con esplenomegalia, lo cual nos indica que padecían un proceso hemolítico permanente o crónico. Además, presentaban crisis hemolíticas agudas, acompañadas de coluria y precipitadas por la ingestión de medicamentos oxidantes o infecciones. Los 4 pacientes estudiados provienen de 3 familias venezolanas (dos de ellos son hermanos); sin embargo, nos llamó la atención que los 4 pacientes presentaban sintomatologías muy similares. Con el transcurso de los años a estos pacientes les aumentó la ictericia y su esplenomegalia se acentuó con aparición de hepatomegalia. Un caso típico es el siguiente paciente, seguido en consultas clínicas desde los 6 hasta los 25 años.

PACIENTE

JGP

MOTIVO DE CONSULTA

Paciente masculino de 6 años de edad quien consultó por anemia e ictericia.

ANTECEDENTES PERSONALES

Ictericia neonatal que se presentó a los tres días de nacido. Requirió exanguinotransfusión y fototerapia. Durante su estadía de dos meses en el retén de neonatología presentó como complicaciones meningitis, diarrea y convulsiones. A los 7 meses de edad presentó neumonía con derrame pleural. A los cuatro años de edad presenta síndrome febril con ictericia y coluria.

EXAMEN FÍSICO

Preescolar de 6 años de edad, en buenas condiciones generales, pero con ictericia conjuntival. Abdomen blando, depresible, con polo esplénico palpable.

EXÁMENES DE LABORATORIO

Hematología: Hb: 10,6 g/dl, Hto 30%, reticulocitos: 4,6%, VCM: 90 fl, HCM: 29,1 pg, CHCM 32,3 g/dl. El frotis de sangre periférica mostró solo esferocitosis leve. Perfil químico completo incluyendo pruebas hepáticas normal, excepto por hiperbilirrubinemia de 2,1 mg/dl a expensas de la indirecta (1,8 mg/dl).

EVOLUCIÓN CLÍNICA

Este paciente se ha caracterizado por presentar una anemia hemolítica crónica, con ictericia permanente debido a aumento de bilirrubina indirecta, hepatoesplenomegalia y crisis hemolíticas frecuentes de leves a moderadas, con episodios de coluria de varios días de duración, que no amerita transfusión ni hospitalización. El paciente ha presentado aproximadamente 4 crisis hemolíticas anuales con reducción de Hb y Hto generalmente asociadas a infecciones virales, o administración de antipiréticos tipo dipirona. En cada crisis la Hb desciende 2 a 3,5 g/dl, el Hto de 2 a 4 puntos, mientras que los reticulocitos suben hasta 4% y la hiperbilirrubinemia alcanza valores de 5 mg/dl, a expensas de la bilirrubina indirecta. A los 13 años de edad presentó crisis dolorosas en hipocondrio derecho por litiasis vesicular, por lo cual fue colecistectomizado. Con el transcurso de los años, los episodios de coluria han aumentado en frecuencia, y desde hace 2 años son casi permanentes. El bazo ha aumentado de tamaño desde un polo esplénico a los 6 años hasta ser palpable a 8 cm del reborde costal izquierdo a los 25 años de edad. Así mismo, a pesar de que el Hto se ha mantenido alrededor de 36%, los reticulocitos han aumentado a 9% y la bilirrubina total a 6 mg/dl. El paciente no ha querido someterse a esplenectomía.

FAVISMO

Sólo 4 pacientes presentaron crisis hemolíticas tras haber ingerido habas frescas cocidas (Tabla 1). Dos fueron escolares varones, hermanos, de 4 y 6 años de edad, quienes aproximadamente 24 horas después de ingerir habas, comenzaron a presentar debilidad general, malestar, cefalea, náuseas, dolor lumbar y abdominal, ictericia y coluria. Ambos pacientes presentaron caída de Hb a 4 g/dl y el Hto a 15%, con reticulocitos de 15% y 18% respectivamente; ambos fueron tratados con concentrados globulares. Dos pacientes fueron

adultos, uno masculino y otro femenino, que presentaron la misma sintomatología tras la ingestión de habas y ameritaron administración de concentrado globular.

ASOCIACIÓN DE LA DEFICIENCIA DE G-6-PD CON OTROS TIPOS DE ANEMIA HEMOLÍTICA CONGÉNITA

Llama la atención en este estudio la detección de otros tipos de anemia hemolítica, tales como drepanocitosis-talasemia y esferocitosis hereditaria, asociada con deficiencia de G-6-PD. Estos pacientes presentaron clínicamente el cuadro hemolítico crónico que caracteriza su enfermedad, que se exacerbaba con la ingestión de drogas oxidantes o infecciones virales o bacterianas.

El paciente con drepanocitosis (PME) era una niña de 3 años de edad, quien consultó por anemia hemolítica acompañada de dolor articular. Sus valores hematológicos fueron Hb: 4,6 g/dl, Hto: 15%, reticulocitos: 50%. El perfil de laboratorio practicado para detectar hemoglobinopatías y talasemias mostró que se trataba de una Hb SS con aumento de la Hb fetal a 25% (VN 0,1-1%) y con normalidad de Hb A2: 2,55% (VN: 2,2-3,3%). Esta paciente presentó niveles de G-6-PD intraeritrocíticos compatibles con el estado de heterocigocidad para la deficiencia.

En 10,5% de los pacientes se encontró anemia microcítica hipocrómica, no explicable por la deficiencia de G-6-PD sino secundaria a disminución de la concentración sérica de hierro. Presentamos como ejemplo un paciente con deficiencia de hierro severa asociada a la deficiencia de G-6-PD. Se trató de un lactante de 19 meses con Hb de 7,2 g/dl, Hto de 29,2%, reticulocitos 0.9%, con índices globulares notablemente disminuidos: VCM de 64fl (VN: 80-90), CHCM de 24,8 g/dl (VN: 34 ± 2,2). El frotis sanguíneo de este paciente presentó hipocromía y microcitosis marcada con poiquilocitosis y anisocitosis moderada y presencia de escasos dianocitos y células en lágrima. El hierro sérico estuvo disminuido: 12 mcg/dl (VN: 35-130 mcg/dl) con un nivel de ferritina sérica de 3 ng/dl (VN: 10-140 ng/dl).

EMBARAZO Y DEFICIENCIA DE G-6-PD

Cuatro pacientes embarazadas deficientes heterocigotas para la G-6-PD, no presentaron ictericia y mostraron valores de Hb, Hto, recuento de reticulocitos y concentración de bilirrubina normales para su edad gestacional es decir sin anemia hemolítica. A todas ellas se les prohibió la ingestión de drogas oxidantes, alimentos con agentes oxidantes como habas y no tuvieron problema de crisis hemolítica durante su embarazo.

ESTUDIO ELECTROFORÉTICO DE LA G-6-PD INTRAERITOCÍTICA RESIDUAL EN 92 PROPÓSITOS DEFICIENTES.

El estudio electroforético de la G-6-PD residual, purificada en columnas de intercambio aniónico y realizado en membranas de acetato de celulosa, permitió en los donantes de sangre usados como controles y en los familiares de los pacientes propósitos detectar las variantes G-6-PD de migración normal "B" y la variante "A" que migra por delante de la G-6-PD "B" normal, la cual se considera una variante de la migración electroforética rápida.

El estudio electroforético arriba mencionado en pacientes hemicigotos y familiares deficientes en G-6-PD permitió detectar las variantes "A" en el 61,53% y la variante "B" en el 38,47%. El estudio electroforético de la G-6-PD en pacientes femeninas heterocigotas permitió detectar la variante "A" en el 8,3% de los casos, la variante "B" en el 37,53% y la variante "AB" en el 54,17% de los casos. La variante de G-6-PD "AB", representa combinación de la G-6-PD "B" y G-6-PD "A".

DISCUSIÓN

El estudio clínico, hematológico y bioquímico para detectar anemias hemolíticas congénitas practicadas a 2.069 pacientes con anemia congénita y sus familiares referidos al Instituto de Hematología y Oncología, durante los últimos 15 años permitió detectar las hemoglobinopatías como la primera etiología de las anemias hemolíticas en estos pacientes. La segunda causa etiológica fue la talasemia. Estos resultados están de acuerdo con hallazgos previos que han demostrado que en Venezuela las hemoglobinopatías y

talasemias constituyen las etiologías más frecuentes de las anemias hemolíticas congénitas [16].

La tercera etiología detectada fue la deficiencia de enzimas intraeritrocíticas de los ciclos de la hexosa monofosfato y glicolítico, constituyendo la deficiencia de G-6-PD, la causa principal de anemia hemolítica congénita en 251 pacientes. Aunque la deficiencia de G-6-PD tiene áreas de alta prevalencia en África y el Mediterráneo, se ha encontrado también en otros continentes, incluyendo América [17-23]. Es la deficiencia enzimática más frecuente en el ámbito mundial. Se calcula que hay cuatrocientos millones de individuos afectados por esta deficiencia [24,25].

Los indígenas venezolanos no presentan variantes deficientes de G-6-PD como ha sido previamente reportado en estudios poblacionales por Müller [9], por lo cual podemos deducir que estos 251 pacientes venezolanos heredaron el gen de la G-6-PD deficiente a través de sus ancestros caucásicos o africanos que migraron a Venezuela.

La incidencia de la deficiencia de G-6-PD en Venezuela varía entre 2 y 11,88% de acuerdo al grupo étnico estudiado, encontrándose 2% en donantes de sangre mestizos del Hospital Universitario de Caracas y del 11,88% en la población negroide de Tapipa, Edo. Miranda, que ha permanecido aislada por muchos años mezclándose muy escasamente con personas de otros grupos étnicos [9].

Los pacientes deficientes en la enzima fueron clasificados de acuerdo a sus niveles intraeritrocíticos de G-6-PD, encontrándose 133 hemicigotos y 118 heterocigotos [Fig. 3]. Llamó la atención que las mujeres heterocigotas para la deficiencia presentaron niveles de G-6-PD intraeritrocíticos que variaron desde muy disminuidos (niveles menores del 10%) hasta valores normales [Fig. 4]. Las 9 mujeres con valores de G-6-PD normales eran heterocigotas obligados, ya que eran las madres de pacientes varones hemicigotos para la deficiencia. Esta variación de los niveles de G-6-PD de los eritrocitos de las mujeres heterocigotas se explica por la teoría de Lyon (ímbalance de la lionización), según la cual, el cromosoma X se convierte en heterocromático y genéticamente inactivo durante el desarrollo embriogénico; como resultado un mosaico de actividad del cromosoma X ocurre en las mujeres, algunas

células transcriben genes derivados de la madre con niveles muy bajos de G-6-PD, por inactivación del cromosoma X y otras células genes derivadas del padre, con su cromosoma X activo, con niveles normales de G-6-PD [26]. Así, un grupo de eritrocitos tendrá muy baja actividad de G-6-PD, producto de la actividad genética del cromosoma X activo derivado de la madre, mientras que otros tendrán actividad normal producto de la acción del cromosoma X activo derivado del padre. Si predominan los eritrocitos con la enzima derivada de la madre tendremos mujeres heterocigotas con niveles muy bajos de G-6-PD, como los detectados en 3 mujeres heterocigotas de este estudio, y si predominan los eritrocitos con enzima de origen paterno con niveles normales de G-6-PD entonces tendremos mujeres heterocigotas con niveles intraeritrocíticos de la G-6-PD normales, como fue el caso en 9 de estas mujeres.

La primera demostración de mosaicismo eritrocitario fue realizada por Beutler y col. [27], quienes detectaron dos poblaciones de eritrocitos, normales y deficientes en G-6-PD, en mujeres heterocigotas.

Las mujeres heterocigotas con actividad normal de G-6-PD son difíciles de diagnosticar al medir la concentración intraeritrocíticas de la enzima, y sólo se detectan con estudios familiares, como se hizo en este trabajo. El patrón de herencia en las 155 familias deficientes estudiadas fue a través del cromosoma X, que es la forma de transmisión genética establecida.

En 4 familias con hijos deficientes en G-6-PD, ambos padres eran también deficientes, lo cual nos dice que la prevalencia de la deficiencia de G-6-PD en Venezuela permite que se reúnan dos deficientes y tengan hijos. Estas parejas podrían engendrar hijas deficientes en G-6-PD, verdaderas homocigotas con actividad enzimática muy baja y por lo tanto susceptibles de presentar crisis hemolíticas como los varones hemicigotos.

Los pacientes que se estudiaron procedían de diferentes regiones de Venezuela, lo cual concuerda con la literatura que indica que esta deficiencia se encuentra a nivel mundial en cualquier región [28, 29]. Estudiamos 2.069 pacientes con sospecha de anemia hemolítica congénita de diferentes estados de Venezuela, por lo cual los hallazgos obtenidos lo podemos extrapolar como representativos de la población venezolana.

La principal causa de consulta de los propósitos fue la anemia hemolítica por ingestión de drogas oxidantes, que es la manifestación clínica que caracteriza esta enfermedad en los pacientes hemicigotos, mientras que la mayoría de las pacientes heterocigotas para la deficiencia son asintomáticas [29 a 33]. Al analizar las drogas oxidantes inductoras de hemólisis, podemos ver que su estructura química es variable, pero se ha reportado que ellas tienen en común la capacidad de estimular la vía de las pentosas en el eritrocito, oxidan el NADPH directa o indirectamente y en el curso de su metabolismo se autooxidan y generan radicales libres, éstos a su vez oxidan el glutatión reducido, y originan su depleción, reduciendo la actividad del ciclo del glutatión, y oxidan también (las drogas o sus radicales) a los grupos sulfidrilos de la membrana eritrocitaria y de la hemoglobina que se convierten en disulfidos o sulfóxilos y precipitan la hemoglobina con formación de cuerpos de Heinz; se originan así daños irreversibles a la membrana del eritrocito, el cual será finalmente lisado [33, 34].

De 118 mujeres heterocigotas para la deficiencia de G-6-PD estudiadas encontramos que 53 eran propósitos y habían consultado por anemia. De éstas, 8 habían presentado crisis hemolítica tras exposición a drogas oxidantes. Las crisis hemolíticas fueron tan severas en 3 de estas pacientes que ameritaron transfusión de concentrado globular. Esto puede explicarse porque los eritrocitos de estas mujeres heterocigotas contienen un nivel intraeritrocítico de la enzima G-6-PD muy por debajo del 50% de lo normal (debido a la inactivación del cromosoma X), lo cual las hace anormales bioquímicamente y ocurre la hemólisis como en los pacientes hemicigotos con eritrocitos con actividad enzimática muy disminuida.

En este trabajo observamos que la severidad de la hemólisis ante la sustancia oxidante depende fundamentalmente del paciente y no del tipo de droga oxidante utilizada; ésta puede precipitar la hemólisis ya sea por ingestión, inhalación o absorción a través de la piel.

La segunda causa de consulta fue la ictericia neonatal; ésta se diferenció de la ictericia por incompatibilidad Rh porque ningún neonato deficiente en G-6-PD nació icterico, es decir, no presentó ictericia dentro de las primeras 24 horas después del

nacimiento y además la anemia no fue severa, presentando principalmente un mayor grado de ictericia que de anemia. Al comparar la anemia hemolítica que sufren estos neonatos con la anemia hemolítica de la incompatibilidad Rh tenemos que la ictericia se presenta en las primeras 24 horas de nacidos. Esta observación ha sido reportada previamente en otros países [35-39].

De los 41 neonatos hemicigotos que presentaron ictericia, 19 requirieron fototerapia y 9 exanguinotransfusión. De 10 neonatos femeninos heterocigotos con ictericia, 9 ameritaron fototerapia y una exanguinotransfusión, lo cual nos habla de la severidad de la hemólisis. La explicación de porque estos neonatos deficientes desarrollan diferentes grados de severidad en la ictericia no es conocido. Se sabe que no todos los neonatos deficientes desarrollan ictericia; también se sabe que los eritrocitos neonatales poseen una actividad de G-6-PD más elevada que los eritrocitos del adulto, por lo cual algunos autores presumen que otros factores deben estar involucrados en el desarrollo de la ictericia en el neonato deficiente en G-6-PD. Sin embargo, ha sido reportado que la actividad de G-6-PD en glóbulos rojos de neonatos deficientes que desarrollaron hiperbilirrubinemia es menor que la actividad de G-6-PD en glóbulos rojos de neonatos deficientes que no la presentaron. Muchos estudios han demostrado que la causa principal de la ictericia en neonatos deficientes en G-6-PD es la deficiencia en conjugar la bilirrubina del hígado neonatal. Iolascon y col. Tratando de averiguar la patogénesis de la hiperbilirrubinemia presente en el 30% de los neonatos afectados por la deficiencia de G-6-PD evaluaron el efecto de la asociación del síndrome de Gilbert, el defecto más común de la conjugación de la bilirrubina, sobre la hiperbilirrubinemia de neonatos deficientes en G-6PD y en 102 neonatos deficientes no pudieron implicar a este síndrome en la hiperbilirrubinemia de dichos neonatos [40 a 42]. En Nigeria se ha reportado como causa precipitante de la ictericia el uso frecuente de naftaleno en los closets y ropas de los recién nacidos y lactantes, pero este no parece ser el caso en Venezuela [43].

La mayoría de los pacientes deficientes en G-6-PD tanto hemicigotos como heterocigotos presentaron valores de Hb y Hto, índices globulares, morfología de los

eritrocitos y recuento de reticulocitos completamente normales en condiciones basales, y presentaron alteración de estos valores cuando se expusieron a un agente oxidante, lo cual es típico de esta enfermedad (Tablas II, III, IV, V, VI) [29, 30, 33].

Se estudiaron 4 pacientes deficientes en G-6-PD pero con anemia hemolítica crónica, los cuales fueron clasificados como pertenecientes a la clase I de G-6-PD. La mayoría de los individuos con deficiencia de G-6-PD se caracterizan, como ya dijimos, por presentar en condiciones basales (en ausencia de crisis hemolítica) cifras de Hb y Hto normales; por el contrario, estos 4 pacientes presentaron el cuadro de anemia hemolítica crónica y se comportaron clínicamente como si fuesen deficientes en las enzimas del ciclo glicolítico o como si estuvieran afectados de una anemia hemolítica congénita por esferocitosis. Los 4 pacientes pertenecían a tres familias venezolanas diferentes.

La anemia hemolítica crónica secundaria a deficiencia de G-6-PD se presenta aproximadamente en el 1% de las personas deficientes en G-6-PD y casi invariablemente el paciente que la padece es de sexo masculino; comienza el problema al nacimiento cuando se hace el diagnóstico de ictericia neonatal que puede ser tan severa como para requerir exanguinotransfusión, como aconteció en todos estos casos (44 a 48); los pacientes presentaron coluria sin hemoglobinuria, lo cual sugiere que el proceso hemolítico es básicamente extravascular.

Estudios de la membrana eritrocítica de pacientes con anemia hemolítica congénita no esferocítica secundaria a deficiencia de G-6-PD han revelado la presencia de agregados de alto peso molecular, que están formados de espectrina, agregados que no han sido encontrados en individuos deficientes en G-6-PD pero asintomáticos. Este hallazgo sugiere que la enzima G-6-PD residual de los individuos deficientes que sufren sólo de crisis hemolítica es suficiente para mantener el potencial reductor dentro del eritrocito y por tanto compensa cualquier acción oxidante intraeritrocitaria; por el contrario, en los pacientes con anemia hemolítica congénita no esferocítica la enzima residual no es capaz de mantener el potencial reductor y la oxidación de los grupos sulfidrilos ocurre continuamente, seguidos de cambios irreversibles de las proteínas de la membrana del eritrocito, lo que conduce a su destrucción (48).

El favismo tiene alta incidencia en las islas Baleares, Grecia, Chipre, Turquía, Líbano, Israel, Egipto, norte de África, Irán, Iraq, Italia (restringido a Cerdeña y Sicilia) pero parece ser infrecuente en Venezuela, como se deduce de este estudio (49 a 54). Sólo 4 pacientes presentaron favismo, 2 adultos y 2 niños. Se sabe que el favismo severo afecta principalmente a niños entre 2 y 5 años de edad, y es más frecuente al ingerir habas frescas o incompletamente cocidas, rápidamente hervidas o fritas (49). La causa de la hemólisis en el favismo es atribuida a los componentes glucosídicos de las habas, tales como la vicina y la convicina, y el ácido ascórbico, los cuales actúan como agentes oxidantes. Las habas tiernas contienen cantidades elevadas de vicina y convicina (52).

Las consecuencias de la oxidación del eritrocito han sido estudiadas en experimentos in vitro realizados con eritrocitos deficientes en G-6-PD; merecen especial atención la interferencia en la homeostasis del calcio y las alteraciones de las proteínas de la membrana [5]. Cuando el eritrocito se somete a condiciones oxidantes ocurre:

- 1.- Oxidación del glutatión reducido (GSH) y de los tioles de la membrana.
- 2.- Disminución de la actividad de la ATPasa del calcio.
- 3.- Aumento de los niveles de calcio.
- 4.- Los niveles elevados de calcio activan las endopeptidasas que pueden atacar las proteínas de membrana tales como la anquirina y la banda 4.1 e influyen en la agregación u oligomerización de la banda 3.
- 5.- Inmediatamente hay fijación de anticuerpos específicos antibanda 3, seguido de activación del complemento con generación de fragmentos C3b y su unión a eritrocitos dañados, formación de cuerpos de Heinz, metahemoglobina, peroxidación de lípidos, etc. [5]

Se detectaron 3 pacientes con anemia hemolítica congénita (una niña de 3 años con drepanocitosis, una niña de 8 años con drepanocitosis-talasemia y otra con esferocitosis) que también eran deficientes en G-6-PD. La distribución geográfica para el gen de la globina Beta "S" y el gen de la deficiencia de G-6-PD y el gen de la esferocitosis hereditaria determina que puedan coincidir en un mismo individuo. Tales genes no están genéticamente ligados, por lo cual en estos casos la frecuencia de tener dos tipos diferentes

de anemia hemolítica congénita es el producto de dos genes de frecuencia diferentes. En la paciente con drepanocitosis-talasemia la asociación con deficiencia de G-6-PD trajo como consecuencia que la enfermedad tuviera un curso clínico más severo que el que se esperaría si presentara solamente la drepanocitosis homocigótica; sin embargo, la paciente con drepanocitosis y deficiencia de G-6-PD presentó el cuadro clínico de drepanocitosis solamente. Exacerbaciones severas de la anemia en pacientes con drepanocitosis y deficiencia de G-6-PD han sido observadas y reportadas en la literatura [33]. La reticulocitosis que se genera en estos casos aumentaría los niveles intraeritrocíticos de G-6-PD y esto teóricamente limitaría la severidad de la crisis hemolítica; sin embargo, esto es difícil de afirmar en la práctica debido a la interacción de infección, drogas, y anemia preexistente. Si el grado de hemólisis inducido por drogas es menor en un paciente con drepanocitosis, esto puede ser enmascarado por el hecho de que la hemólisis intravascular aguda de la deficiencia de G-6-PD ocurre sobre una hemólisis extravascular crónica de la drepanocitosis (29).

Se estudiaron individuos deficientes en G-6-PD asociada con deficiencia de hierro, lo cual ocurre en Venezuela por la alta prevalencia de esta última deficiencia. Es de hacer notar que estos pacientes presentan anemia hipocrómica microcítica con índices globulares disminuidos, que no es habitual en personas deficientes en G-6-PD, quienes en condiciones basales presentan una morfología sanguínea e índices globulares normales, y durante las crisis hemolíticas presentan eritrocitos con hemoglobina polarizada hacia un extremo, esferocitos, células en casco, policromatofilia e índices globulares normales (9). Las pacientes con deficiencia de G-6-PD que resultaron embarazadas tuvieron una evolución normal, ya que no eran portadoras de la variante clase 1 de G-6-PD, que se caracteriza por anemia hemolítica congénita no esferocítica, ni se expusieron a drogas oxidantes ni presentaron infecciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hemolytic anemia. En: Nathan and Oski. Hematology of Infancy and Childhood. W. B. Saunders, 5th edition, 1998. Cap. 19, pag 674.
2. Dhillon AS, Darbyshire PJ, Williams MD, et al. Massive acute haemolysis in neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed (England), 88: 534, 2003.
3. Arambula E, Aguilar L JC, Vaca G. Intraoperative intravascular hemolysis in a female patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Rev Esp Anestesiología Reanim (España), 48: 396, 2001.
4. Kaplan M, Hammerman C, Beutler E. Acute viral hepatitis with severe hyperbilirubinaemia and massive hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. J Clin Gastroenterol 32:461, 2001.
5. Arese P, De Flora A Pathophysiology of Hemolysis in Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Sem Hematol 17: 1, 1990.
6. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other enzyme abnormalities. En: Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T (ed), Williams Hematology. Fifth edition, MacGraw Hill 1995.
7. Boada J. Estudio preliminar sobre la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. V Congreso de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas, Caracas, Venezuela. 1963.
8. Acquatella G. Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en diferentes grupos raciales de Venezuela. Acta Médica Venezolana 4: 269, 1967.
9. Müller A Anemias Hemolíticas en Venezuela. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Médicas, Universidad del Zulia, 1984.
10. Beutler E, Yoshida A Genetic variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. A catalogue and future prospects. Medicine 67: 311, 1988.

11. The International Committee for Standardization in Hematology. Simple Electrophoretic System for presumptive identification of abnormal Hemoglobins. *Blood*: 52:1058, 1978.
12. Bernini LR. Rapid determination of Hemoglobin A2 by DEAE cellulose chromatography. *Biochem. Genet.* 2: 305, 1969.
13. Beutler E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods.* 2nd edition, Grune & Stratton, New York, 1975.
14. Beutler E, Mathai C, Smith J. Biochemical Variants of G-6-PD giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. *Blood*: 31, 131, 1968.
15. Kirkman HN, Kidson C, Kennedy M. Variants of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Studies of samples from New Guinea. En: Beutler E. (ed): *Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism.* New York, Grune & Stratton 1968, p 126.
16. Müller A. Anemias Hemolíticas congénitas por deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en Venezuela. En: L.J. Pérez Requejo (Ed.). *Hematología Básica* (3a ed.) Facultad de Medicina, U.C., 1995
17. WHO Working Group. Glucose-6-phosphate deficiency. *Bull WHO* 67: 6011, 1989.
18. Iancovici-Kidon M, Stoecker D, Abrahamov A, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Durham: A de novo mutation associated with chronic hemolytic anemia. *J Pediatr*: 131: 284, 2000
19. Beutler E, Vulliamy TJ. Glucose-6 phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood*: 85: 257, 1995.
20. Vives-Corróns JL, Kuhl W, Pujades MA, et al. Mutation analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PG) variants in Costa Rica. *Hum Genet* 87:462, 1991.

