



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

**ESTUDIO CLINICO, BIOQUIMICO
E INMUNOLOGICO DE LA DEFICIENCIA
DE GLUCOSA-6-FOSFATO
DESHIDROGENASA EN VENEZUELA**

AIXA MÜLLERDE SOYANO

Trabajo de Ascenso
Para Profesor Asistente
Cátedra Obstetricia
Escuela "Luis Razzetti"
Facultad de Medicina
Universidad Central de Venezuela

RESUMEN

La deficiencia de la glucosa-6-fosfato 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 e inmunológico realizado a 251 pacientes con deficiencia de G-6-PD referidos al Instituto de Oncología y Hematología del M.S.A.S-U.C.V. de diferentes regiones del país. Dichos pacientes han sido controlados en la consulta de dicho Centro durante los últimos 15 años.

Se estudiaron 2069 pacientes con anemia hemolítica congénita. Los métodos empleados fueron: historia clínica, hematologías, niveles séricos de bilirrubina total y fraccionada, niveles séricos de hierro, capacidad total de combinación de la ferritina, niveles de ferritina, electroforesis de Hb, cuantificación de la Hb A2 y Fetal, curva de fragilidad globular en fresco e incubada, determinación de los niveles intraeritrocíticos de las enzimas de las vías, glicolíticas y hexosa monofosfato, cuya deficiencia causa hemólisis, caracterización bioquímica de la G-6-PD residual (V max, Km, pH Óptimo, estabilidad al calor, movilidad electroforética), determinación de los niveles de Na, K, y calcio de los eritrocitos, determinación de los niveles de inmunoglobulinas, determinación de los niveles de complemento, estudio de la función fagocítica de los neutrófilos (endocitosis con *C. albicans*, prueba de reducción del nitroblutetrazolium, capacidad bactericida contra el *Stafilococcus aureus*, capacidad candidicida).

Se diagnosticaron las siguientes entidades nosológicas: hemoglobinopatías: 1386 pacientes, defectos de la membrana del eritrocito: 100 pacientes, talasemias: 296 pacientes y eritroenzimopatías: 287. De estas 251 correspondieron a deficiencia de G-6-PD. eritroenzimopatías: 287. De estas 251 correspondieron a deficiencia de G-6-PD, 287 pacientes deficientes en G-6-PD fueron clasificados de acuerdo a la clínica y estudio enzimático en 133 hemocigotos y 118 heterocigotos para la deficiencia de G-6-PD. El nivel intraeritrocítico de G-6-PD de los hemocigotos de acuerdo al paciente desde 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 en G-6-PD fue a través del cromosoma X.

Los pacientes hemocigotos se caracterizaron por clínicamente ser asintomáticos y tener valores de Hb, Hto, conteo 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, clorofeniramina, naftalina, etc), durante periodos de infecciones, o al ingerir habas. Durante la crisis hemolítica 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 deficientes anemia hemolítica por drogas oxidantes: 36,74%, ictericia neonatal: 30,72%, anemia hemolítica por infección: 6,02%, etc. La ictericia neonatal se presentó en el 80% de los casos durante el 2^{do} o 3^{er} 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.

El estudio clínico, y bioquímico de la G-6-PD residual intraeritrocítica permitió clasificar los pacientes deficientes en:

1. Clase I: 4,9% de la con anemia hemolítica congénita no esferocítica, padeciendo de ictericia crónica, esplenomegalia permanente, que aumenta con el transcurso de los años (con actividad de G-6-PD de 7,5-13% de lo normal, Km G-6-P: 133-220 [v.n: 50-70μ M], Km NADP: 3,8-4,0 [V.N: 2,9-4,4], inestables al calor, pH Óptimo: 8 y 9, electroforesis: variante rápida con 110 de movilidad electroforética).
2. Clase II: 45,7% de la, clínicamente asintomáticos fuera de crisis hemolítica (actividad de G-6-PD muy disminuida desde 0-10%, Km G-6-P: 31-200, Km NADP: 2,2-4,4, estabilidad al calor: inestable, pH Óptimo- 6,5 y 9,5, electroforesis: variante normal con movilidad electroforética de 100%.
3. Clase III 49,4 % de la, clínicamente asintomáticos fuera de crisis hemolítica (actividad de G-6-PD 11-58%, Km G-6-PD: 40-73, Km NADP: 1,4-2,9, estabilidad al calor: dos categorías inestable y estable al calor, pH óptimo: 8,9 y bifásico, dependiente del paciente estudiado, electroforesis: variantes "A" y "B" con movilidades electroforéticas de 100-110. Se presenta el estudio de dos familias con deficiencia de G-6-PD y enfermedad granulomatosa crónica.