21. Nuchprayoon I, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Molecular characterization of glucose- 6-phosphate dehydrogenase deficiency in Turkey. *Haematologica*: 85: 320, 2000.
22. Gimbert Burgos EM, Diaz Femandez J, Lopez Gonzalez MC, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai populations. *Hum Mutat*, 19: 185, 2002.
23. Hundsdoerfer P, Vetter B, Kulozik AE. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in Mexican Mestizos. *Blood Cells Mol Dis.*, 26: 387, 2000.
24. Fiorelli G, Martinez di Montemuros F, Cappellini MD. Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Baillieres BestPract. Res. Clin Haematol (England)*, Mar 2000, 13(1) p39, 2000
25. Lisker R.: Deficiencias enzimáticas de la vía de las pentosamonofosfato y metabolismo del glutatión. En López Borrasca A, Arocha Piñango C.L, Campos Guerra C, Parreira A, Pavlovsky S, Ruiz Argüelles G, *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. Ediciones de la Universidad de Salamanca, España 1992.pag 347-356
26. Lyon MF. Gene action in the X chromosome in the mouse. *Nature* 190:372, 1961.
27. Beutler E, Yeh M, Faairbanks VF. The normal human female as a mosaic of X chromosome activity: studies using the gene for G-6-PD deficiency as a marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 9, 1962.
28. Luzzatto L: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and the pentose phosphate pathway. En: Handin Rl, Lux SE, Stossel TP (eds). *Blood. Principles and Practice of Hematology* J.B. Lippincott Company, 1995. Cap. 58, p 1897.
29. Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. En: Williams WJ, Beutler E, Erslev A, Lichtman M. (eds). *Hematology*. MacGraw Hill, Inc, 1995. Cap. 58, p. 561.

30. Beutler E: Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, edited by JB Stanbury, JB Wyngaarden, DS Frederickson, et al., pp 1629-1653. Me Graw-Hill, New York, 1983.
31. Dhillon AS, Darbyshire PJ, Williams MD, et al. Chronic haemolytic anaemia and glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency. Case report and review of the literature. *Acta Haematol* 108: 102, 2002.
32. Szeinberg A, Marks PA Substances stimulating glucose catabolism by the oxidative reactions of the pentose phosphate pathway in human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 40: 914, 1961
33. Luzzato L: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and the Pentose Phosphate Pathway. En: Handin, Luz and Stossel (Eds). *Blood. Principles and Practice of Hematology*. J.B. Lippincott Co, 1995.
34. Meloni, S, Costa S et al. Haptoglobin, hemopexin, hemoglobin and hematocrit in newborn with erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Acta Haematol* 54: 284, 1975.
35. Kaplan M, Beutler E, Vreman HJ, Hammerman C, Ley-Lahad E, Renbaum P, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient heterozygotes. *Pediatrics* 104: 68, 1999.
36. Iranpour R, Akbar MR, Haghshenas I. Hyperbilirubinemia in healthy neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Early Hum Dev* 71:129, 2003.
37. Shibuya A, Hirono A, Ishii S, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in neonates. *Indian J Pediatr* 70: 855, 2003.
38. Kaplan M, Hammerman C. Hemolysis and hyperbilirubinaemia in an African American neonate heterozygous for Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Perinatol*: 22: 577, 2002.
39. Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A potential source of severe neonatal hyperbilirubinaemia and kernicterus. *Semin Neonatol* 7: 121, 2002.

40. Iolascon A, Faienza MF, Perrotta S, Meloni GF, Ruggiu G, del Giudice EM. Gilbert's syndrome and jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient neonates. *Haematologica* 84(2):99, 1999.
41. Meloni S, Costa S, y col. Haptoglobin, hemopexin, hemoglobín, haematocrit in newborn with erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Acta Haematol(Basel)* 54: 284, 1975
42. Doxiádís SA, Valaes F: The clínica!picture of glucose---6-phosphate dehydrogenase deficiency in early childhood. *Arch Dis. Child.* 39: 545, 1964.
43. Owa JA. Relationship between exposure to icterogenic agent, G-6-PD deficiency and severe neonatal jaundice in Nigeria. *Acta Paediatr. Scand* 78: 848, 1989.
44. Iancovici-Kidon M, Sthoeger D, Abrahamov A, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Durham: a de novo mutation associated with chronic hemolytic anemia. *J Pediatr.* : 131(2) p284, 2000
45. Píomelli S. G6PD deficiency and hemolytic anemia: G6PD-related neonatal jaundice, in *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase*, edited by A Yoshida, E Beutler, pp 95-108. Academic Press, Orlando, FL, 1986.
46. Weng YH, Chou YH, Lien RI. Hyperbílirubinemia in healthy neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Early Hum Dev* 71 (2): 129, 2003.
47. Zimmerman SA, Ware RE, Forman L, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Durham. a de novo mutation associated with chronic hemolytic anemia. *J Pediatr:* 131(2) p284, 1997
48. Jhonson GL, Allen DW, Cadman S, et al. Red cell membrane polypeptide aggregates in glucose-6-phosphate dehydrogenase mutants with chronic hemolytic disease: a clue to the mechanism of hemolysis. *New Engl J Med* 301: 522, 1979.
49. Kattamis CA, Kyriazakou M, Chaidas S. Favism. Clinical and biochemical data. *J. Med. Genet.* 6: 34, 1969.
50. Kattamis CA, Chaidas S. G-6-PD deficiency and favism in the island of Rhodes (Greece). *J. Med. Genet* 6: 286, 1969.

51. Donoso G, Hedayat H, Khayatian H: Favism with special reference to Iran. Bull WHO 40: 513, 1969.
52. Arese P: Favism. A natural model for the study of hemolytic mechanisms. Rev Pure Appl. Pharmacol Sci 3: 123, 1982.
53. Arese P, Mannuzzu L, Turrini FetaL Etiological aspect offavism. En: Yoshida A, Beutler E. (eds): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Academic Press, San Diego, CA, 1986, pag. 45-75.
54. Shibuya A, Hirono A, Ishii S, Fuji H, Miwa S. Hemolytic crisis after excessive ingestion offava beans in a male infant with G-6-PD Canton Intemall Hematol: 70(4): 233, 1999

**DETECCIÓN DE VARIANTES BIOQUÍMICAS DE
GLUCOSA-6-FOSFATO DEHIDROGENASA (G-6-
PD) EN VENEZUELA**

DETECCIÓN DE VARIANTES BIOQUÍMICAS DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G-6-PD) EN VENEZUELA

Müller A, Soyano A, Méndez G, Somoza R, Soyano A.E

Instituto de Oncología y Hematología M.S.D.S-UCV, Clínica El Avila, Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.).

RESUMEN

*Se presenta el estudio bioquímico y electroforético realizado a las muestras de sangre de 92 pacientes con deficiencia de G-6-PD. Este estudio permitió clasificar los pacientes deficientes en: **Clase I:** 4,9% con anemia hemolítica congénita no esferocítica e ictericia crónica y esplenomegalia. Dicha clínica de anemia hemolítica crónica no es el cuadro clínico habitual de la deficiencia. El estudio bioquímico mostró actividad de G-6-PD de 7,5-13% de lo normal, Km G6P: 133-220 μ M (VN: 50-70 μ M), Km NADP: 3,8-4 μ M (VN: 2,9-4,4), inestable al calor, pH óptimos: 8 y 9, electroforesis de la G-6-PD variante rápida con movilidad electroforética de 110. **Clase II:** 45, 7% clínicamente asintomáticos fuera de crisis hemolítica El estudio bioquímico mostró actividad de G-6-PD muy disminuida de 0-10% de lo normal, Km G6P: 31-200 μ M, pH óptimo: 6,5 y 9, electroforesis de la G-6-PD variante normal con movilidad electroforética de 100. **Clase III:** 49,4% clínicamente asintomáticos fuera de crisis hemolítica. El estudio bioquímico mostró actividad de G-6-PD de 11-58% de lo normal, Km G6P: 43-70, Km NADP: 1,4-2,9 μ M, óptimo: 8, 9 y bifásico, electroforesis de la G-6-PD variantes A y B con movilidad electroforética de 100 - 110. La inestabilidad al calor indica inestabilidad intracelular y por lo tanto baja actividad. Se concluye que la presencia de estas diferentes variantes es debido al mestizaje de nuestra población y se comparan con lo reportado a escala mundial.*

La G-6-PD normal se conoce como G-6-PD B, representa el tipo enzimático más común encontrado en todos los grupos poblacionales que han sido estudiados y presenta una movilidad electroforética característica (1). En principio la deficiencia de G-6-PD, al igual que cualquiera otra proteína puede ser debida a deleciones o mutaciones puntuales que afectan la transcripción, procesamiento o la estructura primaria. El estudio de las propiedades de la enzima residual G-6-PD ha demostrado invariablemente desviaciones de las propiedades de la enzima normal sugiriendo que la deficiencia de G-6-PD era debida a anormalidades estructurales, esto es, mutaciones en la región del codón mas que disminución del número de moléculas, como podría esperarse con mutantes por defectos en la transcripción o procesamiento (2,3).

Cambios en la estructura primaria, tales como cambios de un aminoácido pueden causar deficiencias de G-6-PD por afectar su función catalítica o por disminuir la estabilidad de la proteína o ambos de esos mecanismos. Para algunas variantes una disminución rápida de la actividad enzimática in vivo ha sido demostrada en eritrocitos fraccionados de acuerdo a su madurez o edad. En casos extremos la deficiencia de G-6-PD puede visualizarse simplemente como resultado de un cambio marcado en la constante de disminución exponencial de la enzima que reduce la vida media de 50 días a 1º días o menos. En tales casos la actividad de G-6-PD de los reticulocitos es prácticamente normal (2, 4- 6).

Aquellas variantes de G-6-PD que electroforéticamente migran por delante de la G-6-PD tipo B son clasificadas como variantes rápidas tipo A y las que migran en su misma posición son clasificadas como variantes con migración electroforética normal. Cuando se escribe el símbolo negativo (-) por delante de la G-6-PD A o B, esto significa que la enzima está presente en cantidades deficientes (7).

La G-6-PD tipo A es la variante más común en todo el mundo, encontrándose en el 20% de los varones africanos. Su actividad es normal, pero migra electroforéticamente más rápido que la G-6-PD normal. El defecto molecular radica en una sustitución A-Gen el nucleótido 376 (8).

La G-6-PD tipo A- es una enzima electroforéticamente rápida, con una marcada inestabilidad intracelular y por lo tanto con disminución de su actividad. Es una de las variantes deficientes más comunes. Con la clonación y secuenciación de genes se ha detectado un grupo de mutaciones que se originaron a partir de la G-6-PD "A". Se han encontrado sustituciones de aminoácidos producidos por cambios en los nucleótidos 371, 202 (transición G A), Estos tres genotipos han sido detectados en africanos y uno de ellos en una familia española, siendo la enzima previamente identificada por métodos bioquímicos como G-6-PD Bética (25, 26)

Se ha encontrado la mutación de los nucleótidos 202 y "376 no sólo entre negros sino también en blancos del norte de Europa y en mejicanos. Determinadas variantes de G-6-PD "A -" que fueron consideradas anteriormente como únicas, actualmente se sabe que son idénticas, tales como Matera, Bética, Castilla, Alabama, Tepic (9).

La G-6-PD Mediterránea es la variante más común entre las poblaciones caucásicas, aunque se ha hecho evidente que variantes diferentes de G-6-PD existen en esa región. La frecuencia de la deficiencia de G-6-PD entre poblaciones caucásicas varía entre menos de 1 en 1000 en poblaciones del norte de Europa al 50% entre los judíos kurdos. La actividad enzimática de los eritrocitos de los individuos que han heredado la deficiencia es muy baja y a menudo menor de 1%; es debida a una transición C T en el nucleótido 563 (10, 11, 27).

La heterogeneidad genética de la G-6-PD resulta de diferencias cualitativas y cuantitativas de la enzima G-6-PD. Las diferentes variantes han sido clasificadas de acuerdo al grado de deficiencia y al estudio de la evaluación clínica, dentro de 5 grupos o clases (11).

1. DEFICIENCIA DE G-6-PD CLASE 1

Deficiencia enzimática severa asociada con anemia hemolítica congénita no esferocítica; la hemólisis es permanente. El grado de severidad varía con los diferentes tipos.

2. DEFICIENCIA DE G-6-PD CLASE 2

Deficiencia enzimática severa (actividad enzimática menor del 10% de lo

normal): la sensibilidad a los agentes hemolíticos y la severidad de los episodios hemolíticos son marcados.

3. DEFICIENCIA DE G-6-PD CLASE 3

Deficiencia enzimática moderada (actividad enzimática del 10-60% de lo normal): no hay sobrehemólisis, pero ésta puede ser inducida agudamente por muchas drogas y otros agentes.

3. DEFICIENCIA DE G-6-PD CLASE 4

Deficiencia enzimática ligera o casi normal, sin consecuencias clínicas.

4. DEFICIENCIA DE G-6-PD CLASE 5

Actividad enzimática aumentada.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó sangre de 92 pacientes hemocigotos conocidos deficientes en G-6-PD, 10 muestras de sangre de donantes del Banco de Sangre y muestras de sangre de 3 pacientes con drepanocitosis homocigota, los cuales sirvieron como controles para los estudios de concentración de calcio intraeritrocítico.

A cada paciente conocido deficiente en G-6-PD se le realizó historia clínica.

Separación de los eritrocitos de la sangre para estudio enzimático

Sangre total proveniente de los pacientes con anemia hemolítica, familiares y donantes del Banco de Sangre, que sirvieron como controles, fue recolectada en tubos de ensayo con EDTA y los eritrocitos separados del resto de los componentes celulares de la sangre usando columnas de celulosa más Sigmagel y a continuación dichos eritrocitos fueron hemolizados en una solución de agua con beta-mercaptoetanol. En dichos hemolizados recién obtenidos se realizó la cuantificación enzimática (12).

Se cuantificaron los niveles intraeritrocíticos de la enzima G-6-PD de pacientes conocidos deficientes en la enzima, familiares y donantes del Banco de Sangre por espectrofotometría usando un espectrofotómetro Gilford con registrador (12).

Caracterización bioquímica de la enzima G-6-PD intraeritrocítica residual.

Se purificó parcialmente la enzima G-6-PD de los eritrocitos utilizando columnas de DEAE-celulosa con buffer fosfato por el método descrito por Kikman y modificado por Beutler (13). A la enzima parcialmente purificada se le determinaron los siguientes parámetros:

1. Velocidad máxima
2. Constante de Michaelis (Km) para sus sustratos: glucosa-6-fosfato (G-6-P) y nicotinadenina difosfato (NADP).
3. Electroforesis de la G-6-PD en acetato de celulosa (14).

Concentración de Na y K intraeritrocíticos (15).

Concentración de calcio intraeritrocítica (16).

RESULTADOS

Estudio electroforético de la G-6-PD intraeritrocítica residual en 92 propósitos deficientes

El estudio electroforético de la G-6-PD residual purificada en columnas de intercambio aniónico realizado en membranas de acetato de celulosa permitió en los eritrocitos de donantes de sangre usados como controles y en los familiares de los pacientes propósitos detectar las G-6-PD de migración normal B y la variante A que migra por delante de la G-6-PD B normal, por lo cual se considera una variante de la migración electroforética rápida [Fig. 1 y Fig. 2].

El estudio electroforético arriba mencionado en pacientes hemicigotos y familiares deficientes en G-6-PD permitió detectar la variante A en el 61,53% de los casos y la variante B en el 38,47%. El estudio electroforético de la G-6-PD en pacientes femeninas heterocigotas permitió detectar la variante A en el 8,3% de los casos, la variante B en

el 37,53% y la variante Aben el 54,17% de los casos. La variante de G-6-PD AB, representa combinación de la G-6-PD B y G-6-PD A.

Propiedades bioquímicas de la G-6-PD residual intraeritrocítica en 52 propósitos deficientes

El estudio de las propiedades bioquímicas de la enzima residual aparece en la Tabla I.

Clases de G-6-PD en propósitos deficientes

El estudio clínico, los niveles intraeritrocíticos de G-6-PD obtenidos por cuantificación de la enzima residual, el estudio de las propiedades bioquímicas de la G-6-PD residual parcialmente purificada: constante de Michaelis [Km] para sus sustratos glucosa-6-fosfato [G-6-PD] y nicotinadenina disfosfato [NADP], estabilidad al calor, pH óptimo, y la electroforesis de la G-6-PD nos permitieron encontrar diferencias cinéticas y electroforéticas entre la G-6-PD eritrocítica de pacientes deficientes de diferentes grupos poblacionales.

Se detectaron tres diferentes clases de G-6-PD en 52 pacientes hemicigotos propósitos provenientes de diferentes regiones de Venezuela. Detectamos las siguientes clases de G-6-PD:

- 1. CLASE I:** con anemia hemolítica congénita no esferocítica crónica solo en el 4,9% de los pacientes.
- 2. CLASE II:** con deficiencia severa de G-6-PD y sin anemia hemolítica congénita no esferocítica en el 45,7% de los pacientes.
- 2. CLASE III:** con deficiencia moderada en la actividad de la G-6-PD en 49,4% de los pacientes [Tabla I].

TABLA I
Clases de G-6-PD en 52 pacientes venezolanos deficientes

	CLASE I	CLASEII	CLASEIII
% de pacientes	4,9	45,7	49,6
% de actividad	7,5-13	0-10	11-58
Km G-6-P (V.N: 50-70 μ M)	133-200	31-200	40-73
Km N.A.D.P. (V.N: 2,9 -4,4)	3,8-4,0	2,2-4,4	1,4-2,9
Estabilidad al calor	Instable	Inestable	Inestable estable
pH óptimo	8 y 9	6,5 y9,5	8,9 y bifásica
Electroforesis	"A"	"8"	"A"y"B"
Movilidad electroforética	110	100	100-110
(% de lo normal en buffer Tris).			

Características de la G-6-PD clase I

Los pacientes con G-6-PD clase I se caracterizaron clínicamente por presentar anemia hemolítica congénita no esferocítica crónica con ictericia permanente a expensas del aumento de la bilirrubina indirecta y esplenomegalia. Tenían antecedentes de ictericia neonatal, que ameritó fototerapia y su hemólisis crónica era exacerbada por drogas oxidantes o infecciones.

La actividad de G-6-PD residual intraeritrocítica se encontró disminuida en valores de 7,5-13% de la actividad de G-6-PD normal que representa el 100 %. El Km de la G-6-PD parcialmente purificada para su sustrato glucosa-6-fosfato se encontró en un rango que osciló entre 133 y 220 μ M [V.N.: 50 - 70]. El Km de la G-6-PD parcialmente purificada para su sustrato NADP se encontró en un rango que osciló entre 3,8-4 μ M [V.N.: 2-6,9].

La enzima G-6-PD residual parcialmente purificada de estos pacientes se comportó como termolábil al exponerse a temperatura de 40 y 46 grados centígrados. La curva de pH óptimo de la G-6-PD residual parcialmente purificada de estos pacientes fue bifásica, con pH óptimo de 8 y 9.

La electroforesis de la enzima G-6-PD parcialmente purificada mostró solamente la variante rápida "A", en los 4 pacientes estudiados provenientes de tres familias diferentes, con una movilidad electroforética en el buffer TRIS - HCl de 110%, en todos los casos [Tabla I].

Características de la clase II de G-6-PD

Los pacientes de la CLASE II se caracterizaron clínicamente por ser asintomáticos, con valores hematológicos normales, solo presentaron crisis hemolítica cuando se expusieron a drogas oxidantes, ingirieron habas o presentaron infecciones virales o bacterianas. No presentaban evidencia de anemia hemolítica crónica.

Los propósitos de tres familias deficientes presentaron hemólisis después de la ingestión de habas (favismo). Estos pacientes tenían antecedentes de ictericia neonatal, que había requerido fototerapia o exanguinotransfusión para evitar el cuadro clínico de Kernicterus.

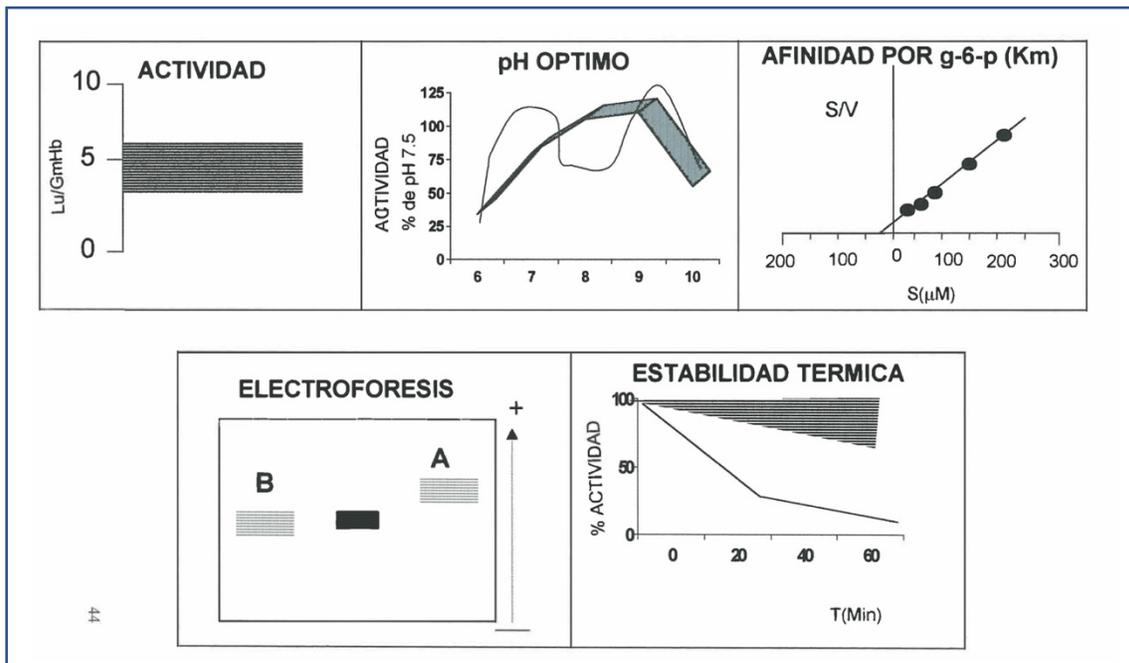
La actividad de G-6-PD residual intraeritrocítica se encontró muy disminuida en un rango entre 0 y 10% de la actividad de G-6-PD normal, que representa el 100%. El Km de la G-6-PD parcialmente purificada para su sustrato glucosa-6-fosfato se encontró entre 31-200 μ M en los pacientes estudiados [V.N.: 50 - 70]. El Km de la G-6-PD parcialmente purificada para su sustrato NADP fue de 2,2 - 4,4 μ M [V.N.: 2,9- 4,4] en los pacientes estudiados [Tabla I].

La enzima G-6-PD parcialmente purificada de estos pacientes se comportó como lábil al calor, al exponerse a temperaturas de 40 y 46 grados centígrados. La curva de pH de la enzima G-6-PD parcialmente purificada fue en todos los casos bifásica con pH óptimos de 6,5 y 9,5 [Tabla I].

La electroforesis de la enzima parcialmente purificada mostró en todos los casos la presencia de la G-6-PD "B" con una movilidad electroforética de 100% en el buffer TRIS.

El estudio de las propiedades antes enumeradas nos permitió detectar la variante Mediterránea en los pacientes deficientes en G-6-PD con la clase II, la cual se caracterizó por presentar la actividad de G-6-PD muy disminuida, con el Km para G-6-P disminuida y el Km para el sustrato NADP normal, inestable al calor, con pH bifásico 6,5 y 9 [Fig. 1].

**FIGURA 1
PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y ELECTROFORÉTICAS
DE LA G-6-PD "B"**



CARACTERÍSTICA DE LA G-6-PD CLASE III

Estos pacientes se caracterizaron por ser asintomáticos, con valores hematológicos normales y presentar crisis hemolítica solamente cuando se expusieron a drogas oxidantes o a infecciones. Tenían antecedentes de ictericia neonatal que había ameritado tratamiento con fototerapia o exanguinotransfusión. No tenían evidencia clínica ni de laboratorio de anemia hemolítica congénita no esférica.

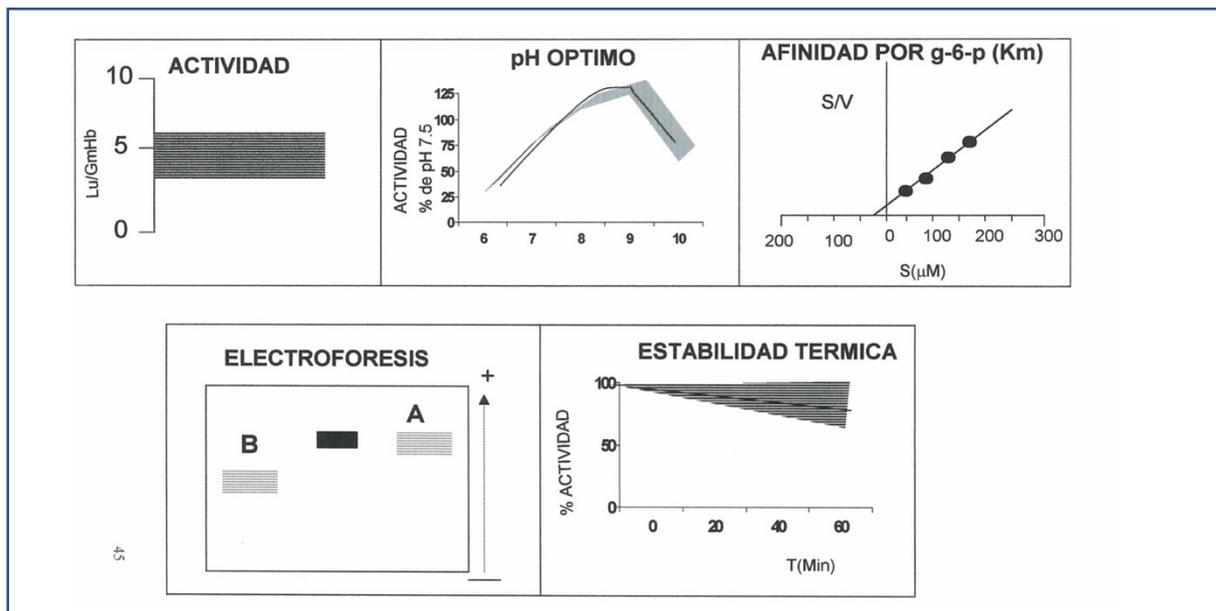
La actividad de G-6-PD residual intraeritrocítica se encontró disminuida en un rango entre 11 y 58% de la actividad de G-6-PD normal que representa el 100%. El Km de la G-6-PD parcialmente purificada para su sustrato glucosa-6-fosfato se encontró entre 40-73 μ M. (V.N: 50-70]. El Km de la G-6-PD parcialmente purificada para su sustrato NADP se encontró en valores de 1,4 - 2,9 μ M [V.N.: 3,9 - 4,4] de acuerdo al paciente estudiado [Tabla I].

La enzima G-6-PD parcialmente purificada de estos pacientes se comportó como estable al calor en unos pacientes y en otros pacientes como termolábil al exponerse a temperaturas de 40 y 46 grados centígrados. La curva de pH de la enzima G-6-PD purificada varió desde monofásica con pH óptimo de 8 o 9 hasta bifásica con dos pH óptimos diferentes [Tabla I].

La electroforesis de la enzima parcialmente purificada mostró migraciones electroforéticas G-6-PD tipo B normal en el 20% de los pacientes y G-6-PD tipo A, variante rápida en el 80% de los pacientes.

Con los estudios antes mencionados se pudo detectar dentro de esta clase la variante de G-6-PD A, cuyas propiedades aparecen en la Fig. 2.

FIGURA 2
PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y ELECTROFORÉTICAS
DE LA G-6-PD "A-"



Concentración intraeritrocítica de Na y K en pacientes deficientes de G-6-PD

Se determinó la concentración intraeritrocítica de Na y de K en 10 pacientes hemocigotos y en 2 heterocigotos para la deficiencia de G-6-PD, obteniéndose los siguientes resultados expresados en meq/ml/célula:

Pacientes hemocigotos:

Na: $12,3 \pm 2,8$ [V.N.: $14,8 \pm 2,7$]

K: $94,6 \pm 8,0$ [V.N.: $93,2 \pm 6,1$]

Pacientes heterocigotos

Na: $12,45 \pm 1,6$ [V.N.: $14,8 \pm 1,7$]

K: $88,7 \pm 12,2$ [V.N.: $93,2 \pm 6,1$]

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Na y K de los eritrocitos de los pacientes deficientes en G-6-PD y los eritrocitos controles provenientes de 15 donantes de sangre [Tabla II].

TABLA II
VALORES INTRAERITROCITICOS DE Na y K
EN PACIENTES DEFICIENTES EN G-6_PD

No	H ₂ O	Na		K	Na+ K	
		Cel.	Meq/ml H ₂ O		Cel	H ₂ O
HEMICIGOTOS						
10	$64,1 \pm 2,8$	$12,2 \pm 3,5$	$20,7 \pm 4,9$	$97,5 \pm 4,6$	$16,9 \pm 12$	$109,7$
HETEROCIGOTO						
2	$62,1 \pm 2,7$	$12,5 \pm 1,6$	$20 \pm 1,7$	$88,7 \pm 12,2$	$149 \pm 16,7$	$101,2$
CONTROLES						
10	$62,7 \pm 4,4$	$14,8 \pm 2,7$	$25,9 \pm 4,9$	$93,3 \pm 6,1$	$159,4 \pm 10,2$	$108,1$

Los niveles intraeritrocitos de Na y K son expresados en meq/ml de células eritrocíticas y en meq de H₂O intraeritrocítica

Concentración de calcio en los eritrocitos de pacientes deficientes en G-6-PD

A las mismas muestras de eritrocitos, provenientes de pacientes deficientes en G-6-PD, a las que se les midió Na y K intraeritrocítico, se le determinaron las concentraciones de calcio, no obteniéndose diferencias entre los eritrocitos de los pacientes hemicigotos y heterocigotos para la deficiencia de G-6-PD y los donantes de sangre usados como controles. Los eritrocitos de los pacientes con hemoglobinopatías SS presentaron concentraciones más elevadas que los deficientes en G-6-PD y que los donantes de sangre usados como controles [Tabla III].

TABLA III
CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN LOS ERITROCITOS
DE PACIENTES DEFICIENTES EN G-6-PD

No	Paciente	Ca (nM)
10	HEMICIGOTOS	1,9 ± 0,03
2	HETEROCIGOTOS	1,9 ± 0,05
3	DREPANOCITICOS SS	2,5 ± 0,3
10	DONANTES	1,9 ± 0,02

DISCUSIÓN

En este estudio presentamos 3 clases de G-6-PD detectadas mediante estudio bioquímico y electroforético de la G-6-PD residual intraeritrocítica a 52 pacientes hemicigotos. Si observamos la Tabla I podemos ver que hay una amplia variación en las propiedades cinéticas, los Km para los sustratos glucosa-6-fosfato (G-6-P) y nicotinadenina dinucleótido (NADP), de acuerdo a la clase y dentro de la clase hubo un rango de valores de acuerdo al paciente.

En la clase I de G-6-PD encontramos solo la variante rápida tipo A. No detectamos variantes normales ni lentas en esta clase. La actividad de la enzima estuvo disminuida, el K_m para el sustrato glucosa-6-fosfato (G-6-P) estuvo aumentado y para el sustrato nicotinaadenina dinucleótido fosfato (NADP), y la enzima era inestable al calor. En esta clase de variante ha sido reportado G-6-PD con K_m elevado para su sustrato glucosa-6-fosfato (G-6-P) e inestables al calor. Las variantes de G-6-PD de la clase I: Saint-Louis de Francia (17), Fukuck de Japón (18), East-Hayem en negros americanos (19). Han sido reportadas 73 variantes de la clase I y solo 15 variantes electroforéticamente rápidas (20, 28). De las 73 variantes han sido caracterizadas molecularmente 61 variantes de G-6-PD asociadas a anemia hemolítica crónica (29).

En la clase II de G-6-PD la actividad de la G-6-PD intraeritrocítica se encontró muy disminuida, con K_m normal disminuido o elevado para el sustrato G-6-P, estabilidad al calor disminuida, pH óptimo bimodal. Todos los pacientes presentaron electroforéticamente la variante normal. No hubo variantes rápidas ni lentas. Han sido reportadas 93 variantes de G-6-PD de la clase II y dentro de estas 29 electroforéticamente normales tipo B [1, 2, 21].

Al comparar nuestros resultados con los ya reportados encontramos que nuestros pacientes presentan diferentes tipos de variantes de clase II Mediterránea, la cual se caracterizó por actividad de G-6-PD muy disminuida, movilidad electroforética normal, K_m para G-6-P bajo y para el NADP normal, estabilidad de la enzima al calor disminuida y curva de pH bimodal [Fig. 1]. Esta variante podemos asumir que existe en Venezuela debido al mestizaje de nuestros pobladores autóctonos con individuos de raza caucásica que inmigraron a nuestro país, ya que nuestros indígenas no poseen la deficiencia de G-6-PD como hemos mencionado previamente.

También se encontraron variantes que diferían de la Mediterránea, en que su K_m para G-6-P era elevado como ha sido reportado con las variantes de G-6-PD: Nucus de Rusia o Vianghan de Laos [20], o con K_m para G-6-P normal como ha sido reportado con las variantes El Fayoum de Egipto, Bagdad, Ogori de Japón, Jammu de La India y Dushanba II [22].

En la clase III de G-6-PD se encontró la actividad de la G-6-PD disminuida, el K_m para G-6-P normal o disminuido, el K_m para el NADP normal, la estabilidad de la enzima al calor varió siendo inestable en unos pacientes y estable en otros, la curva de pH también varió de acuerdo al paciente estudiado desde monofásica con dos pH (8 ó 9) hasta bifásica con dos pH diferentes y la movilidad electroforética fue de 100% normal en el 80% de los pacientes, clasificándose como variante rápida.

Dentro de esta clase ID detectamos la variante A- [Fig. 2], la cual se caracterizó por presentar los K_m para los sustratos G-6-P y NADP normales, con pH óptimo normal y comportarse como estable al calor. Los pacientes venezolanos la poseen debido al mestizaje con la raza africana.

Han sido reportados 89 pacientes con variantes de la clase III con movilidades electroforéticas normales, rápidas o lentas. Aquí solo detectamos la variante de movilidad electroforética normal y rápida [22].

Como puede apreciarse en este estudio el comportamiento cinético y electroforético de la G-6-PD varió ampliamente entre las clases, lo cual está de acuerdo con lo reportado en la literatura, que una de las características más extraordinarias de la G-6-PD es la cantidad de mutaciones que afectan esta enzima en los humanos. Se han identificado más de 125 diferentes mutaciones que causan deficiencia de G-6-PD (27).

Las concentraciones de Na, K y Ca de los eritrocitos deficientes en G-6-PD fueron normales, lo cual nos habla de la normalidad de la permeabilidad pasiva y activa (bombas de Na y K), y de las bombas de Ca en los eritrocitos deficientes en G-6-PD (Tablas II y III). Por el contrario, los eritrocitos provenientes de pacientes con drepanocitosis presentan aumento de los niveles de calcio, lo cual habla a favor de trastornos de la permeabilidad de la membrana y de la bomba de calcio (Tabla III) (23, 24)

BIBLIOGRAFÍA

1. Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other enzyme abnormalities. En: Williams Hematology, Beutler E, Lichtman M, Coller B and Kipps T (eds). Me Graw Hill, Inc, 1995.
2. Luzzato L: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and the Pentose Phosphate Pathway. En: Handin R.I, Luz S.E and Stossel T.P(Eds), Blood. Principles and Practice of Hematology, J.B. Lippincott Co, 1995.
3. Luzzato L, Testa U: Human erythrocyte G-6-PD. Structure and function in normal and mutant subjects. En: Piomelli S, Yanin S (eds), Current Topics in Hematology. Vol. I. New York, Alan R Liss, Inc pag. 1, 1978.
4. Piomelli S, Corash LM et al: In vivo lability of glucose-6-phosphate dehydrogenase Gd A and Gd Mediterranean deficiency. J Clin Invest 14: 940, 1988.
5. Morelli A, Benatti U et al: Biochemical mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Proc Natl Acad Sci USA 75: 1979, 1978.
6. Viglietto G, Montanaro V et al: Common glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) variants from the Italian population; biochemical and molecular characterization. Ann Hum Genet 54: 1, 1990.
7. Yoshida A: Glucose-6-phosphate dehydrogenase of human erythrocyte. Purification and characterization of normal "B" enzyme. J. Biol. Chem 241: 4966, 1966.
8. Takizawa T, Yoneyama Y, Miwa S et al: A single nucleotide base transition is the basis of the common human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A (+). Genomics 1: 228, 1987.
9. Hirono A, Beutler E: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A (-). Proc. Natl Acad. Sci USA 85: 3951, 1988
10. Vulliamy T.J. D Urso M, Battistuzzi G et al: Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. Proc Natl Acad Sci USA 85: 5171, 1988.

11. Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. En: Williams WJ, Beutler E, Erslev A, Lichtman M (eds), Hematology, Me Graw Hill Inc, cap. 58, pag. 561 1993.
12. Beutler.E: Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. 2nd edition, 1975, Grune E Stratton, New York.
13. Beutler E, Mathai C and Smith J: Biochemical Variants of G-6-PD giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic Disease. Blood: 31, 131, 1968.
14. Kirkman HN, Kidson C, Kennedy M: Variants of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Studies of samples from New Guinea. En: Beutler E. (ed): Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism. New York, Grune & Stratton 1968, p 126.
15. Muller-Soyano A, Ramsey B, Glader B: Comparative monovalent cation transport in neonatal and adult red blood cells. Ped. Res. 18: 778, 1984.
16. Romero PJ: Role of membrane-bound Ca in ghost permeability to Na y K. J. Membrane Biol. 29: 329, 1976.
17. Khan A, Boulard M, Hakim J et al: Anémie Hemolytique congenitale non spherocytaire par deficit en glucose-6-phosphate dehydrogenase erythrocytaire. Description de deux nouvelles variants: Gd (-) Saint Louis (Paris) et Gd (-) Hayem. Nouv. Rev. Fr. Hematol 14: 587, 1974.
18. Fujii H, Miwa S, Tani K et al: Glucose-6-phosphate dehydrogenase found in Japan. Hum Genet 66: 276, 1984.
19. Feldman R, Gromisch DS, Luhby AL et al: Congenital nonspherocytic hemolytic anemia due to glucose-6 phosphate dehydrogenase. East Harlem: A new deficient variant. J. Pediar 90: 89, 1977.
20. Yermakov N, Tokarev J, Chernjak N et al: New stable mutant Gd (-) variant G-6-PD Tashkent and G-6-PD Nucus. Molecular basis of hereditary enzyme deficiency. Acta Biol. Med. Geriat 40: 559, 1981.
21. Beutler E, Mathai C and Smith J: Biochemical Variants of G-6-PD giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic Disease. Blood 31: 131, 1968.

22. Beutler E: The Genetics of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Seminars in Hematology* 27: 137, 1990.
23. Smith HL, Oski FA, Brody TI: The hemolytic crisis of sickle cell disease: The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Pediatr.* 74: 544, 1969.
24. Sachs J R, Knauf PA, et al: Transport through red cell membranes. En: *The Red Blood Cell*, 2nd ed, vol. 2 Surgenor DN (ed), New York, Academic Press, 1975, pp. 613- 703.
25. Arambula E, Aguilar L. Vaca JC, Vaca G: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency mutations and haplotypes in Mexican mestizos. *Blood Cells Mol Dis* 26(4): 387, 2000
26. Spolarics Z, Siddiqi M, Siegel JH, Garcia ZC et al: Increased incidence of sepsis and altered monocytes function in severely injured type A- glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient African American trauma patients. *Crit Care Med* 29(4):728, 2001.
27. Vives-Corrons JL; Kuhl W; Pujades MA; Beutler E: Molecular genetics of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) Mediterranean variant and description of a new G-6-PD mutant, G-6-PD Andalus 1361A. *Am J Hum Genet* 47 (3): 575-579, 1990
28. Hundsdoerfer P, Vetter B, Kulozzik AE. Chronic haemolytic anaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Case report and review of the literature. *Acta Haematol* 108 (2): 102, 2002.
29. Fiorelli G, Martinez Di Montemuro F, Capellini MD: Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13 (1): 39, 2000.

ANEMIA HEMOLÍTICA POR DEFICIENCIA DE
GLUCOSA-6- FOSFATO DESHIDROGENASA G-6-
PD) ASOCIADA CON CLÍNICA DE ENFERMEDAD
GRANULOMATOSA CRÓNICA

ANEMIA HEMOLÍTICA POR DEFICIENCIA DE GLUCOSA-6- FOSFATO DESHIDROGENASA G-6-PD) ASOCIADA CON CLÍNICA DE ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

Müller A., Carneiro M., Colloca de Moreno M., Soyano A.E., Soyano A.
Instituto de Oncología y Hematología M.S.D.S-UCV, Clínica El Ávila, Hospital
Central de Puerto Ordaz, Hospital Central de Acarigua. Centro de Medicina
Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

RESUMEN

Se reportan dos familias con deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PD) asociada a clínica de enfermedad granulomatosa crónica. Dos de los propósitos estudiados pertenecientes a una familia de Ciudad Bolívar presentaron desde la niñez infecciones bacterianas recurrentes manifestadas como abscesos en piel, neumonías y además anemia hemolítica congénita crónica, la cual se agravaba durante los períodos de infección y ameritaban transfusiones de concentrado globular. Se demostró la disminución severa de la G-6-PD en eritrocitos y leucocitos y disminución de la capacidad letal de los neutrófilos. Se estudió otra paciente de 5 años de edad con anemia hemolítica por drepanocitosis y talasemia, con infecciones recurrentes en piel y neumonías, cuyos eritrocitos y leucocitos eran deficientes en G-6-PD y los neutrófilos también presentaban una alteración de la capacidad letal. De acuerdo a la clínica y hallazgos de laboratorio dichos pacientes fueron diagnosticados de anemia hemolítica congénita por deficiencia de G-6-PD con clínica de enfermedad granulomatosa crónica

La enfermedad granulomatosa crónica es el resultado de una anomalía hereditaria de la función de las células fagocíticas, en la cual la generación de superóxido por la oxidasa del estallido respiratorio está ausente o marcadamente deficiente en las células fagocíticas, que son los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, y los eosinófilos. La generación de superóxido es indispensable para que las células fagocíticas puedan matar los microorganismos ingeridos. Los pacientes que sufren esta enfermedad presentan infecciones bacterianas recurrentes desde la infancia, aunque en casos menos severos la presentación ocurre en la adolescencia o en el adulto joven. Las infecciones para cierto tipo de bacterias ocurren en forma de abscesos profundos en el tejido celular subcutáneo, en nódulos linfáticos, o en hígado o infecciones de los senos paranasales o los pulmones. La deficiencia severa de la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa en los leucocitos se asocia a un cuadro clínico similar o parecido a una enfermedad granulomatosa crónica con infecciones recurrentes. (1 - 5).

El papel principal de las células fagocíticas es la defensa contra una variedad de infecciones producidas por gérmenes gram negativos o positivos catalasa positivos. Dicha función la cumple a través del proceso de fagocitosis de microorganismos invasivos, ya sean bacterias, virus u hongos (6).

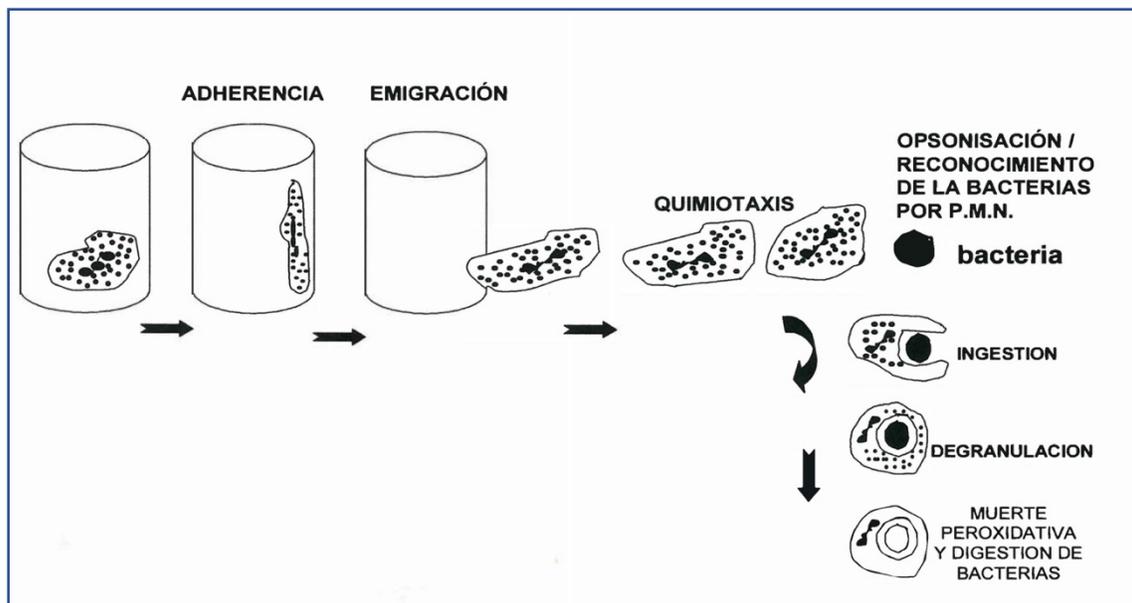
La fagocitosis comprende varias etapas:

1. Adherencia de células fagocíticas al endotelio vascular mediada por los receptores de adhesión de integrinas de los neutrófilos a las moléculas de adhesión (ICAMs) del endotelio, penetración a través de la membrana basal y migración direccional desde el lecho vascular hacia los tejidos atraídos por la presencia de un gradiente de factores quimiotácticos (fenómeno conocido como quimiotaxis) (6 -11).
2. Oponización (12).
3. Endocitosis o ingestión de los microorganismos (13).
4. Degranulación (14).
5. Activación metabólica, capacidad letal y digestión (15, 16) [Fig. 1].

Ante la presencia de microorganismos invasores ocurre el proceso de quimiotaxis, las células fagocíticas se dirigen desde el lecho vascular hacia los microorganismos, atraídos por factores quimiotácticos producidos por el huésped (C5a, leucotrieno B4), como mecanismo de defensa, y otros factores producidos por estos mismos agentes infecciosos (17).

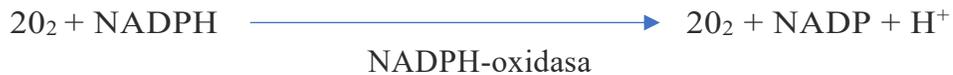
Después que las células fagocíticas se han movilizadо hacia los microorganismos infecciosos, ocurre el proceso de reconocimiento de los agentes invasores. Estos microorganismos son previamente opsonizados, es decir, recubiertos por una serie de factores humorales u opsoninas (anticuerpos opsonicos: IgG1, IgG3, IgM y productos proteolíticos de clivaje del C3: C3b, C3bi, C4b). El reconocimiento se realiza mediante receptores presentes en las células fagocíticas para las opsoninas (FcyRIA; FcyRIIA, B; FcyRIIff; CR1; CR3) lo cual permite la fijación de los microorganismos recubiertos de opsoninas sobre la superficie de las células fagocíticas (6, 18).

Figura 1
FASES DE LA FABCITOSIS

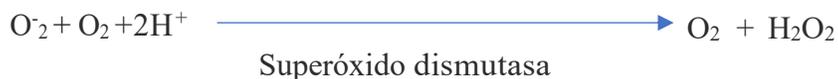


A continuación, ocurre el proceso de endocitosis, para lo cual, las células fagocíticas comienzan a emitir pseudópodos que engloban los microorganismos, formándose un fagosoma o vacuola que contiene al agente infeccioso. Una vez formado este fagosoma en citoplasma, los lisosomas se fusionan con él, formándose el fagolisosoma. Los lisosomas liberan dentro del fagolisosoma numerosas enzimas líticas y agentes oxidantes letales para los microorganismos infecciosos (19).

El sistema letal principal va a estar constituido por la mieloperoxidasa, el H_2O_2 los iones cloro y yodo. Segundos después del contacto con los microbios opsonizados o las altas concentraciones de factores quimiotácticos se produce un gran aumento en el consumo de oxígeno, a menudo más de 100 veces. La enzima responsable de este fenómeno es la NADPH-oxidasa, la cual está asociada las membranas fagolisosomales; ella cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH al oxígeno molecular, formándose el radical superóxido (O_2^-), el cual es el precursor de una familia de potentes oxidantes que son esenciales para la destrucción de muchos microorganismos. Estos cambios en el metabolismo oxidativo son conocidos como estallido respiratorio, nombre que se deriva del incremento del consumo de oxígeno por las células fagocíticas. En el estallido respiratorio 2 moléculas de oxígeno son reducidas por la enzima NADPH-oxidasa, que es una flavoenzima que utiliza como coenzima el NADPH generado en la oxidación de la glucosa por la vía metabólica de la hexosa monofosfato:

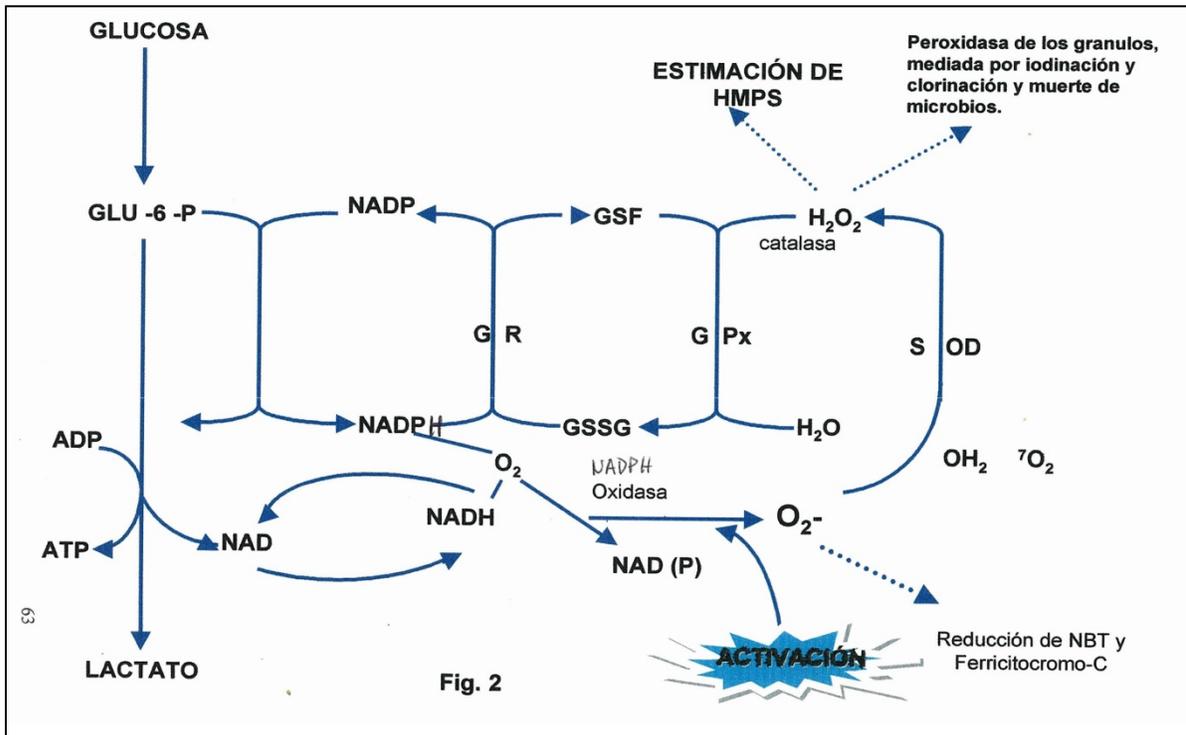


A su vez, 2 moléculas de superóxido se combinan en presencia de la enzima superóxido dismutasa para formar H_2O_2



La mieloperoxidasa es depositada por degranulación en las vacuolas fagocíticas, donde en presencia de H_2O_2 y radicales haluros catalizan las reacciones microbicidas convirtiendo el H_2O_2 en ácido hipocloroso (HOCl). El peróxido de hidrógeno puede ser convertido en el radical hidroxilo (OH) en una reacción no enzimática con O_2^- catalizada por iones hierro o cobre. El H_2O_2 , HOCl, y OH son oxidantes fuertes que participan en la capacidad letal o microbicida dentro de la vacuola fagocítica (21-24) [Fig. 2].

Figura 2
REDUCCIÓN METABÓLICA EN NEUTRÓFILOS



En ausencia de G-6-PD no se produce NADPH y por lo tanto el poderoso mecanismo letal que poseen las células fagocíticas no funciona adecuadamente, produciéndose infecciones recurrentes en el huésped, imitando el fenotipo de la enfermedad granulomatosa crónica [6, 25, 26].

Los pacientes con deficiencia severa de la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa pueden presentar alteraciones de la actividad de la NADPH oxidasa y una historia de infecciones recurrentes, imitando el fenotipo de la enfermedad granulomatosa crónica (27).

La EGC también ha sido reportada asociada a deficiencia de mieloperoxidasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión sintetasa (6, 51).