Este trabajo sobre anemias hemolíticas por deficiencia de G-6-PD constituye en nuestro país el estudio con mayor número de pacientes evaluados exhaustivamente desde el punto de vista clínico, hematológico, bioquímico e inmunológico y cuyos pacientes han sido seguidos clínicamente por 15 años.

Es interesante señalarle a nuestros médicos que esta deficiencia existe en nuestro país y que puede ser tan severa que amerita transfusión de concentrado globular y en el caso de los neonatos fototerapia y hasta exanguinotransfusión y también que en nuestro país existe la Clase I de deficiencia de G-6-PD, que se presenta con anemia hemolítica crónica, que no es lo frecuente.

Este estudio tiene la importancia de presentar dos familias con deficiencia de G-6-PD y enfermedad granulomatosa crónica, las cuales son las primeras detectadas en Venezuela, y constituyen una patología muy infrecuente, a tal punto que han sido reportadas solo 7 casos de esta variante de G-6-PD a nivel mundial.

INDICE

	Páginas
INTRODUCCIÓN	8
• Bioquímica y metabolismo del eritrocito maduro	8
• Deficiencias de eritroenzimas asociadas a anemias hemolíticas congénitas	10
• Anemia hemolítica por deficiencia de glucosa:6-fosfato deshidrogenasa	11
• Capacidad bactericida de las células fagocíticas. Importancia de la producción de NADPH en la reacción Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa	13
• Patrón de Herencia	15
• Incidencia	16
• Heterogeneidad genética	16
• Genética Molecular	17
• Variantes de G-6-PD	17
• Mecanismo Fisiopatológico de la crisis hemolítica	19
 MATERIALES Y METODOS	 21
 RESULTADOS	 24
• Etiología de la hemólisis en 2069 pacientes estudiados	24
• Incidencia de la deficiencia de G-6-PD en 2069 pacientes	25
• Clasificación de 251 pacientes con deficiencia de G-6-PD según los niveles intraeritrocíticos de G-6-PD	25
• Patrones de herencia de la deficiencia de G-6-PD en Venezuela	27
• Procedencia de los pacientes deficientes en G-6-PD	28
• Manifestaciones clínicas de la deficiencia de G-6-PD en los propósitos estudiados.	29
• Hallazgos de laboratorio	32
• Anemia hemolítica congénita no esferocítica producida por la deficiencia de G-6-PD Clase I	35
• Evolución clínica de la anemia hemolítica congénita no esferocítica producida por la deficiencia de G-6-PD Clase I	36
• Favismo	37
• Asociación de la deficiencia de G-6-PD con otros tipos de anemias hemolíticas congénitas	38
• Asociación de deficiencia de G-6-PD con anemia secundaria a deficiencia de hierro	38
• Embarazo y deficiencia de G-6-PD	39
• Niveles intraeritrocíticos de Na y K en pacientes con deficiencia de G-6-PD	39
• Concentraciones de calcio en los eritrocitos de pacientes deficientes en G-6-PD	39

• Inmunidad humoral y función fagocítica de dos familias deficientes en G-6-PD y enfermedad granulomatosa crónica	41
• Estudio de la función de fagocitosis de los polimorfunucleares	48
• Estudio electroforético de la G-6-PD en 92 propósitos deficientes	51
• Estudio de las propiedades bioquímicas de la G-6-PD residual intraeritrocítica en 52 propósitos deficientes	53
DISCUSIÓN	57
BIBLIOGRAFIA	68