MÉTODOS

A cada paciente se le practicó examen físico, hematología, conteo de reticulocitos, determinación de la concentración sérica de bilirrubina total y fraccionada, curva de fragilidad globular, electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, cuantificación de la Hb A2 (28,29), y Hb F por inmunodifusión radial (Laboratorios Helena), cuantificación de la concentración intraeritrocítica de las enzimas de la vía glicolítica y de la hexosa monofosfato por espectrofotometría: glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PD), 6-fosfogluconato dehidrogenasa (6-PGD), glutatión reductasa (GR), hexoquinasa (HX), glucosa-fosfato-isomerasa (GPI), gliceraldehido-fosfato-dehidrogenasa (GPD), fosfogliceroquinasa (PGK), difosfogliceromutasa (DPGM), monofosfogliceromutasa (MPGM), enolasa, piruvatoquinasa (PK) y deshidrogenasa láctica (LDH) (30). Cuantificación de la concentración de IgG, IgA e IgM por inmunodifusión radial (31), cuantificación del complemento CHSO, C3, C4 (32). Determinación de la función fagocítica: Endocitosis con *Candida albicans*, reducción del NBT (nitrobluetetrazolium), capacidad bactericida contra *Stafilococcus aureus*, y capacidad candidicida (33, 34).

RESULTADOS

Inmunidad humoral y función fagocítica en dos familias deficientes en G-PD y enfermedad granulomatosa crónica.

I. Estudio de la familia GZ.

Motivo de consulta:

Los propósitos de la familia eran dos varones de 5 y 11 años, naturales de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, los cuales consultaron por infecciones a repetición desde los tres años de edad que se acompañaban de anemia intensa de 3 g/dl, fiebre, vómitos, dolor abdominal, e ictericia que ameritaba hospitalización para tratamiento con antibióticos intravenosos y transfusiones de concentrado globular con una frecuencia de tres veces por año [Fig. 3]. Ambos pacientes tenían antecedentes de crisis repetitivas de forunculosis en piel, principalmente en miembros inferiores y tórax, secundaria a *Stafilococcus aureus* y abscesos en ganglios de las regiones inguinales que ameritaron drenaje quirúrgico. En algunas oportunidades se les hizo el diagnóstico de hepatitis y septicemia. Durante estas crisis los pacientes presentaban ictericia con aumento de la bilirrubina indirecta

Antecedentes personales:

Ictericia neonatal y anemia después de las primeras 24 horas del nacimiento que ameritó fototerapia en ambos pacientes. Niegan exanguinotransfusión. El paciente de 11 años de edad tiene como antecedente una glomerulonefritis aguda a los 10 años, cayendo su hemoglobina rápidamente a 6,7 g/dl y requiriendo transfusión de concentrado globular.

Antecedentes familiares:

Cuatro hermanos varones habían muerto por infección y anemia a diferentes edades. El primer hermano, fallecido a los 13 años por septicemia y anemia hemolítica, tenía antecedentes de ictericia neonatal, crisis hemolítica e infecciones cada 3-6 meses desde la niñez, que ameritaban hospitalización para transfusiones de concentrado globular y antibioticoterapia, y con frecuencia presentaba forunculosis en piel por *Stafilococcus aureus*

que cedían con tratamiento con antibióticos incluyendo Prostaflina. Este paciente al examen físico presentaba ganglios en regiones inguinales.

El segundo hermano fallecido fue un mortinato a término.

El tercer hermano fallecido era un neonato nacido de parto normal con un peso de 4.200 g, quien presentó a las 24 horas de su nacimiento anemia hemolítica e ictericia. Este neonato desarrolló un síndrome febril y muere a los 30 días complicado con meningitis.

El cuarto hermano con la misma clínica de crisis de anemia hemolítica e infecciones a repetición muere a los 12 años de edad (no estudiado).

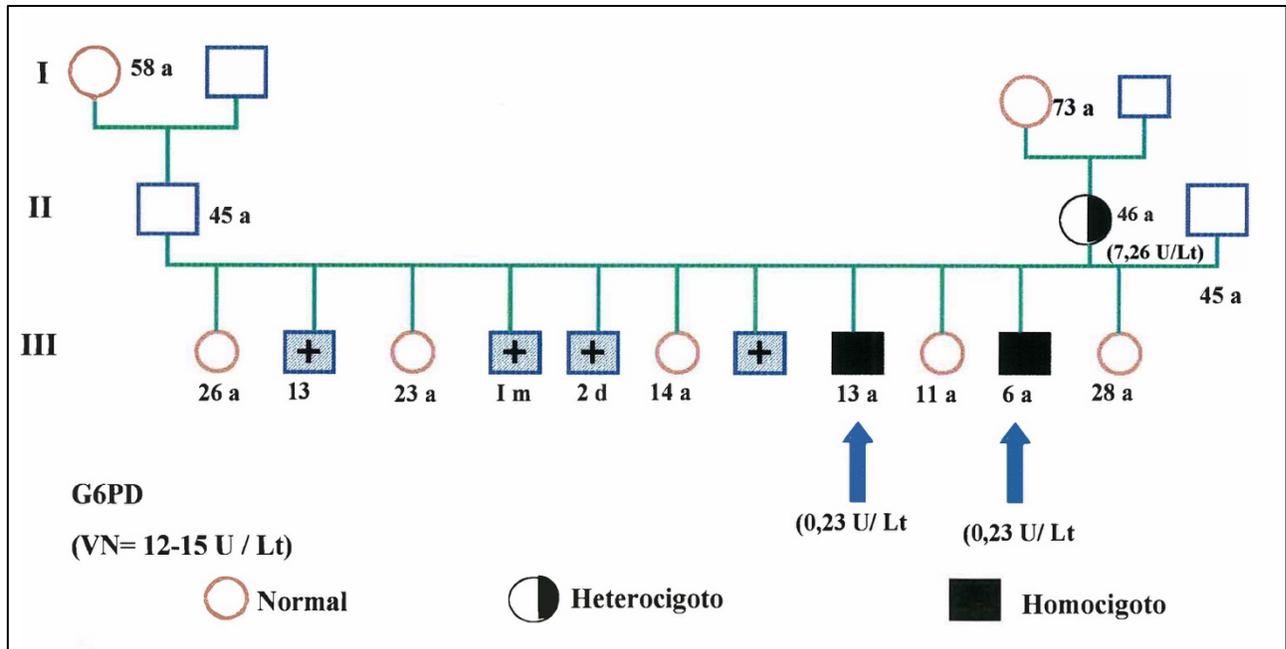
Los padres de los propósitos son asintomáticos. La madre tiene 46 años y el padre 45 años, sin antecedentes personales de anemia e ictericia, con exámenes físicos normales [Fig.3].

Examen físico:

Paciente [O.G.] de 11 años de edad, al examen físico presenta ictericia conjuntival, palidez de piel y mucosas, lesiones residuales en miembros y tórax de forunculosis previas, polo esplénico palpable, hígado palpable a 1 cm del reborde costal derecho.

Paciente [E.G.] de 5 años de edad, al examen físico presenta ictericia conjuntival palidez de piel mucosas, lesiones residuales en miembros y tórax de forunculosis previas, polo esplénico palpable, hígado palpable a 1cm del reborde costal izquierdo.

FIGURA 3
DEFICIENCIA DE G-6-PD Y ENF. GRANULOMATOSA CRÓNICA



Hallazgos de laboratorio:

I. Paciente [O.G.]

Hematología: Hb: 10,5 g/dl, Hto: 39%, reticulocitos: 7,5% (recibió transfusión 2 semanas antes), conteo blanco: 4.811 /dl, diferencial: 45 neutrófilos, 19 eosinófilos, 31 linfocitos, 4 monocitos, 1 basófilo [Tabla I].

Química sanguínea:

Transaminasas: S.G.P.T.: 15 U/l [V.N: 8-30], S.G.O.T.: 23 U/l [V.N: 7-27], hierro sérico: 251 mcg/dl [V.N:60-160], L.D.H.: 173 U/l [V.N: 47-140].

Perfil para detectar hemoglobinopatías y talasemia:

Electroforesis de Hb: AA

Cuantificación de Hb A2: 3% [V.N.: 2,2- 3,3 %]

Cuantificación de Hb fetal: 1% [V.N.: 2,2-3,3 %]

Prueba de inestabilidad de la hemoglobina: negativa.

TABLA I
HEMATOLOGÍA DE LA FAMILIA GONZ. CON DEFICIENCIA DE G-6-PD
Y ENFERMEDAD GRANULOCITICA CRÓNICA

MIEMBRO	EDAD (años)	HB g/dl	Hto (%)	Ret. (%)	C. Blanco /mm³	Neu (%)t.	Linf. (%)
MADRE	46	12,0	40	4,3	4205	45	50
PADRE	45	13,6	45	0,5	5655	66	33
HERMANA	23	11,0	38	1,5	6130	51	42
HERMANA	14	11,1	39	1,2	4892	61	31
HERMANA	12	12,0	40	1,8	6980	39	50
PROPOSITO	11	9,7	36	14,0	6596	45	46
PROPOSITO	5	10,5	39	7,5	4811	45	31

Cuantificación de las eritroenzimas de las vías hexosa monofosfato y glicolíticas y de la G-6-PD intraleucocitaria [Tabla II].

Estudio de la inmunidad humoral:

Niveles séricos de inmunoglobulinas:

IgG: 1.070 mg/dl [V.N.: 575- 1.607]

IgM: 280 mg/dl [V.N.: 26- 105]

IgA: 260 mg/dl [V.N.: 94 - 588]

Concentración sérica de complemento:

CH50: 122U. hem/cc [V.N.: 150- 250]

C3: 158 mg/dl [V.N.: 90- 190]

C4: 31 mg/dl [V.N.: 20- 40]

Paciente [E.G.]

Hematología: Hb: 9,7 g/dl; Hto: 36 %; reticulocitos: 14 %, contaje blanco: 6596/ 01, diferencial: 45 segmentados, 6 eosinófilos, 46 linfocitos, 2 monocitos, 1 basófilo [Tabla 1].

Química sanguínea: S.G.P.T: 17 UIL [V.N.: 8 - 30], S.G.O.T.: 29 UIL [V.N: 7 - 27], bilirrubina total: 2,17 mg/dl [V.N: 0,2- 1,2], bilirrubina directa: 0,31 mg/dl [V.N.: 0- 0,4], hierro sérico: 18 mcg/dl [V.N: 60 - 160], L.D.H.: 153 U/1 [V.N.: 47- 140].

Perfil para detectar hemoglobinopatías y talasemias:

Electroforesis de Hb: AA

Cuantificación de Hb A2: 3% [V.N: 2,2 - 3,3

Cuantificación de Hb Fetal: 1% [V.N: 0,5- 1,2]

Prueba de inestabilidad de la Hb: negativa.

Cuantificación de las enzimas de vías de la hexosa monofosfato y glicolíticas, y de la G-6-PD en eritrocitos y leucocitos [tabla II].

Estudio de la inmunidad humoral:

Concentración sérica de inmunoglobulinas:

IgG: 1.150 mg/dl [V.N.: 575- 1.607]

IgM: 240mg/dl [V.N.: 26 - 105]

IgA: 180mg/dl [V.N.: 94- 588]

Concentración sérica de complemento:

CH50: 128U. hem / ce [V.N.: 150- 250]

C3: 146 mg/dl [V.N.: 90- 190]

C4: 31 mg/dl [V.N.: 20- 40]

Estudio de laboratorio de los padres y hermanos de los propósitos: hematología, cuantificación de las enzimas de los ciclos hexosa monofosfato y glicolíticos, inmunidad humoral aparecen en las tablas I, II, III, IV

TABLA II
NIVELES DE LAS ENZIMAS INTRAERITROCÍTICAS
DE LA FAMILIA GONZ. CON DEFICIENCIA DE G-6-PD
Y ENFERMEDAD GRANULOCITICA CRÓNICA

MIEMBRO	EDAD (años)	G-6-PD UI/gHb	G-6-PD UI/gHb	GR UI/g Hb
MADRE	46	7,26	5,2	3,5
PADRE	45	12,59	4,0	3,8
HERMANA	23	12,25	4,9	3,9
HERMANA	14	13,71	5,1	4,0
HERMANA	12	12,10	4,1	4,4
PROPÓSITO	11	0,23	7,0	5,9
PROPÓSITO	5	0,23	7,0	5,9
VALORES NORMALES		12-15	1,35-6,07	3,5-4,5

G-6-PD: GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

6-PG: 6 FOSFOGLUCONICO DESHIDROGENASA

GR: GLUTATION REDUCTASA

TABLA II-a

ENZIMAS	MADRE 46 años	PADRE 45 años	PROPÓSITO 11 años	PROPÓSITO 5 años
1.Hx (V.N.: 0,81-1,27)	1,1	1,2	1,8	1,5
2. G-P-I (V.N.: 37,2-57,8)	41,2	50,5	60,2	65,3
3. G.AP.D (V.N.: 184-268)	200	210	226	230
4. P.G.K (V.N.: 688-782)	666	676	775	785
5. P.G.M. (V.N.: 0,633-0,053)	0,633	0,634	0,644	0,645
6. Enolasa (V.N.: 0,69-0,71)	0,690	0,700	0,710	0,715
7. P.K. (V.N.: 13-17)	15	16	20	19
8.L.D.H. (V.N.: 170-210)	220	210	222	210

Hx: hexoquinasa

GPI: glucosa fosfatoisomerasa

GAPD: GLICEROALDEHIDO FOSFATO DESHIDROGENASA

Pgk: fosfogliceroquinasa

PGM: fosfo glicero mutasa

PK: piruvato quinasa

LDH: deshidrogenasa láctica

TABLA III
NIVELES SÉRICOS, CAPACIDAD TOTAL DE FIJACIÓN E ÍNDICE DE SATURACIÓN DE LA FERRITINA DE LA FAMILIA GONZ. CON DEFICIENCIA DE G-6-PD Y ENFERMEDAD GRANULOCITICA CRÓNICA

MIEMBRO	EDAD (años)	HIERRO mcg/dl	CAPACIDAD mcg/dl	GR UI/g Hb %
MADRE	46	60	250	24,00
PADRE	46	70	266	26,31
HERMANA	23	99	229	43,23
HERMANA	14	43	267	16,00
HERMANA	11	89	230	38,69
PROPÓSITO	13	99	266	43,23
PROPÓSITO	6	138	222	62,16
VALORES NORMALES		60-160	250-400	20-55

TABLA IV
ESTUDIO DE LA INMUNIDAD HUMORAL DE LAS FAMILIAS GONZ.
Y Ve CON DEFICIENCIA DE G-6-PD Y ENFERMEDAD
GRANULOMATOSA CRÓNICA

MIEMBRO	INMUNOGLOBULINA			COMPLEMENTO		
	IgG	IgA (mg/dl)	IgM	CH50 U/H/cc	C3 (mg/dl)	C4
1. FAMILIA GONZ.						
MADRE (46 a)	1360	270	190	135	158	24
PADRE (45 a)	1150	150	130	172	174	49
PROP. (13 a)	1070	260	280	122	158	31
PROP. (6 a)	1150	180	240	128	146	31
1. FAMILIA Ve						
MADRE (25 a)	1400	260	180	140	160	40
PADRE (26 a)	1200	150	130	160	160	35
PROP. (5 a)	2072	264	107	150	175	49
V.N (adultos)	650-1600	40-350	55-300	150-250	90-190	20-40

Estudio de la función fagocítica de los polimorfonucleares:

Los propósitos de la familia GZ con deficiencia de G-6-PD, varones hemicigotos O.G. de 11 años y E.G. de 5 años presentaron disminución marcada de diversas funciones relacionadas con la fagocitosis de su polimorfonucleares:

1. De la endocitosis de *Candida albicans*
2. De la capacidad de reducción del NBT
3. De la capacidad bactericida contra estafilococos
4. De la capacidad candidicida contra *C. albicans*.

En cambio, los polimorfonucleares del padre presentaron la función de fagocitosis [endocitosis, reducción del NBT, capacidad bactericida y candidicida] completamente normal como puede apreciarse en la Tabla V.

Los polimorfonucleares de la madre, por el contrario, presentaron una función de fagocitosis disminuida pero sólo moderadamente, con valores más altos que la de sus hijos propósitos de este estudio, pero menores que los valores normales obtenidos en donantes de sangre, usados como controles. Es decir, los valores de las diferentes pruebas de fagocitosis realizada a los polimorfonucleares de la madre de los propósitos dieron valores intermedios entre los normales y los deficientes en la función de fagocitosis [Tabla V].

TABLA V
ESTUDIO DE LA FUNCIÓN FAGOCITICA DE LOS POLIMORFONUCLEARES
DE LAS FAMILIAS GONZ. Y ve. DEFICIENTES EN G-6-PD Y CON
ENFERMEDAD GRANULOCÍTICA CRÓNICA

MIEMBRO	ENDOCITOSIS	N.B.T	CAP.S Aureus	BACTERICIDA C.albicans
1. FAMILIA GONZ.				
MADRE	54	52	dism.	45
PADRE	85	85	normal	66
HIJO (13 años)	20	11	dism.	45
HIJO (6 años)	63	44	dism.	33
2. FAMILIA Ve				
MADRE	80	74	dism.	
PAADRE	63	95	normal	
HIJA (5 años)	60	8	dism.	
V.N.	85-90	85-95		60-80

2. ESTUDIO DE LA FAMILIA Ve

Motivo de consulta:

Paciente femenina de 5 años de edad, natural de Acarigua, Estado Portuguesa, quien consulta por cuadros de infecciones a repetición y anemia e ictericia que ameritaban hospitalización para tratamiento con antibióticos y transfusión de concentrado globular.

Antecedentes personales:

A los 8 meses de edad presentó bronconeumonía y anemia con reducción de la hemoglobina a 3 g/dl requiriendo hospitalización para antibioticoterapia parenteral y transfusión de concentrado globular. Desde ese momento presentó crisis de bronconeumonía cada vez que tenía cuadros virales, los cuales evolucionaron a 9 neumonías, siendo 8 del pulmón derecho y 1 del izquierdo. Ameritó transfusión de concentrado globular en 10 oportunidades. Presentó 3 infecciones urinarias en el transcurso del último año. Presentó un absceso de la fosa nasal derecha que ameritó tratamiento con antibióticos parenterales.

Examen físico:

Preescolar de tipo mestizo con ictericia y palidez mucocutánea, sin visceromegalia.

Hallazgos de laboratorio

Hematología: Hb: 6,98 g/dl, Hto: 21 %, contaje de reticulocitos: 18 %, contaje de blanco 270.000/ μ L contaje de plaquetas: 334.000/mm³.

Química sanguínea: glicemia: 69 mg% (V.N.: 65 - 110), urea: 9 mg% (7-18), L.D.H.: 177 U/l (V.N.: 49 -1.140), fosfatasas alcalinas: 69 mg% (19-82), ácido úrico: 4,88 mg %, S.G.P.T.: 11 U/l (8- 30), S.G.O.T.: 23 U/l (7- 27).

Perfil para detectar hemoglobinopatías y talasemias

Electroforesis de Hb: Hb S + HbA + aumento de la HbA2.

Cuantificación de la Hb A2: 4,1% (V.N.: 2,2- 3,3)

Cuantificación de la Hb fetal: 0,55 (V.N.: 0,5- 1,2 %)

Prueba de la inestabilidad de la Hb: negativa.

Cuantificación de la enzima G-6-PD: muestra valores del 10 % de lo normal.

Estudio de la inmunidad humoral

Concentración séricas de inmunoglobulinas:

IgG: 2.072 mg% [V.N: 571 - 1607]

IgM: 107 mg% [V.N: 26- 105]

IgA: 264 mg % [V.N: 94 - 588]

Concentración sérica de complemento

CH50: 150 U. hem./ml [V.N.: 150- 250]

C3: 175 U. hem./cc [V.N.: 90- 190]

C4: 49 U. hem./cc [V.N.: 20- 40]

Estudio de la función fagocítica de los polimorfonucleares

La paciente presentó una marcada disminución de la función fagocítica de sus polimorfonucleares [Tabla V]:

1. De la endocitosis de *Candida albicans*: 60 % [V.N: 85 - 95]
2. De la capacidad de reducción del NBT: 8 % [V.N: 85 - 95]
3. De la capacidad bactericida contra estafilococos: disminuida, los neutrófilos del paciente no mataron los estafilococos ingeridos, y éstos crecieron en la placa de agar.
4. De la capacidad candidicida contra *C. albicans*.

Los polimorfonucleares del padre presentaron la función de fagocitosis de sus polimorfonucleares normal; en cambio los de la madre mostraron un valor subnormal de endocitosis, pero normal de N.B.T. [Tabla V].

DISCUSION

Detectamos sólo dos familias con anemia hemolítica por deficiencia de G-6-PD, cuyos propósitos presentaban cuadro clínico similar a enfermedad granulomatosa crónica. La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es un trastorno genético heterogéneo raro, que ocurre aproximadamente en 1 de 500.000 individuos y es causado por fallas en el sistema del estallido respiratorio en neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos (34). En la mayoría de los pacientes (más del 90%) el defecto es tan grande que virtualmente no se genera O₂. En el resto de los pacientes con EGC solo un pequeño estallido respiratorio es observado (aproximadamente de 1-10% de

lo normal) y se dice que estos pacientes poseen una variante de EGC (20). En todos los casos analizados el efecto a nivel molecular es causado por mutaciones de una de las 4 subunidades de la NADPH-oxidasa (6,20). Los genes para esos componentes están ubicados en cromosomas autosómicos o en el cromosoma X, lo cual explica la heterogeneidad de la EGC. Puesto que los productos generados en el estallido respiratorio juegan un papel importante en la capacidad microbicida de las células fagocíticas, no es de extrañar que los pacientes afectados sufran de una serie de infecciones bacterianas y micóticas, muchas de ellas severas que ponen en peligro su vida. La EGC se puede manifestar desde el primer año de edad. Los sitios principales de infección son: los pulmones, la piel y el tracto gastrointestinal. Estas localizaciones están de acuerdo con el concepto de que los neutrófilos nos proveen la primera línea de defensa del organismo. Los patógenos más comunes incluyen *Staphylococcus aureus*, especies de *Aspergillus*, una gran variedad de bacilos gram negativos que incluyen *Serratia marcescens*, varias especies de salmonelas y *Pseudomonas cepacia* (36). Por largos años ha sido observado que estos pacientes son susceptibles a solo cierto tipo de bacterias catalasa positiva, las cuales metabolizan el H₂O₂ que requiere la NADPH-oxidasa como sustrato para que se lleve a cabo el mecanismo bactericida dentro de las células fagocíticas (23).

Los propósitos de la familia GZ y de la familia Ve pueden ser catalogados como afectos de una EGC secundaria a deficiencia de G-6-PD en los neutrófilos, siguiendo los postulados de Cumutte (26) para el diagnóstico de deficiencia de G-6-PD en los neutrófilos. Los propósitos de la familia GZ de este estudio presentaron infecciones recurrentes desde muy temprana edad, que incluyeron abscesos en piel, tejido celular subcutáneo, neumonías, por *Staphylococcus aureus* imitando clínicamente una enfermedad granulomatosa crónica.

La EGC en nuestros pacientes deficientes en G-6-PD puede explicarse porque la NADPH., que es la coenzima de la oxidasa que interviene en el estallido respiratorio es generada por las primeras 2 reacciones de la hexosa monofosfato, la G-6-PD y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD), siendo la G-6-PD la primera enzima en la vía, su ausencia resulta en disminución marcada de la actividad del ciclo de la hexosa monofosfato

y por ende en la disminución marcada de la producción de NADPH. Estos pacientes con deficiencia de G-6-PD marcada en sus neutrófilos presentan un estallido respiratorio muy disminuido y un cuadro clínico similar a la EGC (44 - 47).

Dada la alta frecuencia de mutaciones para la G-6-PD en negros americanos y poblaciones de origen mediterráneo, y que la G-6-PD de los eritrocitos y los leucocitos es codificada por el mismo gen (48,49) uno esperaría encontrar con frecuencia EGC secundaria a deficiencia de G-6-PD mas elevada; sin embargo, muy pocos casos han sido reportados en la literatura. Esta relativa baja frecuencia probablemente se debe a que los neutrófilos deben de tener niveles de G-6-PD menores del 5 % para que el cuadro clínico se presente, ya que estudios con variantes de G-6-PD han demostrado que una actividad de estallido respiratorio de los neutrófilos tan baja como 5-10 % de lo normal, es capaz de todavía de brindar protección; sólo un grupo muy raro y poco entendido de mutantes de G-6-PD causa la concentración tan baja de G-6-PD dentro de los neutrófilos (50).

Los propósitos que estamos reportando heredaron la deficiencia de G-6-PD de su madre, como quedó establecido en los estudios de los niveles intraeritrocíticos y leucocitarios de G-6-PD medidos, los cuales mostraron que los eritrocitos de la madre tenían la deficiencia de G-6-PD y los estudios de la función fagocítica de los neutrófilos, que mostraron que estos funcionaban anormalmente, lo cual esta de acuerdo con lo reportado anteriormente y recientemente por Agudelo-Flores y col. (36,37).

En el caso de la niña de 5 años de edad de la familia Ve con drepanocitosis- talasemia no encontramos concentraciones intraeritrocíticas disminuidas de la G-6-PD, pero esto puede suceder en las heterocigotas, y no es de extrañar que la prueba de el N. B. T. de la madre dio normal. Las mujeres heterocigotas presentan niveles de G-6-PD que varían desde muy disminuidos (menores del 10 %) hasta valores normales, lo cual se explica que en la madre de esta paciente con el método espectrofotométrico que utilizamos no pudimos detectar la deficiencia de G-6-PD y solamente la asumimos porque es la madre de una paciente deficiente en G-6-PD, que se hereda a través del cromosoma X (38, 39).

Los pacientes propósitos de la familia GZ sufren una anemia hemolítica congénita no esferocítica crónica con Hb de 9,7-10,5, reticulocitosis de 14% y 7,5% respectivamente,

y aumento de la bilirrubina indirecta, dicha anemia hemolítica se agrava con las infecciones y medicamentos oxidantes, como es el cuadro clínico de una anemia hemolítica por deficiencia de G-6-PD y se demostró que tanto los eritrocitos como los leucocitos de dichos propósitos y familiares presentaban la deficiencia de G-6-PD (40 - 42).

La paciente con drepanocitosis-talasemia también posee una anemia hemolítica crónica, pero en este caso está asociada la drepanocitosis-talasemia con la deficiencia de G-6-PD, lo cual ha sido reportado previamente (43).

La actividad de G-6-PD en los neutrófilos de los propósitos fue menor del 5% por lo cual presentaron disminución del estallido respiratorio y de la prueba del NBT. En estos pacientes dio valores de 11 y 44% en los propósitos de la familia GZ y de sólo 8% en la niña con drepanocitosis-talasemia (VN: 85 - 95%). Estos valores guardan relación con lo reportado previamente en la asociación entre deficiencia de G-6-PD y el cuadro clínico parecido a una EGC (44- 47).

BILIOGRAFIA

1. Stossel T., Babior B. Structure, function, and functional disorders of the phagocyte System. Handin R., Lux S. and Stossel T (Eds) Cap. 19, pag 575 J.B. Lippincott Co, 1995.
2. Johnston RB, Newman SL. Chronic granulomatous disease. *Podiatry Clin North Am*, 24: 365, 1977
3. Baehner RL. Neutrophil dysfunction associated with states of chronic and current infection. *Pediatr Clin North Am*, 27: 377, 1980.
4. Forrest CB, Forehand JR, Axtell RA, Roberts RL, Jhonston RB. Clinical features and management of chronic granulomatous disease. *Hematol. Oncol. Clin North Am*, 2: 253, 1988.
5. Bellinati-Pires R, Araujo MI, Cameiro-Sampaio MM. Primary disorders of neutrophils: principal clinical and laboratory aspects. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo* 47(2): 79, 1992.

6. Dinauer M. The phagocytic system and disorders of granulopoiesis and granulocyte Function. En: Nathan D and Orkin S. Cap. 22, pag. 889, 1998 W.B Saunders Co.
7. Springer TA. Traffic signal for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. The multistep paradigm. *Cell* 76: 310, 1994.
8. Albelda SM, Smith CW, Ward PA: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J*, 8: 504, 1994.
9. Carlos TM., Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068,1994.
10. Lasky LA: Combinatorial mediators of inflammation? *Curr Biol* 3: 366, 1993
11. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425, 1990.
12. Huizinga TWJ, Roos D, van dem Borne AE. Neutrophil Fc-D receptors. A two-way bridge in the immune system. *Blood* 75: 1211, 1991.
13. Ezekowitz RA, Williams DJ et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* is mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351: 155, 1991.
14. Boxer LA, Smolen JE. Neutrophil granule constituents and their release in health and disease. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2:101, 1988.
15. Elbash P, Weiss J: Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes. En: Gallin II, Goldstein IM, Snyderman R (eds). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.* pag. 603, 1992. New York, Raven Press
16. Arnold R, Cole MF, Me Ghee JR. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 197: 263, 1977.
17. Devreotes PN, Zigmond SH. Chemotaxis in eucaryotic cells. A focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annu Rev Cell Biol* 4: 649, 1988.
18. McKenzie SE, Schreiber AD. Biological advances and clinical applications of Fc receptors for IgG. *Current Opin Hematol* 1:45, 1994.
19. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N England J Med* 320: 365, 1989.
20. Smith RM, Curnutte JT: Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 7: 673, 1991.

21. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defenses mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741, 1973.
22. Klebanoff SJ. Oxygen metabolites from phagocytes. En: Gallin II, Goldstein IM, Snyderman R (eds). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. pag. 521, 1992. New York, Raven Press.
23. Maandell GL. Hook EW: Leukocyte bactericidal activity in chronic granulomatous disease. Correlation of bacterial hydrogen peroxide production and susceptibility in intracellular killing *J. Bacteriol.* 100: 531. 1969.
24. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidant and antioxidants. State of the art. *Am J Med* 91(3): 2, 1991.
25. Baehner RL, Johnston Rb et al: Comparative study of metabolic and bactericidal characteristics of severely glucose-6 phosphate dehydrogenase deficient polymorphonuclear leukocytes and leukocytes from children with chronic granulomatous disease *J. Reticuloendothel Soc.* 12: 150, 1972.
26. Curnutte JT, Babior BM. Chronic granulomatous disease. En: *Advances in Human Genetics*. Harris H and Hirschhorn K (eds) New York, Plenum Pub. Corp 1987, pp. 229-297.
27. Cohen MS, Isturiz, RE et al: Chronic granulomatous disease. *Ann. Intern Med.* 99:657-1983.
28. The International Committee for Standardization in Hematology. Simple electrophoretic system for presumptive identification of abnormal hemoglobins. *Blood* 52: 1058, 1978.
29. Bernini LR. Rapid determination of Hemoglobin A2 by DEAE cellulose chromatography. *Biochem Genet* 2: 305, 1969.
30. Beutler E. *Red Cell Metabolism: A manual of Biochemical Methods*. 2nd Edition, 1975 Grune & Stratton, New York.

31. Milford-Ward A: Immunoprecipitation in the evaluation of the proteins in plasma and body fluids. En: Thompson RA (eds), *Techniques in Clinical Immunology*, 2nd edition, 1981. Blackwell Scientific Publication
32. Brown D, Hobart MJ. Complement and complement fixation. En: Thompson RA (eds), *Techniques in Clinical Immunology*, 2nd edition, 1981. Blackwell Scientific Publications.
33. Wilkinson PC. Neutrophil leukocyte function tests. En: Thompson RA (eds), *Techniques in Clinical Immunology*, 2nd edition, 1981. Blackwell Scientific Publication
34. Stossel TP. Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. *Blood* 42: 121, 1973.
35. Cornutte JT: Disorders of phagocyte function. In: *Hematology: Basic Principles and Practice*. Hoffman R, Benz EJ et al. (eds), pag. 577, New York, Churchill Livingstone, 1991.
36. Finn A, Hadzic N et al. Prognosis of chronic granulomatous disease. *Arch Dis Child* 65: 942, 1990.
37. Gray GR, Klebanoff SJ et al: Neutrophil dysfunction in chronic granulomatous disease and non-spherocytic haemolytic anemia caused by complete deficiency of glucose-6 phosphate dehydrogenase. *Lancet* 2: 530 1973.
38. Agudelo-Flores P, Costa-Carvalho, Lopez JA, Redher J, Newburger PE, Olalla-Saad ST, Condino-Neto A Association of glucose-6 phosphate dehydrogenase
39. Deficiency and X-linked chronic granulomatous disease in a child with anemia and recurrent infections. *Am J. Hematol* 75(3): 151,2004.
40. Lyon MF. Gene action in X chromosome in the mouse. *Nature* 190:372, 1961.
41. Muller A Anemias hemolíticas congénitas por deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa. En: Perez-Requejo JL (ed) *Hematología Básica* (3^{era} ed). Facultad de Medicina, Univ. de Carabobo.

42. Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, capítulo 58, pag. 561. En: Williams W.J., Beutler E., Erslev A, Lichtman M. (eds) Hematology, McGraw Hill, Inc, 1993.
43. Luzzatto L: G-6-PD deficiency and hemolytic anemia capítulo 19, pag. 674; en: Nathan and Oski (eds), Hematology of Infancy and Childhood, 4th edition, 1993, W. B. Saunders Co.
44. Ahmed SG, Ibrahim UA Clinical significance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Nigerian patients with sickle-cell disease. Niger Postgrad Med J (Nigeria) 9(4):181, 2002.
45. Corberand J, De Larrard B, Vergnes H, Carriere JP. Chronic granulomatous disease with leukocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a 28 month old girl. Am J Clin Pathol 70(2): 296, 1978.
46. Vives Corrons JL, Feliu E et al: Severe glucose-6 phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency associated with chronic hemolytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infection: Description of a new molecular variant (G-6-PD Barcelona). Blood 59: 428, 1982.
47. Mamlok RJ, Mamlok V et al: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, neutrophil dysfunction, and Chromobacterium violaceum sepsis. J Pediatr. 111: 852, 1987.
48. Rosa-Borges A, Sampaio MG, Condino-Neto A, Barreto OC, Nudelman V, Cameiro-Sampaio et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with recurrent infections: case report. J Pediatr (Rio J) 77(4): 331, 2001
49. Yoshida A, Stomatoyannopoulos G et al. Biochemical genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase variation. Ann N Y Acad Sci 155: 868, 1968.
50. Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. New perspectives. Blood 73:1397, 1989.
51. Luzzatto L: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and the pentose phosphate pathway. En: Handin RI, Lux SE, Stossel TP (eds). Blood. Principles and Practice of Hematology J.B. Lippincott Company, 1995. Cap. 58, p 1897.

52. Matsuda I, Oka Y, Taniguchi N et al. Leukocyte glutathione peroxidase deficiency in a male patient with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 88(4): 581, 1976.

**ANEMIA HEMOLÍTICA POR DEFICIENCIA
DE PIRUVATO QUINASA EN VENEZUELA**

ANEMIA HEMOLÍTICA POR DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA EN VENEZUELA

Müller Aixa¹, Soyano Andrés¹, Somoza Rosa¹, Soyano Alberto E.¹, Méndez Gisela¹, Ponte Benita¹, Rector Tovar², Ruiz Francisco³, Mora Julio C.⁴, Bosch Norma⁵, Zaida Araujo

1. Instituto de Oncología y Hematología, MSDS-UCV, Cátedra Obstetricia, Escuela Luis Razetti, UCV, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.
2. Hospital Central Cumaná,
3. Hospital Los Andes, Mérida,
4. Hospital Colón, Edo. Táchira
5. Banco Municipal de Sangre

Correspondencia: asoyano@cantv.net

Aixa Müller, Instituto de Oncología y Hematología, Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Universidad Central de Venezuela

PALABRAS CLAVES:

Hemolysis, anemia, enzima del ciclo glicolítico.

ABREVIATURAS

AHCNE: anemia hemolítica congénita no esferocítica, 3-PG: 3 fosfoglicerato, "- DPG: 2-3 difosfoglicerato, fitohemaglutinina (PHA), Concanavalina A(Con A), y mitógeno de Fitolaca americana (PWN), HUC: Hospital Universitario de Caracas. Hb: hemoglobina, G-6-PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6PGD: 6 -fosfogluconato deshidrogenasa, GR: glutatión reductasa, HX: hexoquinasa, GPI: glucosa-fosfato- isomerasa, GPD: gliceraldehido-fosfato-deshidrogenasa, PGK: fosfogliceroquinasa, DPGM: difosfogliceromutasa, MPGM: monofosfogliceromutasa, PK: piruvatoquinasa, LDH: deshidrogenasa láctica.

RESUMEN

Se presenta los estudios realizados a 2338 pacientes con anemia hemolítica congénita y el análisis del estudio clínico, hematológico, bioquímico e inmunológico realizado a los pacientes que resultaron con deficiencia de piruvato quinasa (PK). Se determinó a PK intraeritrocítica a 642 individuos de diferentes regiones de Venezuela.

La deficiencia de piruvato quinasa representa el defecto genérico más frecuente relacionado con las enzimas del ciclo glicolítico, y su consecuencia fisiopatológica inmediata es la producción de una anemia hemolítica congénita no esferocítica. (1,2)

Aproximadamente 350 individuos con anemia hemolítica por deficiencia de PK han sido reportados. La mayoría de ellos son descendentes de individuos originarios del norte de Europa. Casos esporádicos han sido detectados en negros, japoneses, chinos, mexicanos, europeos del sur y sirios.

En Venezuela, Acquatella, Müller y Francheschi (1970) reportaron el primer caso de anemia hemolítica por deficiencia de PK en un niño de 6 años que acudió a consulta de hematología en el HUC (3,4)

Una anemia hemolítica parecida a la de los humanos nos ha sido reportada en perros Basenji (5). El mecanismo de hemólisis de los eritrocitos deficientes en PK no está completamente dilucidado; actualmente se cree que deficientes causas contribuyen a este proceso. Hay dos anormalidades metabólicas claves en estos eritrocitos: primero, el contenido de ATP está generalmente disminuido, y segundo, el contenido de 2,3-difosfoglicerato está aumentado aproximadamente dos veces.

La disminución del ATP se debe a una reducción de la conversión de glucosa a ácido láctico debido a la disminución de la enzima PK, la cual constituye un pilar fundamental del ciclo glicolítico donde 2 moléculas de ATP son convertidas a ADP.

El segundo evento, el aumento de 2,3-DPG se debe a la acumulación de 3-fosfoglicerato, un cofactor de la fosfogliceromutasa, la enzima responsable de la síntesis del 2,3-DPG y un inhibidor de la difosfoglicerofosfatasa, la enzima responsable de la

degradación del 2,3-DPG. Valentine y Paglia ha sugerido que la depleción del ATP es un factor crucial que conduce a hemolysis en el eritrocito deficiente de PK.

Por su parte, Mentzer y Glader han demostrado que la depleción de ATP intraeritrocítica causa apertura de los canales de K⁺ con pérdida de este ión y de agua, lo cual resulta en un eritrocito deshidratado y rígido, que será más fácilmente atrapado y hemolizado por los macrófagos del bazo (6 7 8).

El trabajo se planificó para analizar los estudios clínicos, hematológicos, bioquímicos e inmunológico realizado a los pacientes que resultaron con deficiencia de PK, de un total de 2338 pacientes con AHCNE, y evaluar las características clínicas y bioquímicas así como la incidencia de la variante de PK detectada en pacientes venezolanos con anemia hemolítica asociada a úlceras en piernas en Venezuela.

MATERIALES Y METODOS:

a. 200 muestras de sangre provenientes de indígenas venezolanos y muestras de sangre provenientes de habitantes de diferentes regiones de Venezuela. 157 de Caracas, 20 de San Cristóbal (Edo. Táchira), 32 de Pregonero (Edo. Táchira), 102 de Adícora (Edo. Falcón), 131 de Tapipa (Edo. Miranda).

b. 2.338 pacientes con AHCNE referidos al Instituto de Oncología y Hematología del M.S.D.S-UCV. A cada paciente se le practicó examen físico, hematología, conteo de reticulocitos, concentración sérica de bilirrubina total y fraccionada, curva de fragilidad globular, electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, cuantificación de la Hb A₂⁽⁹⁾ y hemoglobina fetal por inmunodifusión radial (Laboratorios Helena), cuantificación de los niveles intraeritrocíticos de las enzimas de la vía glicolítica y de la hexosa monofosfato por espectrofotometría: glucosa-6- fosfato deshidrogenasa (G-6-PD), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), glutatión reductasa. (GR), hexoquinasa (HX), glucosa-fosfato-isomerasa (GPI), gliceraldehido-fosfato-deshidrogenasa (GPD), fosfogliceroquinasa (PGK), difosfogliceromutasa (DPGM), monofosfogliceromutasa (MPGM), enolasa, piruvatoquinasa (PK), deshidrogenasa láctica (LDH) ⁽¹⁰⁾.

La enzima PK intraeritrocítica de 18 pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK y sin úlceras en miembros inferiores fue purificada y caracterizada cinéticamente. El efecto del sustrato fosfoenolpiruvato (PEP) y de su activador alostérico, fructosa difosfato (FDP) a una concentración de 500 μ M, fue investigado en el hemolizado parcialmente purificado y que había sido dializado toda la noche contra 7mm de beta-mercaptoetanol, 2.7 mm EDTA (pH 7.0) ^(10, 11). Y se le determinaron los siguientes parámetros: Constante de Michaelis (Km) para sus sustratos adenosindifosfato (ADP) y fofoenolpiruvato (PEP), curva de la termoestabilidad de la enzima, electroforesis de al piruvato quinasa en gel fino de poliacrilamina ⁽¹¹⁾.

Se cuantificó la concentración de inmunoglobulinas de las clases IgG, IgM e IgA por inmunodifusión radial en placas de gel con anticuerpos anti-IgG, IgA, IgM ⁽¹²⁾, CHSO, C3, C4 ⁽¹³⁾. Se midió la respuesta proliferativa de las células mononucleares de sangre de controles y pacientes con deficiencia de PK.

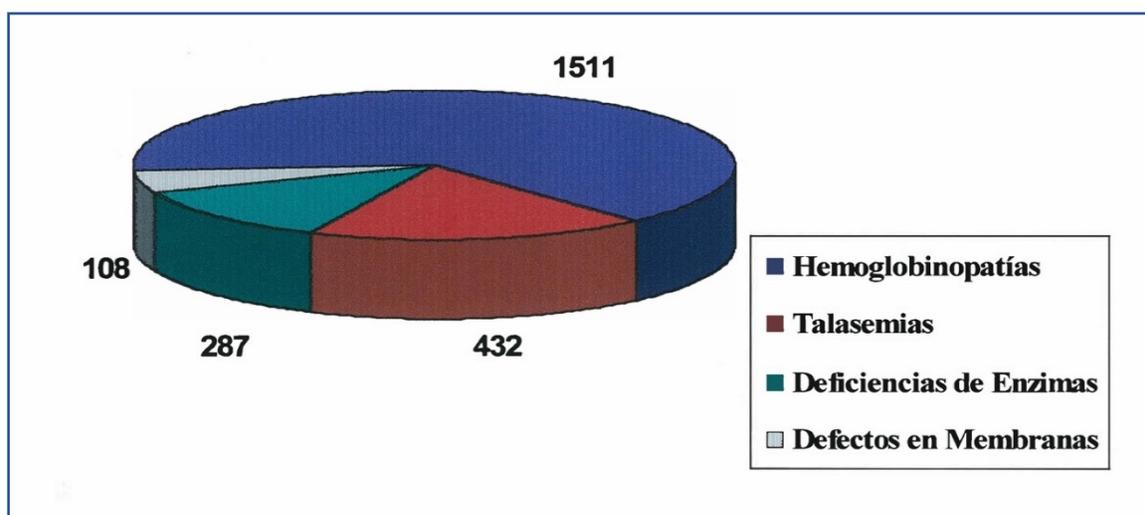
Se estudió la respuesta proliferativa a los siguientes mitógenos: fitohemaglutinina Concanavalina A, y mitógeno de Fitolaca americana. Las células mononucleares se obtuvieron en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. La suspensión celular se ajustó a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml y fueron colocadas en pozos de 0.1 ml en placas de microcultivo con o sin mitógnos e incubados a 37^oc en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 horas ⁽¹⁴⁾. Se evaluó la transformación blástica de las células mononucleares estimuladas mediante la determinación de la incorporación de timidina tritiada (3H-TDR) ⁽¹⁴⁾.

RESULTADOS

Se evaluaron 2.338 pacientes con anemia hemolítica congénita y se clasificaron de acuerdo a la etiología de la hemólisis en: 1.511 hemoglobinopatías, 432 síndromes talasémicos, 287 deficiencias de enzimas y 108 defectos de la membrana eritrocitaria (Fig.1). Entre los

1.511 pacientes con hemoglobinopatías se detectaron: 287 drepanocitosis homocigótica (HbSS), 907 taras drepanocíticas (Hb AS), 147 hemoglobinopatías tipo AC, 98 hemoglobinopatías tipo SC, 15 hemoglobinopatías CC, 57 hemoglobinopatías tipo drepanocitosis-talasemia.

FIGURA 1
HEMÓLISIS EN 2338 PACIENTES CON ANEMIA



Los pacientes con anemia hemolítica congénita clasificados como deficientes en PK presentaron las pruebas de Coombs directa e indirecta negativas, indicándonos que la anemia no era de tipo autoinmune. La electroforesis de hemoglobina fue normal detectándose sólo las bandas AA del adulto con concentraciones normales de Hb A2 y de Hb fetal, de acuerdo a la edad del paciente, indicándonos que la anemia no era debida a hemoglobinopatías ni talasemias.

La prueba de la inestabilidad de la Hb fue negativa indicándonos que la anemia no era debida a la presencia de Hbs inestables. La curva de fragilidad globular de estos pacientes, tanto en fresco como incubada y el frotis de sangre (examinado con coloración de Wright) no fueron compatibles con anemia hemolítica por defectos de la membrana del eritrocito tales como esferocitosis, ovalocitosis, estomatocitosis, etc.

La cuantificación de las enzimas de las vías glicolíticas y hexosa monofosfato fueron normales excepto las correspondientes a la deficiencia de PK. De 2.338 pacientes con diagnóstico de AHCNE, 287 pacientes (12,27%) presentaron deficiencias enzimáticas, y de éstos, 241 pacientes presentaron la deficiencia de G-6-PD (84,32 %). Se detectaron 35 pacientes deficientes en PK (12,19%), 8 deficientes en HX (2,78%), 1 deficiente en NADH MetaHb reductasa (0,3%), 1 deficiente en GR (0,3%), 1 deficiente en galactosa-1-uridiltransferasa (0.3%) (Fig 2). Los propósitos deficientes en PK presentaron antecedentes de ictericia neonatal, que en la mayoría de los casos ameritó fototerapia o exanguinotransfusión. Clínicamente se caracterizaron por presentar ictericia conjuntival, palidez cutáneo mucosa, esplenomegalia desde el grado I al III, que varió en tamaño de acuerdo a la edad del paciente y a la severidad de la hemólisis. La mayoría presentó hepatomegalia discreta. Tres de las familias estudiadas se caracterizaron porque algunos de sus miembros presentaron úlceras en miembros inferiores (Tabla 1).

FIGURA 2
287 PACIENTES DEFICIENTES EN ERITROENZIMOPATÍAS

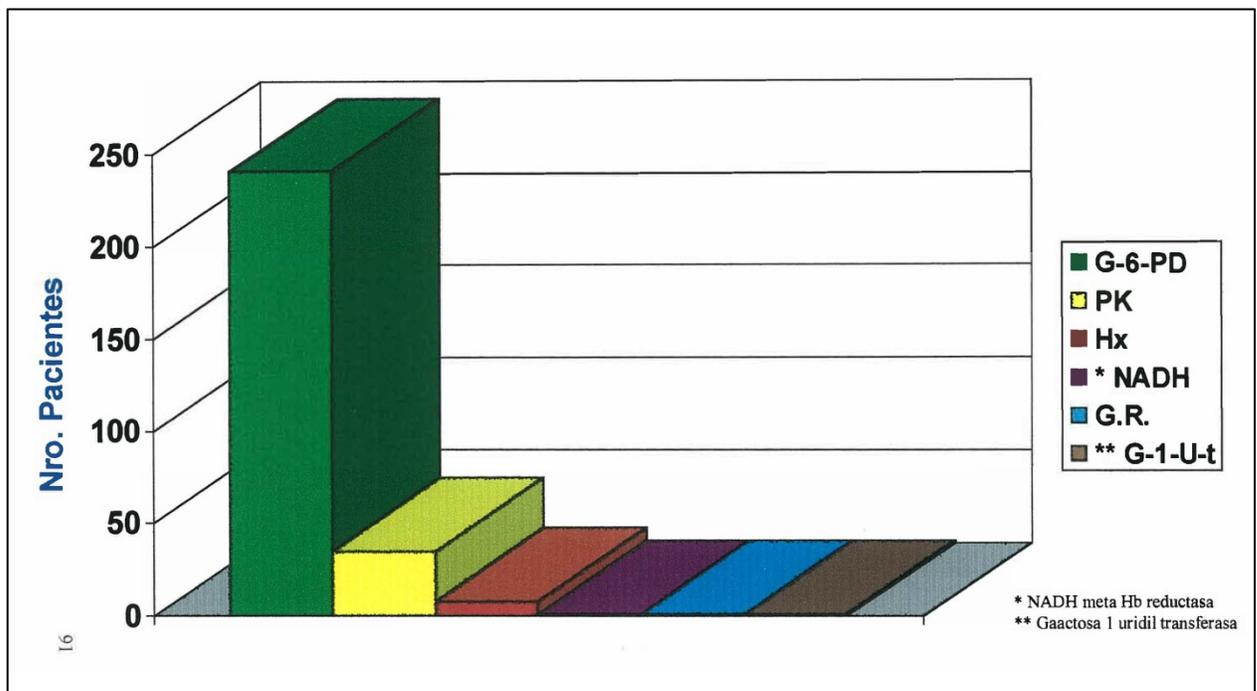


TABLA I
MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS PROPÓSITOS
DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA

ICTERICIA NEONATAL	100
FOTOTERAPIA	40
EXANGUINOTRANSFUSION	50
CRISIS HEMOLÍTICA CRÓNICA	100
CRISIS HEMOLÍTICA POR INFECCIÓN	50
HEPATOMEGALIA	60
ESPLENOMEGALIA	100
ULCERAS EN PIERNAS	30
DISMINUCIÓN TxPOSTESPLENECTOMIA	100

El estudio hematológico de los pacientes con deficiencia de PK y sin úlceras en miembros inferiores, mostró una anemia con reticulocitosis cuyo grado varió de acuerdo al paciente. Los valores de hemoglobina oscilaron entre $8,24 \pm 1,2$ g / dl, los valores de hematocrito entre $28,3 \pm 2,9\%$ y los reticulocitos entre $25,12 \pm 17,21\%$ (Tabla 2) mientras que el de los pacientes con úlceras en miembros inferiores mostró Hb: $7,5 \pm 1,8$ g / dl, Hto: $26,6 \pm 5,1 \%$ y reticulocitos entre $20,8 \pm 11,7$. El frotis de sangre periférica varió de acuerdo a si el paciente estaba esplenectomizado o no. Cuando el paciente no estuvo esplenectomizado el frotis mostró eritrocitos morfológicamente normales y ocasionalmente crenocitos.

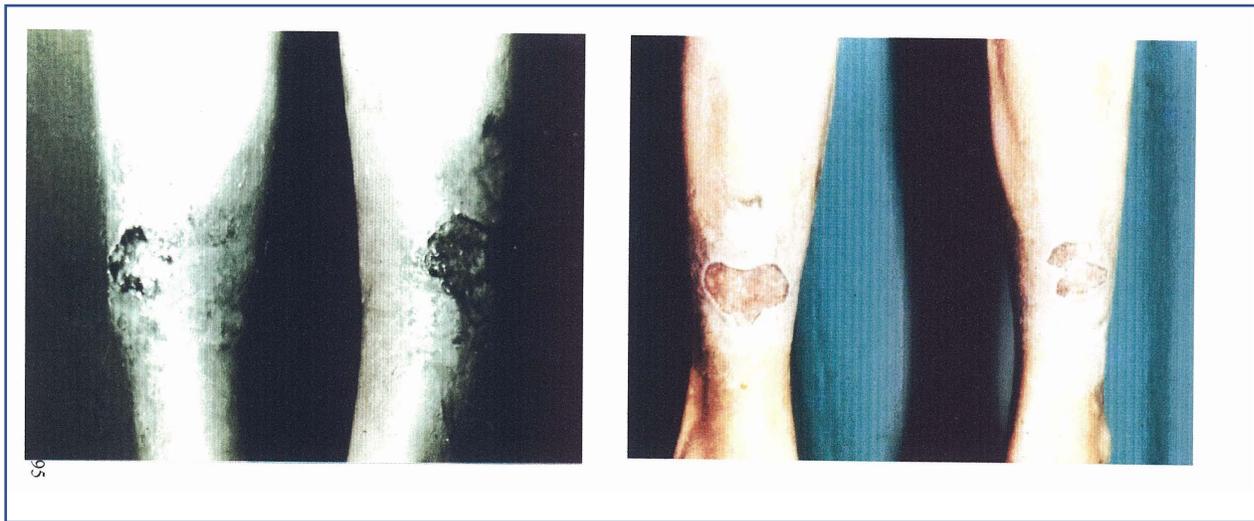
Cuando el paciente había sido esplenectomizado el frotis mostraba policromasia severa, poiquilocitosis, crenocitosis y dianocitosis moderada, esquistocitosis, microcitosis, poiquilocitosis, esferocitosis leve y presencia de cuerpos de Howell-Jolly. En todos los casos las infecciones sobreagregadas agravaron la hemólisis y la esplenectomía disminuyó los requerimientos transfusionales. Un paciente propósito (AD) ameritó exanguinotransfusión al nacer y varias transfusiones en el período de lactante menor, por lo cual hubo que esplenectomizarlo a los 8 meses de edad, disminuyendo a partir de ese

momento los requerimientos transfusionales. Este es el paciente con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa de este grupo que fue esplenectomizado más precozmente. En el transcurso de sus 22 años este paciente ha ameritado transfusiones de concentrado globular cuando ha presentado cuadros virales o bacterianos. A los 18 años de edad se le sometió a colecistectomía luego del diagnóstico de litiasis biliar (Fig. 6).