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: Metabolismo de la glucosa	9
FIGURA N° 2: Vía de las pentosas y metabolismo de glutatión	9
FIGURA N° 3: Fases de la fagocitosis	13
FIGURA N° 4: Reducción metabólica en neutrófilos	15
FIGURA N° 5: Patofisiología de la memolisis en glóbulos rojos deficientes en Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa	19
FIGURA N° 6: Etiología de la hemólisis en 2069 pacientes con anemia	24
FIGURA N° 7: Clasificación de 287 pacientes deficientes en eritroenzimas	25
FIGURA N° 8: Clasificación de 251 deficientes en G-6-PD	26
FIGURA N° 9: Valores de G-6-PD en heterocigotos	27
FIGURA N° 10: Valores de G-6-PD en hemicigotos	27
FIGURA N° 11: Patrones de herencia de 251 pacientes venezolanos deficientes en G-6-PD	28
FIGURA N° 12: Origen de las familias deficientes en Glucosa-6-Fosfato Dehidrogenasa	28
FIGURA N° 13: Hemoglobina, hematocrito, reticulocitos pre hemolisis y durante crisis hemolítica en pacientes deficientes en G-6-PD	33
FIGURA N° 14: Contenido intraeritrocítico de Na y K en pacientes con deficiencia tipo de anemias hemolíticas congénitas	40
FIGURA N° 15: Deficiencia de G-6-PD y enfermedad granulomatosa crónica	42
FIGURA N° 16: Propiedades bioquímicas y electroforéticas de la G-6-PD "B -"	52
FIGURA N° 17: Propiedades bioquímicas y electroforéticas de la G-6-PD "A-"	52

INDICE DE TABLAS

TABLA N° I:	Agentes mas frecuentes asociados con hemolisis en individuos deficientes en Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa	11
TABLA N° II:	Motivo de consulta de 166 pacientes propósitos deficientes en G-6-PD	29
TABLA N° III:	Valores hematológicos en pacientes hemicigotos deficientes en G-6PD	32
TABLA N° IV:	Valores hematológicos en pacientes heterocigotos deficientes en G-6-PD	33
TABLA N° V:	Valores hematológicos y bioquímicos durante y fuera de crisis hemolítica en adultos hemicigotos deficientes en G-6-PD	34
TABLA N° VI:	Valores hematologicos y bioquímicos durante y fuera de crisis hemolítica en niños hemicigotos para la deficiencia de G-6-PD	34
TABLA N° VII:	Valores hematológicos de pacientes heterocigotas para la deficiencia de G-6-PD durante y fuera de crisis hemolítica	35
TABLA N° VIII:	Valores intraeritrocitos de Na yK en pacientes deficientes en G-6-PD	40
TABLA N° IX:	Concentraciones de calcio en los eritrocitos de pacientes deficientes en G-6-PD	41
TABLA N° X:	Hematología de la familia Gonz. con deficiencia de G-6-PD y enfermedad granulomatosa crónica	44
TABLA N° XI:	Niveles de las enzimas intraeritrociticas de la familia Gonz. Con deficiencia de G-6-PD y enfermedad granulomatosa crónica	45
TABLA N° XI-A		45
TABLA N° XII:	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 granulomatosa crónica	47
TABLA N° XIII:	Estudio de la inmunidad humoral de la familia Gonz. y Ve con deficiencia de G-6-PD y enfermedad granulomatosa crónica	48
TABLA N° XIV:	Estudio de la función fagocitica de los polifornucleares de la familia Gonz. Y ve. Con deficiencia de G-6-PD y enfermedad granulomatosa crónica	48
TABLA N° XV:	Clase de G-6-PD en 52 pacientes venezolanos deficientes	51

INTRODUCCION

Las anemias hemolíticas congénitas por defectos enzimáticos fueron reconocidas como entidades diferentes a la ya conocida anemia hemolítica congénita por esferocitosis desde 1953, cuando Dacie llamó la atención sobre un grupo de pacientes con anemias hemolíticas congénitas, que diferían de los pacientes con anemia hemolítica congénita por esferocitosis, por no presentar en los frotis de sangre periférica los típicos esferocitos. Dacie las denominó anemias hemolíticas congénitas atípicas [1]. En 1958 Newton y Bass descubrieron que uno de esos pacientes con anemia hemolítica congénita atípica era deficiente en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) [2].