TABLA II
ASPECTOS CLÍNICOS Y VALORES HEMATOLÓGICOS
DE PACIENTES DEFICIENTES EN PK

	Deficiente Piruvato Quinasa	Deficiente Piruvato Quinasa con úlceras
Hb (g/dl)	8,24 ± 1,20	7,5 ± 1,8
HTO (%)	28,30 ± 2,90	26,6 ± 5,1
Reticulocitos (%)	25,12 ± 17,21	20,8 ± 11,7
Bilirrubina Indirecta	5,88 ± 10,93	4,03 ± 0,68
Hepatomegalia	+	+
Esplenomegalia	+	+

FIGURA 3
DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA



A otro paciente (LS) se le hizo el diagnóstico de deficiencia de piruvato quinasasa asociada a úlceras en piernas en la quinta década de su vida cuando fue sometido a una colecistectomía por litiasis biliar. Este paciente murió a los 72 años de edad a causa de problemas cardiovasculares. Su hermana mayor que sufría de su misma enfermedad, había muerto sin diagnóstico, hacía 20 años. Se estudiaron 15 propósitos con anemia hemolítica por deficiencia de PK observándose que la concentración de hierro sérico y la ferritina estuvieron en algunos de ellos por arriba del límite superior del rango normal y esto dependió del grado de hemólisis y la edad del paciente (Tabla 3).

TABLA 3
HIERRO, TIBC Y FERRITINA EN 15 PACIENTES
PROPOSITOSCON DEFICIENCIA
DE PIRUVATO QUINASA

HIERRO	128-209.4 (VN: 60-160 mg/dl)
TIBC	293-686.4 (VN: 250-400 mg/dl)
SATURACIÓN	27-47 (VN: 20-25%)
FERRITINA	232-1650 (VN: > 10 ng/ml)

Como puede apreciarse en la Tabla 4 los pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK presentaron valores que cayeron dentro del rango de la normalidad de IgG, IgM, IgA y de complemento CH50, C3, C4. Diez de estos pacientes presentaron un número normal de linfocitos B y T en sangre. Así mismo presentaron valores normales de linfocitos B que expresan los marcadores CD10, CD19 y CD20 y de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ (Tabla 5). Se estudió la respuesta proliferativa de las células mononucleares separada de sangre periférica de los pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK y se comparó con la respuesta de las células mononucleares de donantes del Banco de Sangre que sirvieron de controles y de pacientes con hemoglobinopatías tipo drepanocitosis SS y se notó una disminución de la respuesta proliferativa de las células mononucleares estimuladas con PHA y Con A (Fig. 4 y 5).

TABLA 4
INMUNOLOGÍA HUMORAL DE 15 PACIENTES
DEFICIENTES EN PK

IgG:	1455 ± 195 mg/dl	(VN:1125 ± 475)
IgA:	2185 ± 161,5 mg/dl	(VN:195 ± 155)
IgM:	90 ± 65 mg/dl	(VN:177,5 ± 122,5)
CH 50:	185 - 277 U/h/cc	(VN:20 ± 50)
C3:	95 - 190 mg/dl	(VN:140 ± 50)
C4:	21 - 39 mg/dl	(VN:30 ± 10)

TABLA 5
INMUNOFENOTIPAJE DE LINFOCITOS T Y B EN 10
PACIENTES PROPÓSITOS DEFICIENTES EN PK

LINFOCITOS "T"		
CD7:	75,5 ± 6,5 % 35 ±	(VN: 72,5 ± 12,3)
CD4:	8%	(VN: 37,2± 8,7)
CD8:	24 ± 10%	(VN: 14,5 ± 34,1)
RELACIÓN T4/78	1,45 ± 0,2	(VN: 1,6 ± 0,4)
LINFOCITOS "B"		
CD10:	1,4 ± 1,3 %	(VN: 11,8 ± 12,3)
CD19:	21,5 ± 4,5 %	(VN: 15,7 ± 6,1)
CD20:	14 ± 1 %	(VN: 15,7 ± 6,1)

FIGURA 4
RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA PHA
DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES

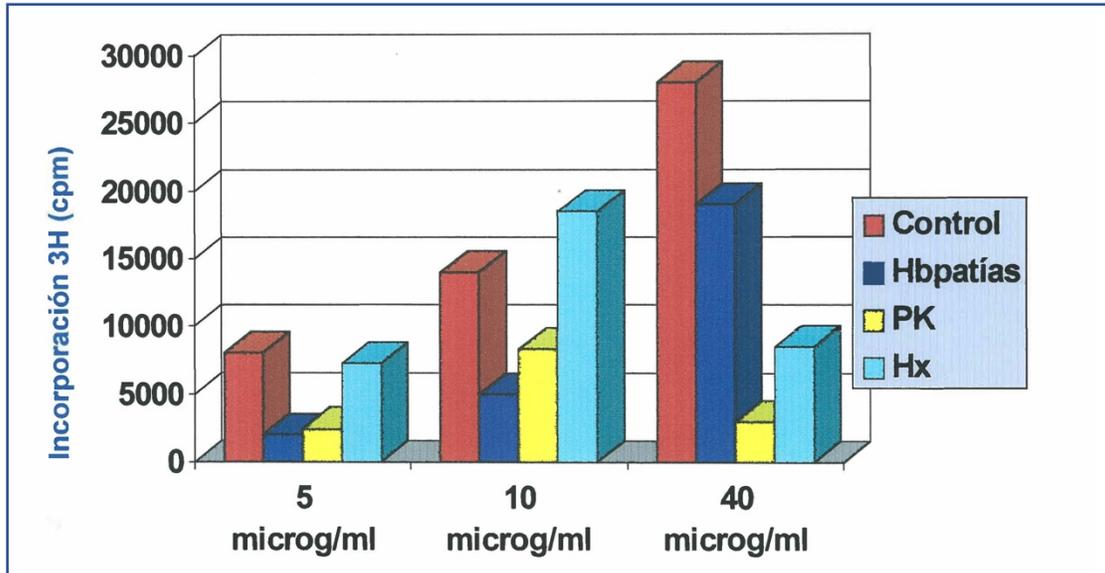
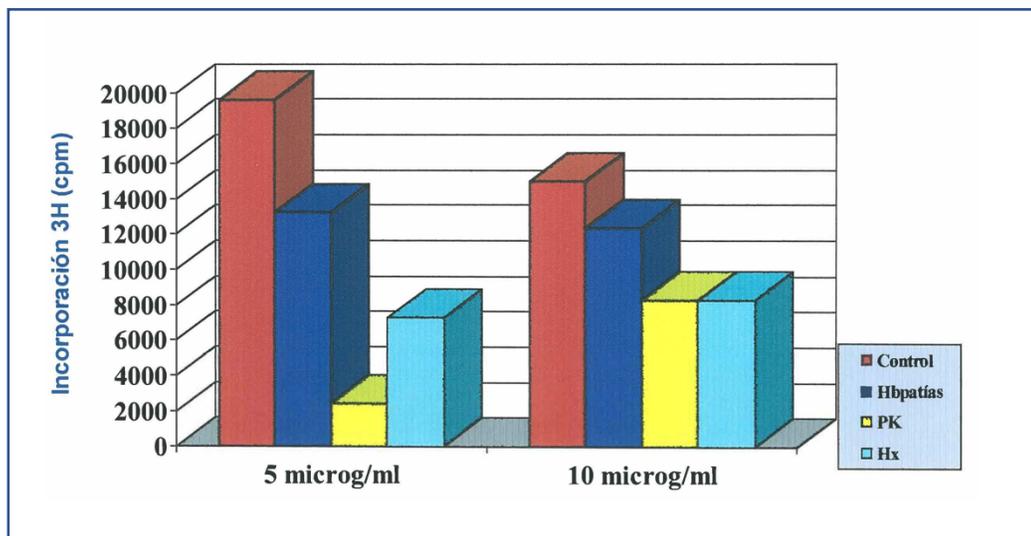


FIGURA 5
RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON A
DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES



Estos pacientes fueron clasificados de acuerdo al nivel intraeritrocítico de la enzima piruvato quinasa. De 35 pacientes estudiados, 25 pacientes fueron clasificados como deficientes homocigotos o dobles heterocigotos y 10 pacientes en heterocigotos. En todas las familias estudiadas deficientes en PK la herencia fue autosómica recesiva, los hijos provenían de padres heterocigotos para la deficiencia de PK (Fig. 6 y 7).

FIGURA 6
DEFICIENCIA DE PK FAMILIA A-DIA
(MARACAIBO, EDO ZULIA)

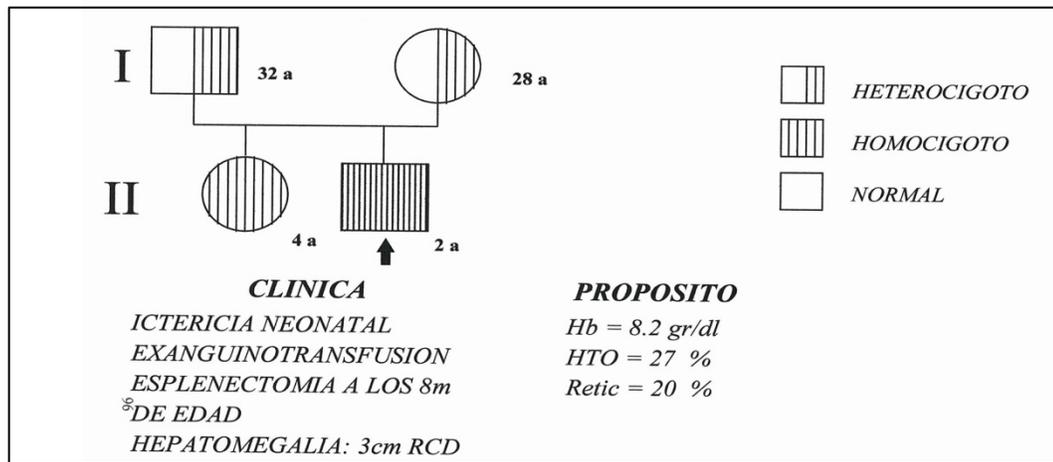
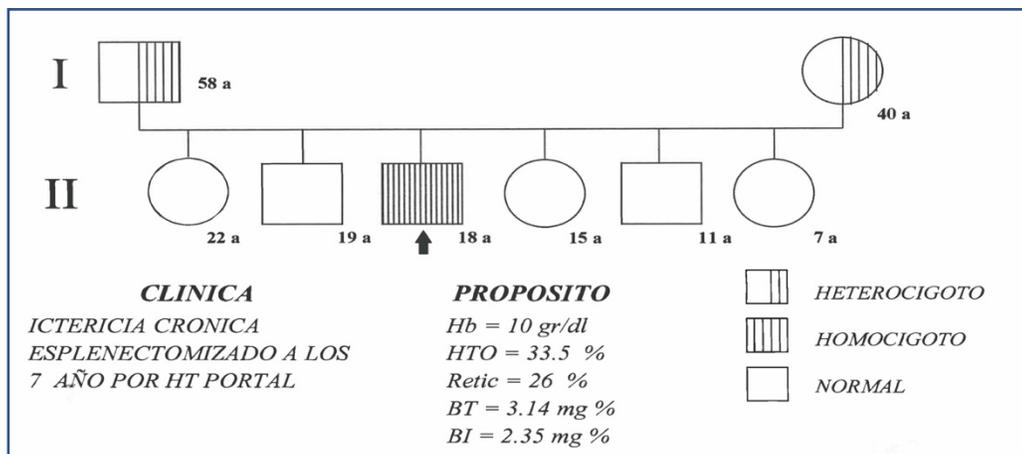


FIGURA 7
DEFICIENCIA DE PK FAMILIA MOLI
(MÉRIDA, EDO. MÉRIDA)



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA VARIANTE DE PIRUVATO QUINASA.

La enzima PK de 5 pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK y con úlceras en miembros inferiores fué purificada y caracterizada cinéticamente. El efecto del sustrato fosfoenolpirúvico (PEP) y de su activador alostérico, la fructosa difosfato (FDP), fue investigado en la misma forma que con los pacientes deficientes en PK con hemólisis, pero sin úlceras en las piernas.

La PK de los eritrocitos de pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK y úlceras en piernas mostró un K_m [PEP] de $0,75 \pm 0,05$ mM (VN: $1,1 \pm 0,10$ mM), siendo la curva para el PEP de aspecto sigmoidal.

El K_m para su sustrato PEP pero con el activador alostérico FDP fue de $0,74 \pm 0,050$ mM. Como se ve la enzima PK intraeritrocítica de estos pacientes no respondió a su activador alostérico, aún usando concentraciones de FDP altas como $500 \mu\text{M}$. (Tabla 6, Fig. 8). La PK de los eritrocitos de los pacientes con deficiencia de PK y úlceras en piernas presentaron un K_m [ADP] de $0,55 \pm 0,05$ mM mientras que el K_m [ADP] de los eritrocitos humanos controles fue de $0,26 \pm 0,01$ mM (Tabla 6). La curva de termoestabilidad para la PK practicada a los eritrocitos de los pacientes con hemólisis por deficiencia de PK y úlceras en piernas mostró una enzima inestable al calor, permaneciendo solo el $58 \pm 3\%$ de la actividad de piruvato quinasa a la hora de incubación a la temperatura de 53°C (Fig. 9).

FIGURA 8
RESPUESTA DE LA PK A SU SUSTRATO
PEP + ACTIVADO FDP

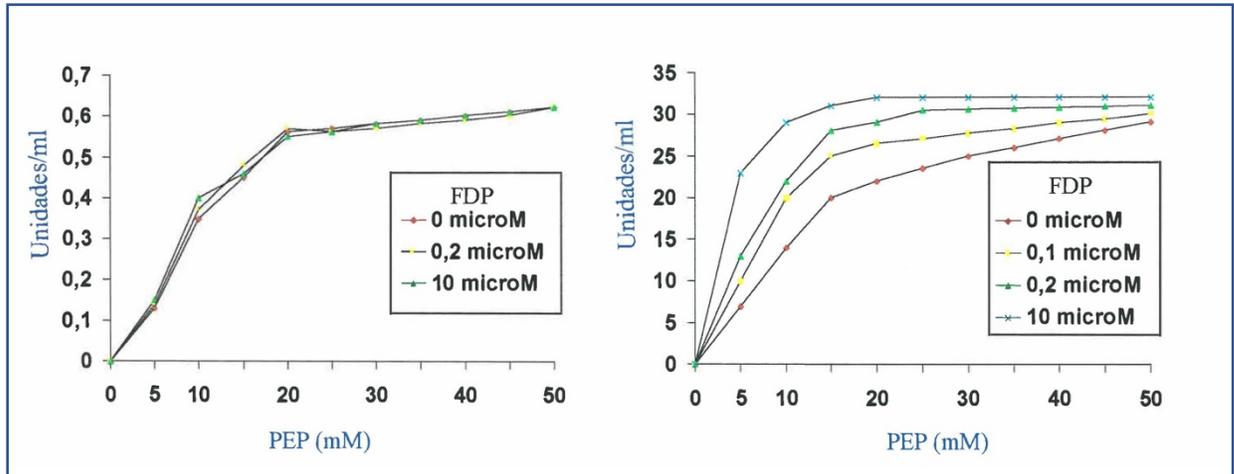
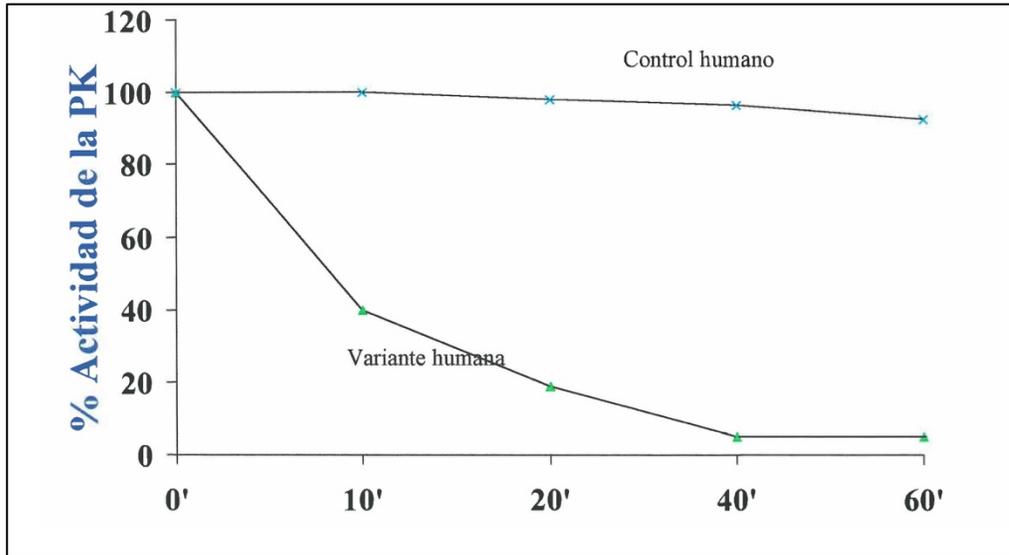


TABLA 6
PARAMETROS CINÉTICOS DE LA PK
INTRAERITROCÍTICA HUMANA

	Km (PEP) (mM PEP)	Km)ADP) (mM ADP)	KM (PEP) + FDP (mMADP)	Curva PEP
18 Pacientes Deficientes PK	1,15 ± 0,1	0,26 ± 0,01	0,120 ± 0,030	Sigmoidal
5 Pacientes con la variante humana PK	0,75 ± 0,05	0,55 ± 0,05	0,74 ± 0,05	Sigmoidal
18 Controles (Donantes Banco de Sangre)	1,10 ± 0,1	0,26 ± 0,01	0,119 ± 0,028	Sigmoidal

FIGURA 9
CURVA DE TERMOESTABILIDAD
DE LA PIRUVATO QUINASA HUMANA



El pH óptimo de la PK intraeritrocítica fue similar a los pacientes con anemia y sin úlceras, variando entre 6,5-7,0. Al comparar los valores de K_m de la PK intraeritrocítica de los pacientes con anemia hemolítica congénita con úlceras en miembros inferiores con los valores de K_m de la PK intraeritrocítica de los pacientes con anemia hemolítica pero sin úlceras en piernas, se encuentra que los primeros tienen un K_m [PEP] disminuido 0,75 vs 1,15 mM y un K_m [ADP] aumentado 0.55 vs 0.26 mM.

Así mismo, la PK intraeritrocítica de estos pacientes con úlceras es no alostérica y es termolábil, mientras que la PK intraeritrocítica de los otros pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK pero sin úlceras en piernas es alostérica y termoestable (Tabla 6, Fig. 8). Estos resultados indican que la PK de pacientes venezolanos con anemia hemolítica congénita por deficiencia de piruvato quinasa y úlceras en piernas puede ser clasificada como una variante de PK.

DISCUSIÓN

En este estudio encontramos que el diagnóstico más frecuente en pacientes estudiados por anemias hemolíticas congénitas fue el de hemoglobinopatía, detectada en 1511 pacientes (de un total de 2238). Dentro de las hemoglobinopatías, la más frecuente fue la tara drepanocítica, lo cual concuerda con los estudios realizados por Arends y otros autores en Venezuela ^(15,16). Las anemias hemolíticas congénitas secundarias a deficiencias de enzimas fueron encontradas con menor frecuencia en este estudio como ha sido reportado anteriormente en Venezuela por Müller y col. ⁽⁶⁾ La deficiencia de G-6-PD se detectó en 241 pacientes en 287 casos de deficiencias enzimáticas, lo cual representa el 84,32% en este estudio, mientras que los deficientes en enzimas de la vía glicolítica representaron sólo el 3,78%.

La deficiencia de G-6-PD es la enzimopatía más frecuente no solamente en Venezuela sino en todo el mundo con áreas de alta prevalencia en África, sur de Europa, en el medio Oriente y en el sureste de Asia y Oceanía. ⁽⁷⁾ Entre las deficiencias de la vía glicolítica se encontraron las de piruvato quinasa y hexoquinasa, siendo la deficiencia de PK la más frecuente. Esta fue la primera enzimopatía detectada en la vía de Embden-Meyerhof que fue reconocida como etiología de una anemia hemolítica congénita no esferocítica y junto con la deficiencia de G-6-PD clase I constituye la causa más frecuente de hemólisis crónica ⁽¹⁸⁾.

Al revisar la literatura mundial encontramos que en otros países la anemia hemolítica por deficiencia de glucosa fosfato isomerasa es la segunda causa, en términos de frecuencia, entre los casos de hemólisis crónica congénita por deficiencias de la vía glicolítica, después de la PK; la anemia hemolítica puede ser la única manifestación de un desorden multisistémico aunque miopatía y retardo mental pueden algunas veces acompañar a ésta anemia.

La segunda causa de anemia hemolítica congénita por deficiencia de enzimas en este estudio fue la deficiencia de PK, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura ^(19,20).

Los neonatos con deficiencia de PK presentaron ictericia en el 100% de los casos,

siendo tratados con fototerapia o exanguinotransfusión en la mayoría de los casos. La hiperbilirrubinemia ha sido detectada por otros autores frecuentemente en los neonatos deficientes en PK y puede requerir exanguinotransfusión, como en estos casos ^(21, 22). La ictericia neonatal en estos pacientes se extendió durante toda su vida, presentando aumento de la bilirrubina indirecta alrededor de 6 mg/dl como ha sido descrito (Tabla 1 y 2) ²³.

Uno de los pacientes estudiados que pertenecía a la familia Dia (Fig. 6) fue tratado con exanguinotransfusión en las primeras horas de vida y requirió múltiples transfusiones de concentrado globular durante el período de lactante menor, por lo cual ameritó una esplenectomía precoz a los 9 meses de edad. Este fue el niño más joven con anemia hemolítica por deficiencia de PK de esta serie que fue tratado con esplenectomía. Esta anemia profunda a tan temprana edad ha sido reportada anteriormente ^(21, 22, 23). En líneas generales, la esplenectomía se realiza después de los 6 años de edad debido a que el hipoesplenismo resultante causa una depresión inmunitaria asociada con un aumento de infecciones bacterianas severas, que en algunos casos resultan fatales sobre todo en lactantes y niños pequeños ⁽²⁴⁾.

El riesgo de infección fue mayor cuando la esplenectomía se realizó en pacientes con talasemia *major*, drepanocitosis o linfoma de Hodgkin. ⁽²⁵⁾ El riesgo de sepsis está relacionado con la causa o severidad del hipoesplenismo, enfermedad subyacente y edad del paciente. El riesgo de infección severa y muerte es más alto dentro de los 2 a 3 años postesplenectomía. ^(24, 25) Una de las pacientes femeninas deficiente de la familia Gue tuvo un embarazo cuyo feto presentó retardo de crecimiento intrauterino y la paciente requirió la administración de concentrados globulares durante el embarazo, como fue descrito por Fanning y col ⁽²⁰⁾. El recién nacido presentó solo ictericia fisiológica. La anemia de estos pacientes en líneas generales permaneció estable, variando poco en su intensidad durante los años de observación clínica, pero se agravó cuando el paciente presentó infecciones bacterianas como amigdalitis o infecciones virales, requiriendo concentrados globulares, probablemente por períodos de hipoplasia medular transitoria secundaria a las infecciones.

Ha sido reportado que la hemólisis puede estar compensada y la ictericia puede ser la sola manifestación de la deficiencia de PK. Este no fue nuestro caso probablemente porque estos pacientes fueron referidos de centros hospitalarios donde estaban siendo estudiados por anemia congénita severa.

Uno de los pacientes presentó una talasemia intermedia asociada, sin embargo, las características clínicas del paciente y el curso de su enfermedad fue el mismo que el del resto de los pacientes con anemia hemolítica congénita por deficiencia de PK.

En este estudio se detectaron pacientes deficientes en PK con úlceras en miembros inferiores, lo cual fué reportado por Müller y col. (1976), Curiel y col. (1978), y por Vives-Corróns y col. (1980).^(26, 27) En otras anemias hemolíticas congénitas como drepanocitosis y esferocitosis también puede asociarse úlceras en miembros inferiores⁽²⁷⁾. Los pacientes deficientes en PK de este estudio presentaron concentraciones de hierro sérico que variaron desde valores normales hasta valores por arriba del rango normal, reflejando el grado de hemólisis. La ferritina siempre estuvo aumentada. Los valores de hierro sérico y de ferritina más elevados se observaron en los pacientes adultos con varias transfusiones.

Aunque existe una gran cantidad de evidencia que indica que el hierro es un elemento importante para el normal funcionamiento de las células del sistema inmune, es conocido que la deficiencia de hierro afecta la respuesta inmune en humanos y animales experimentales; pero, por otro lado, el exceso de hierro es tóxico y la sobrecarga de hierro puede conducir a disminución de la respuesta inmune y a infecciones.

Las alteraciones de la repuestas inmune cuando el hierro y la ferritina están elevados que han sido descritas son la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos, anormalidades de la función de fagocitosis, expresión de los marcadores de superficie de los linfocitos y alteraciones de las subpoblaciones de los linfocitos T.⁽²⁸⁾ En este grupo

de pacientes deficientes en PK con hemólisis crónica severa no pudimos detectar deficiencias de las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, o del complemento CH50, C3, C4 o de las subpoblaciones de linfocitos T y B a pesar de que la ferritina estuvo elevada en todos estos pacientes. Sin embargo, se notó una disminución de la respuesta proliferativa a la fitohemaglutinina y a la Con A de las CMN separadas de la sangre de 4 pacientes deficientes en PK con hierro sérico y ferritina elevados. Esto quizás podría atribuirse a la sobrecarga de hierro liberada en la hemólisis crónica, aunque es una muestra muy pequeña para hacer una conclusión definitiva, por lo cual se requeriría medir esta respuesta proliferativa en mayor número de pacientes.

Los familiares de los pacientes clasificados como heterocigotos, clínicamente eran asintomáticos como ha sido descrito en esta enfermedad ⁽²⁹⁾. Los niveles de PK intraeritrocíticos medidos por espectrofotometría mostraron poca correlación con la severidad de la anemia, como ha sido reportado previamente ⁽³⁰⁾.

El valor absoluto de PK intraeritrocítico en U/L medido por espectrofotometría varió de acuerdo al paciente, grado de reticulocitosis, etc. La herencia de la PK en todos estos pacientes con anemia hemolítica fué autosómica recesiva y en todos los casos los padres eran heterocigotos para la deficiencia. Ha sido descrita en esta enfermedad que pacientes con anemia hemolítica severa que clínicamente se comportan como homocigotos son realmente dobles heterocigotos y esto puede comprobarse por el grado de reticulocitosis, la acumulación de glucosa-6-fosfato y las propiedades *in vitro* de la PK mutante residual intraeritrocítica. ⁽³⁰⁾ En este estudio no determinamos la acumulación de glucosa-6-fosfato y con solo el estudio de la PK intraeritrocítica residual no pudimos detectar dobles heterocigotos. Asumimos que en el caso de que los padres fuesen primos hermanos, los hijos de ambos con la anemia hemolítica por deficiencia de PK fueron catalogados como homocigotos obligados.

Los 18 pacientes con anemia hemolítica congénita por deficiencia de PK y sin úlceras en miembros inferiores presentaron la enzima PK intraeritrocítica disminuida en relación a

los controles, pero la actividad cinética de la enzima PK residual del eritrocito y la curva de termoestabilidad fueron normales, indicándonos que, aunque la enzima PK intraeritrocítica estaba disminuida, la actividad de PK residual era normal. Se conoce que las variantes de PK con características cinéticas desfavorables se asocian a una enfermedad hemolítica más severa, lo cual no ocurrió en estos 18 pacientes estudiados, ya que su PK intraeritrocítica era cinéticamente igual a la PK de donantes de sangre controles (Tabla 6, Fig. 8). Los pacientes con úlceras en miembros inferiores además de presentar deficiencia de la PK intraeritrocítica, se caracterizaron porque la enzima residual intraeritrocítica presentó una disminución de la afinidad para su sustrato PEP, no respondía a la estimulación con FDP, es decir, no era alostérica, presentó un aumento de la afinidad para su sustrato ADP y era inestable al calor. Los pacientes de este estudio con dicha variante se caracterizaron por presentar clínicamente anemia hemolítica severa crónica asociada a úlceras en miembros inferiores (Fig. 8, Tabla 6).

Se han descrito variantes de PK con el Km normal, elevado o disminuido para el PEP. Cada grupo de variantes puede presentar el Km para el ADP elevado, normal o disminuido. Es conocido que las variantes de PK con disminución de la afinidad a su sustrato PEP y disminución de la estabilidad térmica llevan asociado un cuadro de hemólisis más severo ^(31, 32, 33). La mayoría de los pacientes deficientes en PK pertenecen a los Andes venezolanos, por lo que se estima que tal deficiencia fue traída a Venezuela por inmigrantes caucásicos, inicialmente a la región de los Andes, de donde se ha expandido a otras regiones. Los indígenas venezolanos estudiados no presentan dicha deficiencia

BIBLIOGRAFÍA

1. Dacie, J.N. The congenital anaemias. Pag. 171. Grune & Stratton, New York, 1960.
2. Mentzer, W. *Pyruvate kinase deficiency and disorders of glycolysis*. Capítulo 18, pag. 634. En: Nathan & Oski (Ed.) *Hematology of Infancy and Childhood*. 4a edición. W.B. Saunders Co, 1993.
3. Arya, A., Layton, D.M, Bellingham, A.J. Hereditary Red Cell Enzymopathies. *Blood Reviews*. 1995; 9: 165.
4. Acquatella, G., Müller-Soyano A., Franceschi. A.: *Deficiencia de piruvato quinasa en una familia venezolana. Primer caso estudiado en Latinoamérica*. *Acta Med. Ven.* 1971;18:1.
5. Searcy, G.P., Miller, D.R, y col.: *Congenital hemolytic anemia in the Basenji dog due to erythrocyte pyruvate kinase deficiency*. *Can. J. Comp. Med.* 1971.; 35:67.
6. Müller-Soyano, A. *Anemias hemolíticas por deficiencias de las enzimas del ciclo glicolítico*. Capítulo 10, pag. 210. En: Perez-Requejo J.L (Ed) *Hematología*. Editorial Disinlimed, C.A, 1995.
7. Paglia, D.E., Valentine, W.N., y col. *Dejective erythrocyte pyruvate kinase with impaired kinetics and reduced optimal activity*. *Br. J. Haematol.* 221: 651, 1972.
8. Glader, B. *Salicylate-induced injure of pyruvate kinase deficient erythrocyte*. *N.Eng. J. Med.* 1976; 294:916.
9. Bemini, L. R. *Rapid determination of hemoglobin A2 by DEAE cellulose chromatography*. *Biochem. Genet.*1969; 2: 305.
10. Beutler E. *Red Cell Metabolism. A manual of Biochemical Methods 2º Edición*. New York. Grune & Stratton 1975
11. *International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for the Characterization of Red Cell Pyruvate Kinase Variants*. *Br. J. Haem.* 1979; 43: 275.
12. Milford-Ward A. *Immunoprecipitation in the evaluation of the proteins in plasma and body fluids*. En: Thompson, R.A.(Ed), *Technique in Clinical Immunology*, 2a edición, Black:well Scientific Publication, 1981.
13. Brown, D., Hobart, M.J. Complement and complement fixation. En: Thompson, R.A.(Ed), *Technique in Clinical Immunology*, 23 edición, Black:well Scientific Publication, 1981.
14. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from normal human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968; 21: 77.
15. Arends, T. *El problema de las hemoglobinopatías en Venezuela*. *Rev. Venez. De Sanidad y Asistencia Social.* 1961; 26: 61.

16. Arends, T. Estado actual del estudio de las hemoglobinas anormales en Venezuela. *Sangre* 1963; 8: 1.
17. Beutler, E. *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other enzyme abnormalities*. En: Williams ' Hematology. Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller B. S., Kipps T.J.(Eds). Mac Graw-Hill. 5a Ed, 1995.
18. Paglia, D.E. *Disorders of erythrocyte glycolysis and nucleotide metabolism*. En: Blood Principles and Practice of Hematology. Handin, R.I., Luz, S.E., Stossel, T.(Eds). J.B. Lippincott Co. 1995.
19. Valentine WN, Tanaka KR, Miwa S. *A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect(pyruvate kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia*. *Trans. Assoc. Am. Physician*.1961; 74:100.
20. Fanning, J., y Hinkle, R. S. *Pyruvate kinase deficiency hemolytic anemia: two successful pregnancy outcomes*. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1985; 153: 313.
21. Tanaka KR, Valentine WN, Miwa S. *Pyruvate kinase (PK) deficiency hereditary non-spherocytic hemolytic anemia*. *Blood*: 1962; 19,267.
22. Matthay, K, K., Mentzer, W.C. *Erythrocyte enzymopathies in the newborn*. *Clin.Haematol*. 1981;10: 31
23. Morisaki, T., Tani, K., y col. *Ten cases of pyruvate kinase (PK) deficiency found in Japan: enzymatic characterization of patient' PK*. *Acta Hematol. Jpn*.1980, 51:234.
24. Krivey, N., y Tatarski, I. *Infections and splenectomy*. *N. Engl. J. Med*. 1978, 298: 165.
25. Singer, D. B. *Postsplenectomy sepsis*. *Perspect. Pediatr. Pathol*. 1973; 1: 285.
26. Müller-Soyano A, Roura E y col. *Pyruvate kinase deficiency and leg ulcers*. *Blood* 1976; 47:807.
27. Vives-Corróns JL, Marie J y Col. *Hereditary erythrocyte pyruvate kinase deficiency and chronic hemolytic anemia: clinical, genetic and molecular studies in six new Spanish Patients*. *Hum Genet* 1980, 53:401.
28. Soyano A, Pons H, Montaña R y col. *Effect of iron compounds on the immune response in vitro* en *Recent advances in pharmacology and therapeutics*. Velasco M, ro Israel A, Romero H, Silva (Eds) Elsevier Science Publisher B. V. (Biomedical División) 1989.
29. Beutler E: *Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia pyruvate kinase deficiency and other anomalies*. Capítulo 58; 574. En Williams W.J., Beutler E, Erslev A, Lichtman M. (Eds) *Hematology*, Me GrawHill.
30. Mentzer W. *Pyruvate Kinase deficiency and disorders of glycolysis*. Capítulo 18, pag. 634. en Nathan & Oski (Eds) *Hematology of infancy and Childhood*. 4a. Edición. W.B. Saunders Co. 1993.

31. Staal GEJ, Rijksen G y col. Extreme deficiency of L type pyruvate kinase with moderate clinical expression. Clin Chim Acta 1982, 118:241.
32. Ishida Y, Miwa S. y col. Thirteen cases of pyruvate kinase deficiency found in Japan. Am J Hematol 1981;10:239.
33. Kahn A, Marie J y Col. Search for a relationship between molecular anomalies the mutant erythrocyte pyruvate kinase variants and their pathological expression. Human Genet 1981, 57:172.

**ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA
POR DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA**

ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA POR DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA

Müller A., Soyano A., Mendez G., Ponte B., Somoza R., Soyano A.E, Tovar Héctor, C.L. Insausti. Instituto de Oncología y Hematología M.S.D.S-UCV. Clínica El Avila. HUC

Instituto de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Hospital Central de Carúpano.

RESUMEN

La Hexoquinasa es una enzima glicolítica con la actividad mas baja dentro del eritrocito y una variedad de observaciones indican que juega un papel en la velocidad de la glicólisis. Al disminuir los niveles de la enzima dentro del eritrocito o si la enzima es una mutante de hexoquinasa disminuyen los niveles de ATP dentro del eritrocito que resultarán en alteraciones distintas de la membrana del eritrocito, lo cual causara remoción de los eritrocitos dañados por el sistema monocítico- macrofágico y se produce hemolisis. El objeto de este trabajo es presentar tres familias con anemia hemolítica crónica por deficiencia de la hexoquinasa, una de las cuales se caracterizó porque su propósito además de la anemia hemolítica crónica presentaba úlceras en miembros inferiores como ocurre en la anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa, o esferocitosis o drepanocitosis. El estudio bioquímico de la enzima hexoquinasa intraeritrocítica residual de esta familia permitió caracterizar dicha enzima como una variante o mutante de hexoquinasa, ya que era inestable al calor y tenía un Km. (ATP) aumentado y se denominó Caracas.

Los otros propósitos de las otras familias se caracterizaron por presentar solo ictericia desde el período neonatal con una hemolisis bien compensada.

La hexoquinasa (Hx) es la enzima que inicia la vía glicolítica mediante la fosforilización de la glucosa, convirtiéndola en glucosa-6-fosfato. Este paso es crucial para el metabolismo eritrocitario, ya que el eritrocito maduro depende casi exclusivamente de la glucosa-6-fosfato para generar ATP, glutatión reducido y nucleótidos de la piridina, los cuales son importantes para mantener la forma biconcava del eritrocito, la concentración de cationes específicos intraeritrocíticos, el hierro divalente de la hemoglobina, los grupos sulfhidrilos de las enzimas, el glutatión y los componentes de la membrana en estado reducido.(1,2,30).

La Hx es una enzima glicolítica con la actividad mas baja dentro del eritrocito y una variedad de observaciones indican que juega un papel en la velocidad de la glicólisis. Al disminuir los niveles de la enzima dentro del eritrocito o si la enzima es una mutante de hexoquinasa disminuyen los niveles de ATP dentro del eritrocito que resultarán en alteraciones distintas de la membrana del eritrocito, lo cual causara remoción de los eritrocitos dañados por el sistema monocítico-macrofágico y se produce hemolisis (30). Los individuos afectados severamente pueden exhibir hiperbilirrubinemia y requerir transfusiones a intervalos regulares por anemia intratable, pero en los casos de deficiencia moderada la hemolisis es bien compensada y la anemia esta ausente (3,4,17-19, 28). La anemia hemolítica por deficiencia de Hx también ha sido descrita en ratones, estos nacen y viven con anemia hemolítica crónica y la heredan con carácter autosómico recesivo (27).

La HX de los eritrocitos humanos es un monómero con PM 112000 daltons. La Hexoquinasa humana tiene 4 isoenzimas principales, cada una de las cuales es codificada por genes separados. Estudios recientes indican que la HX-1 y la Hx-R, la cual es específica para los eritrocitos son expresadas en los eritrocitos y que esas isoenzimas son codificadas por un solo ge HX-1(29). Anormalidades de la hexoquinasa leucocitaria no han sido detectadas en pacientes deficientes en hexoquinasa intraeritrocítica. El gen estructural de la hexoquinasa está en el cromosoma 10. (1,20, 21)

La deficiencia de HX fue inicialmente descrita en pacientes afectados de anemia de Fanconi debido a la anomalía cromosómica propia de esta enfermedad. No obstante, el primer caso de deficiencia de hexoquinasa asociada a anemia hemolítica crónica se debe a Valentine y col. en el año 1967(5, 21-22)

El patrón de herencia de la anemia hemolítica por deficiencia de Hx es autosómico recesivo. Los heterocigotos no presentan signos de hemólisis, a pesar de que su actividad enzimática está alrededor del 50% de lo normal (6-8).

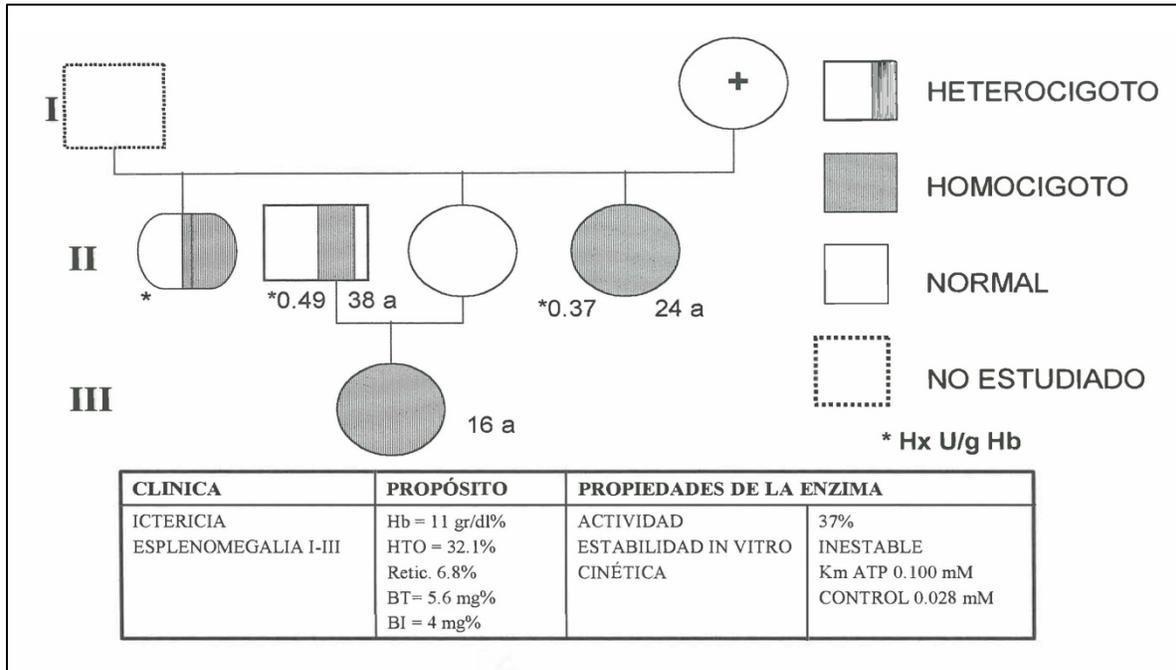
Es una deficiencia rara, solo 22 casos han sido reportados de origen noreuropeo o perimediterráneo (1). La relativa rareza de esta enzimopatía ha sido atribuida por algunos autores a la dificultad que existe en la práctica para detectarla, ya que, al ser una enzima muy sensible a la reticulocitosis, cuando ésta es muy elevada, hecho frecuente en esta enzimopatía, el déficit enzimático puede pasar fácilmente desapercibido (5, 23, 24,30)

El objeto de este trabajo es la presentación de tres familias deficientes en hexoquinasa con anemia hemolítica congénita y de estas una presentó una variante o mutante de hexoquinasa.

PACIENTE CON ANEMIA HEMOLÍTICA CRÓNICA ASOCIADA A UNA VARIANTE DE HEXOQUINASA

Se trata de una paciente LL de 24 años de edad, natural de San Casimiro, Estado Aragua, quien fue referida por anemia hemolítica de larga evolución. La paciente refería ictericia y anemia desde su infancia, no relacionadas con ingestión de drogas. La paciente tiene una hermana con diagnóstico de litiasis biliar, un hermano asintomático y 2 sobrinas con historia de ictericia neonatal. El examen físico fue normal excepto por ictericia conjuntival (Fig. 1).

FIGURA 1
DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA FAMILIA LIN
(SAN CASIMIRO, EDO. ARAGUA)



II. EXÁMENES DE LABORATORIO

A. HEMATOLOGÍA

Contaje rojo: $3,54 \times 10^6$ gl. rojos / di, Hemoglobina: 11 g / di,
Hematocrito: 32,1 %
VCM: 87 mu (VN: 80-97 fl),
HCM: 30,9 pg. (VN: 27-32 pg),
CHCM: 35,7%(VN: 0,1-0,5%).
Reticulocitos: 6,8% (VN: 0,4-1,0%)
Contaje blanco y plaquetario: normales
Frotis de sangre periférica mostró: policromasia ++,
poiquilocitosis ++, esferocitosis ++, esquistocitosis ++

B. QUÍMICA SANGUÍNEA

Bilirrubina Total: 5,6 mg / dl (VN:0.2-1.2)
Bilirrubina Directa: 1,6 mg / dl (VN: 0.2-1)
Bilirrubina Indirecta: 4,0 mg / dl (VN: 0.1-0.3)
Fosfatasas Alcalinas: 89 U / lt (VN: 30-115)
LDH: 432 U / lt (VN: 100-225)

C. EXÁMENES ESPECIALES

Coombs directo e indirecto: negativos
Investigación de cuerpos de Heinz en fresco e incubados: negativos
Curva de Fragilidad Globular en fresco e incubada: Normal
Prueba de Ham para detectar hemoglobinuria paroxística nocturna: negativa.
Prueba de Inestabilidad al calor para detectar hemoglobinas inestables: negativa
Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, buffer tris
HCL 0,1M pH 8,6: hemoglobina AA del adulto
Cuantificación de hemoglobina A2: 2,2%(VN: 1,5-3,3%),
Hemoglobina Fetal: 0,8% (VN: 0,5-1,0%).
Curva de disociación de oxígeno practicada en el Hemoscan Aminco: ligeramente desviada a la derecha con un p50: 33 mmHg (VN: 26-27 mmHg)

D. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

Las pruebas pantallas de Beutler para detectar deficiencias de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, piruvato quinasa, triosa fosfato isomerasa, NADH metahemoglobina reductasa: normales

Cuantificación de las enzimas de la vía glicolítica y de la vía de la hexosa monofosfato: Todos los niveles de enzimas intraeritrocíticas fueron encontrados normales o ligeramente aumentados excepto el de la hexoquinasa que fue encontrado disminuido en 0,370(VN: 0,80-1,2 U.I g/ Hb), dichos eritrocitos solamente poseían el 41% de la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos normales provenientes de donantes del Banco de Sangre (Tabla I)

TABLA 1
ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LOS INTRAERITROCITICAS DE LA
PACIENTE LL Y CONTROL

Enzimas	Propósito Eritrocitos U.I/gHb	Control Eritrocitos U.I/gHb
HEXOQUINASA	0,35	0,88
Glucosa fosfato isomerasa	30,0	30,19
Fosfofrctoquinasa	2,91	2,76
Aldolasa	1,65	1,30
Gliceraldehído fosfato dehidrogenasa	158,40	124,50
Fosfogliceroquinasa	248,80	219,00
Difosfogliceromutasa	4,94	3,35
Monofosforogliceromu	10,00	11,00
Tasa		
Enolasa	1,90	1,80
Piruvato quinasa	1,15	1,99
Dehidrogenasa láctica	50,90	25,20
Glucosa-6-fosfato hidrogenasa	11,70	8,0
Glutation reductasa con Flavinadenindinucleótido	5,0	4,4
Glutación reductasa sin Flavinadenindinucleótido	4,60	3,60

Cuando comparamos la actividad de Hx de los eritrocitos de la paciente con la de los eritrocitos provenientes de un paciente con anemia hemolítica congénita por esferocitosis, pero con el mismo grado de reticulocitosis que la paciente propósito, encontramos que en estos casos la actividad de Hx fue de 2,24 UI/g hemoglobina. Este valor de Hx intraeritrocítico es más alto que los valores de hexoquinasa intraeritrocíticos de eritrocitos normales provenientes de donantes del Banco de Sangre y aún más alto que los niveles

de Hx intraeritrocíticos encontrados en los eritrocitos de la paciente LL propósito de esta familia con el mismo grado de reticulocitosis. (Tabla II)

TABLA II
NIVELES DE HEXOQUINASA INTRAERITROCITICA

Hexoquinasa UI/gHb

Eritrocitos de Paciente y familiares	Eritrocitos Jóvenes	Eritrocitos viejos	Eritrocitos totales (Jóvenes + Viejos)
PROPOSITO LL	0,400	0,200	0,372
HERMANO A. L	1,260	0,334	0,487
HERMANA M. L	0,817	0,310	0,454
CONTROL (donante)	1,500	0,900	0,0870 ± 0,27
CONTROL (anemia hemolítica con 6,4 % de reticulocitos)	-	-	2,24

HEXOQUINASA DE LOS ERITROCITOS DE LOS FAMILIARES DE LA PACIENTE LL (PROPÓSITO)

Los eritrocitos provenientes de los hermanos de la paciente LL con deficiencia de Hx presentaron niveles intraeritrocíticos de hexoquinasa de 0,487 y 0,454 U.IIg Hb. Dichos niveles estuvieron disminuidos en relación a los niveles de Hx de los eritrocitos controles provenientes de donantes del Banco de Sangre Hb y los eritrocitos de los sobrinos de la paciente presentaron valores normales de Hx (1,0 y 0,920 U. Iig Hb). (Tabla II)

ACTIVIDAD DE HEXOQUINASA EN ERITROCITOS JÓVENES Y MADUROS

Cuando se comparó la actividad de la Hx de los eritrocitos jóvenes y maduros de la paciente se encontró que la actividad de Hx estaba disminuida en ambas poblaciones

celulares, siendo de 0,400 UI/g Hb en los eritrocitos jóvenes y de 0,200 UI/g Hb en los eritrocitos maduros. En contraste al hacer la misma comparación con los eritrocitos de jóvenes y maduros de los hermanos de la paciente solo los eritrocitos maduros mostraron la enzima Hx disminuida (Tabla III).

TABLA III
ACTIVIDAD DE HEXOQUINASA ERITROCITICA FAMILIA LL

PACIENTES	HEMOLIZADO FRESCO	HEMOLIZADO DE 24H (Sin glucosa)	HEMOLIZADO Dializado 12 horas
PROPÓSITO (LL)	0,372 (100%)	0,132 (35,48 %)	0,0 (0 %)
HERMANO (AL)	0,487 (100%)	0,300 (61,6 %)	-
HERMANA (ML)	0,454 (100%)	0,276 (60,7 %)	-
SOBRINA (ML)	1,00 (100%)	-	-
SOBRINA (ML)	0,920 (100%)	-	-
CONTROL	0,992 (100%)	0,908 (93%)	0,519 (59 %)

PROPIEDADES DE LA HEXOQUINASA RESIDUAL DE LOS ERITROCITOS DE LA PACIENTE PROPOSITO LL

pH ÓPTIMO: el hemolizado de los eritrocitos de la paciente mostró una curva bifásica con un pH óptimo de 9,0 mientras que el hemolizado de los eritrocitos controles provenientes de donantes presentaron una curva sencilla con un sólo pico y un pH óptimo de 8,5.

TERMOESTABILIDAD

El estudio de la estabilidad enzimática de la Hx a 46°C mostró que en 15 minutos el hemolizado de los eritrocitos de la paciente propósito deficiente en Hx perdió toda actividad de Hx mientras que el hemolizado de los eritrocitos controles perdió solamente el 18% de su actividad enzimática en un periodo de incubación de 30 minutos a 46° C.

Los hemolizados de los eritrocitos provenientes de los hermanos de la paciente deficiente en Hx mostraron curvas de termoestabilidad intermedia entre la obtenida con los eritrocitos de los controles y los eritrocitos de la paciente.

ESTABILIDAD DE LA HEXOQUINASA A LA DIÁLISIS

El hemolizado de los eritrocitos de la paciente propósito perdió el 64,5% de actividad de Hx cuando fue mantenido a 4°C mientras que el hemolizado de eritrocitos controles solo perdió el 7% de su actividad de hexoquinasa.

Cuando el hemolizado de los eritrocitos de la paciente deficiente en Hx fue dializado 12 horas contra una solución estabilizante que contenía EDTA y beta mercaptoetanol, la actividad de hexoquinasa se perdió completamente mientras que la enzima Hx del hemolizado control perdió el 41% de actividad enzimática bajo las mismas condiciones.

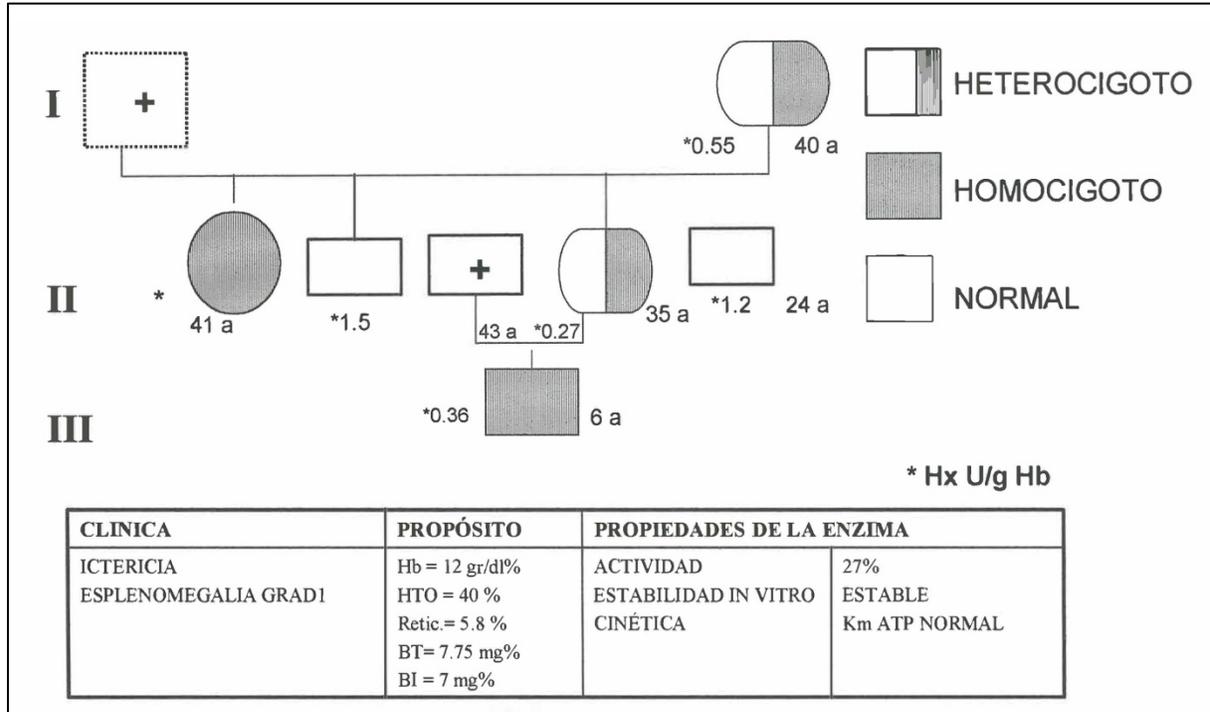
AFINIDAD DE LA HEXOQUINASA POR SUS SUSTRATOS

El Km para el ATP de la Hx residual de los eritrocitos de la paciente deficiente en hexoquinasa fue de 0.100 mM, mientras que el Km para el ATP de los eritrocitos del control fue de 0.024 mM. La Hx residual proveniente de los hemolizados de los hermanos del propósito presentaron valores de Km para el ATP de 0.038 mM y 0.065 mM.

ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA POR DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA EN LA FAMILIA PER-CAM.

Se trata de un paciente de 6 años de edad quién fue referido a la consulta del Instituto de Oncología y Hematología por hiperbilirrubinemia indirecta. El paciente tenía antecedentes de ictericia neonatal que ameritó fototerapia. Al examen físico preescolar en buenas condiciones generales con ictericia conjuntival y polo esplénico palpable. El paciente era oriundo de Villa de Cura, Edo Aragua, así como sus progenitores (Fig.2)

FIGURA 2
DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA FAMILIA PER-CAM)
VILLA DE CURA, EDO. ARAGUA)



A. HEMATOLOGÍA

Hemoglobina: 12 gr. %

Hematocrito: 40%

VCM: 80mu (VN:80-94 mu)

HCM: 30 pg. (VN:27-32 pg)

CHCM: 34% (VN: 0,1-0,5%)

Reticulocitos: 5.8% (VN: 0.1-1.0%)

Contaje blanco y plaquetario: normales

Frotis de sangre periférica mostró:

policromasia ++

esferocitosis +

esquistocitosis +

B. QUÍMICA SANGUÍNEA

Bilirrubina Total:	7,75 mg / dl (VN:0.2-1.2)
Bilirrubina Directa:	0,75 mg / di (VN: 0.2-1)
Bilirrubina Indirecta:	7,0 mg / di (VN: 0.1-0.3)
Fosfatasas Alcalinas:	140 U /lt (VN adultos: 30-115)
LDH:	400 U/lt (VN: 100-225)

C. EXÁMENES ESPECIALES

Coombs directo e indirecto: negativos

Investigación de cuerpos de Heinz en fresco e incubados:
negativos

Curva de Fragilidad Globular en fresco e incubada: Normal

Prueba de Ham para detectar hemoglobinuria paroxística nocturna: **negativa**

Prueba de Inestabilidad al calor para detectar hemoglobinas inestables:
negativa

Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, buffer tris

HCL 0,1M pH 8,6: hemoglobina AA del adulto

Cuantificación de hemoglobina A2: 2,0%(VN: 1,5-3,3%),

Hemoglobina Fetal: 1,0% (VN: 0,5-1,0%).

Curva de disociación de oxígeno practicada en el Hemoscan

Aminco: normal con un p50: 27 mmHg (VN: 26-27 mmHg)

D. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

Las pruebas pantallas de BEUTLER para detectar deficiencias de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, piruvato quinasa, triosa fosfato isomerasa, NADH metahemoglobina reductasa: fueron normales, no se detectó deficiencia de ninguna de estas enzimas.

Cuantificación de las enzimas de la vía glicolítica y de la vía de la hexosa monofosfato:

Todos los niveles de enzimas intraeritrocíticas fueron encontrados normales o ligeramente aumentados excepto el de la Hx que fue encontrado disminuido en 0,360(VN: 0,80-1,2 U.I g/ Hb), dichos eritrocitos solamente poseían el 41% de la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos normales provenientes de donantes del Banco de Sangre (Tabla IV).

TABLA 4
ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS ERITROCITOS DE LA PACIENTE
LL DEFICIENTE EN HEXOQUINASA Y DE LOS CONTROLES

Enzimas	Propósito Eritrocitos U.I/gHb	Control Eritrocitos U.I/gHb
HEXOQUINASA	0,36	0,88
Glucosa fosfato isomerasa	32,0	30,19
Fosfofructoquinasa	2,90	2,76
Aldolasa	1,70	1,30
Gliceraldehído fosfato dehidrogenasa	128,40	124,50
Fosfogliceroquinasa	228,80	219,00
Difosfogliceromutasa	3,94	3,35
Monofosfogliceromu	11,00	11,00
Tasa		
Enolasa	1,80	1,80
Piruvato quinasa	1,00	1,99
Dehidrogenasa láctica	28,90	25,20
Glucosa-6-fosfato hidrogenasa	10,70	8,0

Cuando comparamos la actividad de Hx de los eritrocitos del paciente con la de los eritrocitos provenientes de un paciente con anemia hemolítica congénita por esferocitosis con 5,8% de reticulocitos encontramos que en estos casos la actividad de Hx fue de 2,24

UI/g hemoglobina mientras que la actividad de Hx de los eritrocitos del paciente con 5,8% de reticulocitos fue mucho más baja de 0,360 U.II g Hb.

La Hx de los eritrocitos de la madre del propósito PER-CAM estuvieron disminuidos (0,27 U.II g Hb), al igual que la Hx de los eritrocitos de la abuela materna (0,55 U.II g Hb), así mismo la Hx intraeritrocítica de al tía del propósito PER-CAM (Tabla V).

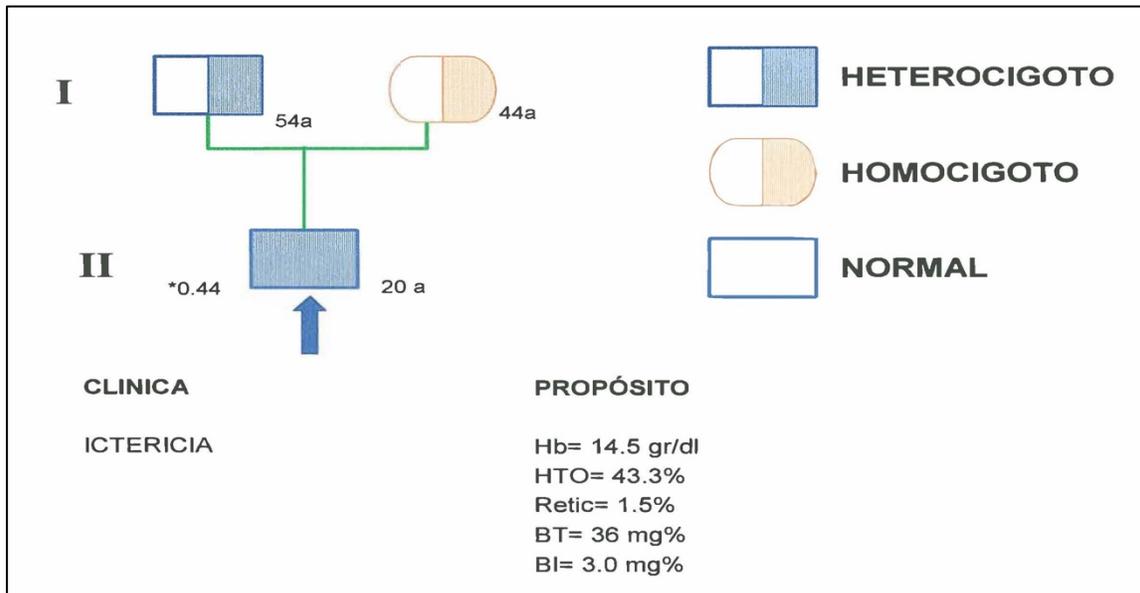
TABLA V
NIVELES DE HEXOQUINASA INTRAERITROCITICA
EN PACIENTE CON ANEMIA HEMOLITICA
CONGENITA Y FAMILIARES

ERITROCITOS Y FAMILIARES	HEXOQUINASA U.I/gHb
PROPÓSITO LP	0,36
MADRE	0,27
TIA	0,61
TIO	1,20
TIO	0,15
ABUELA Materna	0,559
CONTROL (donante)	0,870 ± 0,27
CONTROL (anemia hemolítica con 6,4 % de reticulocitos)	2,24

ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA POR DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA EN LA FAMILIA G.G.

Se trata de un paciente de 20 años de edad quién fue referido a la consulta del Instituto de Oncología y Hematología por hiperbilirrubinemia indirecta. El paciente tenía antecedentes de ictericia neonatal que ameritó fototerapia. Al examen físico adulto en buenas condiciones generales con ictericia conjuntival y resto del examen físico completamente normal. El paciente era oriundo de Carúpano Estado Sucre, así como sus progenitores (Fig.4)

FIGURA 4
DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA FAMILIA G.G.
(CARÚPANO, EDO. SUCRE)



A. HEMATOLOGÍA

Hemoglobina: 14.5 g / dl,
 Hematocrito: 43.3%
 VCM: (VN:80-94 fl)
 CHCM: 83 fl 34,7% (VN: 32-36%)
 Reticulocitos: 1,5% (VN: 0,1 - 0,5%)
 Contaje blanco y plaquetario: normales

B. QUÍMICA SANGUÍNEA

Bilirrubina Total: 3,60 mg / dl (VN: 0.2-1.2)
 Bilirrubina Directa: 3,0 mg / dl (VN: 0.2-1)
 Bilirrubina Indirecta: 0,60 mg / dl (VN: 0.1-0.3)
 Fosfatasas Alcalinas: 115 U / lt (VN adultos: 30-115)
 LDH: 180 U/lt (VN: 100-225)

C. EXÁMENES ESPECIALES

Coombs directo e indirecto: negativos

Investigación de cuerpos de Heinz en fresco e incubados: Negativos

Curva de Fragilidad Globular en fresco e incubada: Normal

Prueba de Ham para detectar hemoglobinuria paroxística nocturna:
Negativa.

Prueba de Inestabilidad al calor para detectar hemoglobinas inestables:
negativa

Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, buffer tris

HCL 0,1M pH 8,6: hemoglobina AA del adulto

Cuantificación de hemoglobina A2: 2,0%(VN: 1,5-3,3%),

Hemoglobina Fetal: 1,0% (VN: 0,5-1,0%).

Curva de disociación de oxígeno practicada en el Hemoscan

Aminco: normal con un p50: 27 mmHg

D. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

Las pruebas pantallas de BEUTLER para detectar deficiencias de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, piruvato quinasa, triosa fosfato isomerasa, NADH metahemoglobina reductasa: fueron normales, no se detectó deficiencia de ninguna de estas enzimas.

Cuantificación de las enzimas de la vía glicolítica y de la vía de la hexosa Monofosfato:

Todos los niveles de enzimas intraeritrocíticas fueron encontrados normales o ligeramente aumentados excepto el de la Hx que fue encontrado disminuido en 0,44 (VN: 0,80-1,2 U.I g/ Hb), dichos eritrocitos solamente poseían el 50% de la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos normales provenientes de donantes del Banco de Sangre (Tabla VI). Los eritrocitos de los padres del paciente GG presentaron también niveles intraeritrocíticos de hexoquinasa disminuidos en relación a los eritrocitos controles (Tabla VII)

TABLA 6
ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS
ERITROCITOS DE LA PACIENTE G.G
DEFICIENTE EN HEXOQUINASA Y DEL CONTROL

Enzimas	Propósito Eritrocitos U.I/gHb	Control Eritrocitos U.I/gHb
HEXOQUINASA	0,44	0,88 ± 0,27
Glucosa fosfato isomerasa	31,0	30,19 ± 11,31
Fosfofructoquinasa	2,90	9,27 ± 2,7
Aldolasa	1,60	1,72 ± 0,42
Gliceraldehído fosfato dehidrogenasa	128,80	124,5 ± 40,2
Fosfogliceroquinasa	228,80	219,0 ± 21,2
Difosfogliceromutasa	3,20	3,35 ± 0,60
Monofosforogliceromu	12,00	11,0 ± 1,42
Tasa		
Enolasa	1,70	1,8 ± 0,1
Piruvato quinasa	1,36	1,09 ± 0,1
Dehidrogenasa láctica	28,00	25,2 ± 15
Glucosa-6-fosfato hidrogenasa	12,70	8,0 ± 1,6

TABLA 7
NIVELES DE HEXOQUINASA INTRAERITROCITICA EN
PACIENTE G.G. CON ANEMIA HEMOLITICA
CONGÉNITA Y FAMILIARES

Eritrocitos de Paciente y familiares	Hexoquinasa U.I/gHb
PROPÓSITO LP	0,44
MADRE	0,27
CONTROL (donante)	0,870 ± 0,27

DISCUSIÓN

Se detectaron a lo largo de este estudio solo tres familias deficientes en la hexoquinasa, lo cual demuestra la baja frecuencia de esta enzimopatía como causante de anemia hemolítica congénita. Solo 22 casos de anemia hemolítica congénita han sido atribuidas a la deficiencia de Hx a nivel internacional y esto explica que solamente tres familias hayan sido detectadas (9). Pero con este estudio se demuestra que la deficiencia de Hx está presente en Venezuela en dos familias procedentes del estado Aragua y en una familia procedente del Estado Sucre. Podríamos asumir que al igual que la deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa y la piruvato quinasa, la anemia hemolítica congénita por deficiencia de Hx fue traída a Venezuela por inmigrantes portadores de dichos genes para las deficiencias respectivas basados en que se conoce que la raza venezolana es una mezcla de indígenas, caucásicos y poblaciones negroides y que los indígenas venezolanos estudiados no presentan deficiencias de otras enzimopatías de la vía glicolítica como PK y de la vía de la glicólisis (9).

Los tres pacientes detectados con deficiencia de Hx presentaban un cuadro de anemia hemolítica, siendo más severo en la paciente LL con anemia, reticulocitosis y bilirrubina indirecta elevada (Fig.1-4). Esta paciente se caracterizó por presentar úlceras en miembros inferiores como ha sido descrito en pacientes con anemia hemolítica crónica por deficiencia de piruvato quinasa, esferocitosis congénita, drepanocitosis, talasemias, eliptocitosis. En este caso no podríamos asumir que las úlceras en piernas son debidas a oclusión de los vasos sanguíneos como se ha encontrados en ciertos casos de pacientes con drepanocitosis (32,33, 34). Algunos autores han atribuido las úlceras de las piernas de los pacientes con drepanocitosis a aumento de la presión venosa en las piernas por la expansión del volumen de la hipertrofiada médula ósea (35).

El estudio de la estabilidad enzimática de la Hx de esta paciente a 46°C mostró que en 15 minutos el hemolizado de los eritrocitos de la paciente propósito deficiente en hexoquinasa perdió toda actividad de Hx mientras que el hemolizado de los eritrocitos controles perdió solamente el 18% de su actividad enzimática en un periodo de incubación

de 30 minutos a 46° C. Este estudio indica que la enzima Hx de la paciente LL es una variante inestable, como ha sido reportado por Magnani en una paciente de 27 años con anemia hemolítica crónica, disminución de la actividad de Hx eritrocítica a pesar del grado de reticulocitosis. Esta enzima presentó actividad dependiente del pH, Km normal para glucosa, fructosa, Km normal para ATP, pero fue inactivada rápidamente a 44° C, indicando que la enzima Hx de esta paciente presentaba inestabilidad reducida. (10).

La variante de Hx inestable de la paciente LL la denominamos Caracas (Fig. 1). Las anormalidades cualitativas características de las variantes de Hx pueden reflejar una mutación estructural o del gen regulatorio. (25,26). Las anormalidades cinéticas notadas en varias mutantes de Hx reportadas seguramente refleja una anormalidad no definida de la proteína de la enzima (5)

Los eritrocitos provenientes de los hermanos de la paciente LL con deficiencia de Hx presentaron niveles intraeritrocíticos de Hx de 0,487 y 0,454 U.IIg Hb. Aproximadamente el 50% de la actividad de Hx de los eritrocitos controles. (Tabla II)

Esto concuerda con los valores de Hx de familiares de propósitos deficientes reportados previamente (1,10)

Llama la atención que el paciente propósito de la familia G.G presentaba una hemólisis bien compensada ya que los niveles de hemoglobina y hematocrito permanecían normales con solamente una hiperbilirrubinemia indirecta (Fig. 4). Este espectro en la severidad de la hemólisis desde hemólisis bien compensada a hemólisis muy severa ha sido observada en pacientes deficientes en hexoquinasa. (1,11-13). Este espectro de severidad de la hemólisis también ha sido observado en la deficiencia de G-6-PD. La relación entre el grado de deficiencia de la enzima y la extensión de las disfunciones en los eritrocitos y otros tejidos depende de varios factores, tales como la estabilidad de la enzima mutante contra la degradación proteolítica y anormalidades funcionales, la posibilidad de compensar la deficiencia por una sobreexpresión de la correspondiente isoenzima o por una vía metabólica alterna (30).

No se observaron episodios de hiperhemólisis en los pacientes a lo largo de los años de este estudio, como ha sido observado en la hemólisis por deficiencia de G-6-PD (12). Ningún paciente presentó aplasia de médula ósea como ha sido reportado por Lohn en 4 pacientes deficientes en Hx que presentaron un síndrome de Fanconi asociado (5, 22).

Los niveles de Hx intraeritrocíticos estuvieron disminuidos en los propósitos de las tres familias estudiadas, pero persistía una actividad de hexoquinasa residual del 41%, 41%, y 50% (Fig. 1 a 4) respectivamente. La actividad máxima de la Hx intraeritrocítica de paciente deficientes reportados en la literatura internacional ha variado de 13 a 91% de lo normal (1). Esto coincide con los niveles de Hx intraeritrocíticos de los tres pacientes que estamos reportando en este estudio como deficientes en la Hx. Los niveles intraeritrocíticos de la Hx fueron encontrados disminuidos en los eritrocitos jóvenes y maduros de los propósitos estudiados llamando la atención que al cuantificar dicha actividad enzimática en los eritrocitos de los hermanos de la paciente LI, solo los eritrocitos maduros manifestaron la deficiencia., esto coincide con los reportes de que la actividad de Hx declina con la edad del eritrocito y dicha actividad se pierde durante la maduración de los reticulocitos, jugando un papel muy importante en la regulación de la glicólisis del eritrocito (15,16,30). De allí se explica que la Hx es la enzima glicolítica que presenta dificultades para cuantificarla en los casos severos debido a la reticulocitosis, ya que estos tienen una actividad enzimática de Hx y la concentración de intermediarios más alta que el eritrocito maduro (9, 30). Una alternativa para predecir cambios metabólicos en estos casos es el análisis por modelos matemáticos, los cuales toman en cuenta la homeostasis de las variables metabólicas esenciales como son el estado energético (ATP), la capacidad reductiva y el estado osmótico. Estos análisis matemáticos consideran como criterio de muerte celular el nivel del aumento del volumen celular al cual la célula va a ser secuestrada por el sistema macrocítico- monocítico o lisada en la circulación (30, 31)

En los eritrocitos de la paciente LL con reticulocitosis mostraron valores de Hx mucho más bajos que los eritrocitos controles con el mismo grado de reticulocitosis 0,360 vs. 2,24

U.I. 1 g Hb, lo cual implica que el defecto de la deficiencia de Hx está presente desde temprana edad tales como en eritrocitos inmaduros como los reticulocitos. Los padres, hermanos y familiares de los propósitos que eran heterocigotos para la deficiencia de Hx presentaron valores de hexoquinasa intermedios entre los del propósito y los controles, como ha sido descrito (4).

BIBLIOGRAFÍA

1. Mentzer, W. Pyruvate kinase deficiency and disorders of glycolysis. Capítulo 18, pag. 667. Nathan & Oski (Eds) Hematology Infancy and Childhood. 4a edición. W.B. Saunders Co, 1998.
2. Muller-Soyano A: Anemias hemolíticas por defectos enzimáticos en Lopez Borrasca A, Arocha- Piñango C.L., Campos Guerra C., Parrreira A, Pavlovsky S., San Miguel J(Eds) Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Cap. 29, pag. 334. Ediciones Universidad de Salamanca 1992
3. Beutler, E.: Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia pyruvate kinase deficiency and other anomalies. Capítulo 58, pag. 574. En Williams W.J, Beutler E, Erslev A, Lichtman M (Eds) Hematology, McGraw Hill.
4. Tanaka K. R., Zerler Ch R.: Red cell enzymopathies of the glycolytic pathway. Seminars in Hematology 27: 168, 1990
5. Vives Corrons J: Deficiencias enzimáticas del metabolismo glucolítico anaeróbico en Lopez Borrasca A, Arocha- Piñango C.L., Campos Guerra C. Parrreira A., Pavlovsky S., San Miguel J(Eds) Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Cap. 30, pag. 339. Ediciones Universidad 1992 de Salamanca
6. Magnani, M., Rossi, L., et al: Improved metabolic properties of hexokinase-overloaded human erythrocyte. Biochem. Biophys. Acta. 155: 423, 1988.
7. Fomaini G, Dacha M et al: Role of hexokinase in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes. Ital J. Biochem 35:316, 1986
8. Magnini M, Rossi L et al: Role of hexokinase in the regulation of erythrocyte monophosphate pathway under oxidative stress. Biochem. Biophys Res Commun 155: 423, 1988
9. Muller-Soyano, A.: Anemias hemolíticas por deficiencias de las enzimas del ciclo glicolítico. Capítulo 10, pag. 210. En Perez-Requejo J.L (Ed) Hematología. Editorial Disinlimed, C.A, 1995.

10. Magnani M, Stocchi V, Cucchiarini L, Novelli G, Lodi S, ISA L, Fornaini G. Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia due to a new hexokinase variant with reduced stability. *Blood*: 66 (3): 690, 1985.
11. Valentine, W.N, Oski, F.A, Baughan, M.A, Schneider, A.S, Naiman, J.L.: Erythrocyte hexokinase and hereditary hemolytic anemia. Capítulo 4, pag. 288. En Beutler, E. (Ed). *Hereditary disorders of erythrocyte metabolism*. New York. Grune & Stratton, 1968.
12. Necheles, T.F, Rai U.S, Cameron, D. Congenital nonspherocytic hemolytic anemia associated with an unusual erythrocyte hexokinase abnormality. *J. Lab. Clin. Med.* 76: 593, 1970.
13. Stimes MA, Rahiala EL, Leisti J: Hexokinase deficiency in erythrocytes: a new variant in 5 men of a Finnish family. *Scand J. Haematol.* 22(3): 214, 1979.
14. Muller A. Anemias hemolíticas por deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa. Cap 11, pag. 225. En Perez Requejo J.L (ED) *Hematología*. Desinlimed, C.A, Caracas, 1995.
15. Oski F, Naiman J.L. Disorders of red cell metabolism Vol IV in series Major Problems in Clinical Pediatrics M. Markowitz (ED) W.B. Saunders Co, 1983.
16. Fornaini G, Dacha M y col. Role of hexokinase in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes. *Ital. J. Biochem.* 35: 316, 1986
17. Valentine WN, Oski FA et al. Hereditary hemolytic anemia with hexokinase deficiency. *N. Engl J. Med*:276: 1, 1967
18. Gilsanz F, Meyer E, et al: Congenital hemolytic anemia due to hexokinase deficiency. *Am. J. Dis. Child* 132: 636, 1978
19. Paglia DE, Shende A et al. Hexokinase New Hyde Park a low activity erythrocyte isozyme in Chinese kindred. *Am. J. Hematol* 10: 107, 1981
20. Murakami K., BleiF et al An isoenzyme of hexokinase specific for the human red blood cell (HK.g) *Blood* 75: 770, 1990.
21. Povey S, Corney G et al. Genetically determined polymorphism of a form of hexokinase HKIII found in human leukocytes *Ann. Human Genet.* 38: 407, 1975.
22. Lohr GW, Waller HD et al: Hexokinase mangel in Blutzellen bei einer Sippe mit familiärer Panmyelopathie (typ Fanconi). *Klin Wochenschr* 43: 870, 1965
23. Magnani M, Stocchi V et al, Rabbit red blood cell hexokinase decay mechanism during reticulocyte maturation. *J. Biol Chem* 261: 8327, 1986.
24. Thorburn DR, Beutler E et al Decay of hexokinase during reticulocyte maturation: Is oxidative damage a signal for destruction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 612, 1989

25. Rijksen G, Staal GEJ et al Human erythrocyte hexokinase deficiency characterization of a mutant enzyme with abnormal regulatory properties. *J. Clin. Invest.* 62: 294, 1978
26. Rijksen G, Akkerman JWN et al Generalized hexokinase deficiency in the blood cells of a patient with nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* 61: 12, 1986
27. Peters LL, Lane PW, Andersen SG, Gwynn B, Barker JE, Beutler E. Downeast anemia (dea), a new mouse model of severe nonspherocytic hemolytic anemia caused by hexokinase (HK(1)) deficiency *Blood Cells Mol Dis.*27(5):850 2001
28. Martinov MV, Plotnikov AG, Vitvitsky VM, et al Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, 1474(1) 75, 2000
29. Baillieres: Hexokinase: gene structure and mutants. *Best Pract. Res. Clin. Haematol* 13(1): 83, 2000
30. Jacobasch G., Rapoport SM: Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. *Mol Aspects Med.* 17(2):143, 1996.
31. Martinov MV, Plotnikov AG, Vitvitsky VM, Ataulakhanon FL: Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochem. Biophys. Acta* 1474(1): 75, 2000
32. Muller-Soyano A, Roura E y col. Pyruvate kinase deficiency and leg ulcers. *Blood* 47:807, 1976.
33. Vives-Corrans JL, Marie J. Y col. Hereditary erythrocyte pyruvate kinase deficiency and chronic hemolytic anemia: clinical, genetic and molecular studies in six new spanish patients. *Hum. Genet.* 53:401,1980.
34. Platt O: The Sickel Syndromes Cap53, pag. 1680 in Handin R., Lux S., Stossel T. (Eds) *Blood Principles & Practice of Hematology.* J. B. Lippincott Co, 1995.
35. Thral JH, Rucknagel DL. Increased bone marrow blood flow in sickle cell anemia demonstrated by thallium 201 and Te 99m human albumin microshere. *Radiology* 127: 817, 1978.