Las anemias hemolíticas por defectos enzimáticos pueden ser clasificadas en dos grandes grupos:

1. Deficiencia de G-6-PD y desórdenes relacionados con la vía de las pentosas, y
2. Deficiencia de piruvato quinasa y desórdenes de la glicólisis.

BIOQUIMICA Y METABOLISMO DEL ERITROCITO MADURO

Los eritrocitos maduros carecen de núcleo, mitocondrias, ribosomas y otros organelos; no tienen capacidad para replicarse, no realizan síntesis proteica, síntesis de lípidos ni fosforilización oxidativa. Los eritrocitos maduros, con un diámetro de aproximadamente 7 micras, requieren energía (en forma ATP) para mantener la flexibilidad de su membrana celular, lo cual le permite atravesar microcapilares de 3 micras de diámetro sin sufrir daños físicos y: por otro lado, mantener en su forma reducida el hierro de la hemoglobina y ciertos grupos sulfidrilos, lo cual es de vital importancia, ya que la hemoglobina es capaz de transportar oxígeno sólo cuando el hierro del hemo se encuentra en forma ferrosa. Esto se logra casi exclusivamente a través de la conversión de glucosa en ácido láctico a través de dos vías metabólicas, estrechamente ligadas: una vía directa (vía glicolítica) que consume alrededor del 90-95% de la glucosa que utiliza el eritrocito y que resulta fundamentalmente en la generación de ATP [Fig. N° 1], y una vía alterna (vía de la hexosa monofosfato o shunt de las pentosas) cuya función es la producción de NADPH, el cual es un agente reductor [Fig. N° 2].

FIGURA N° 1

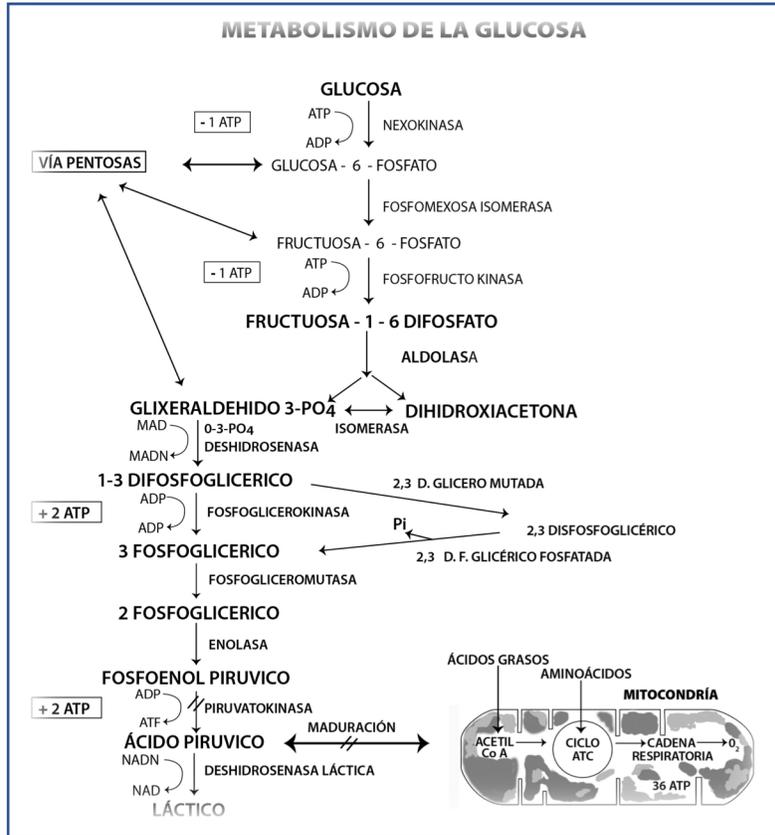
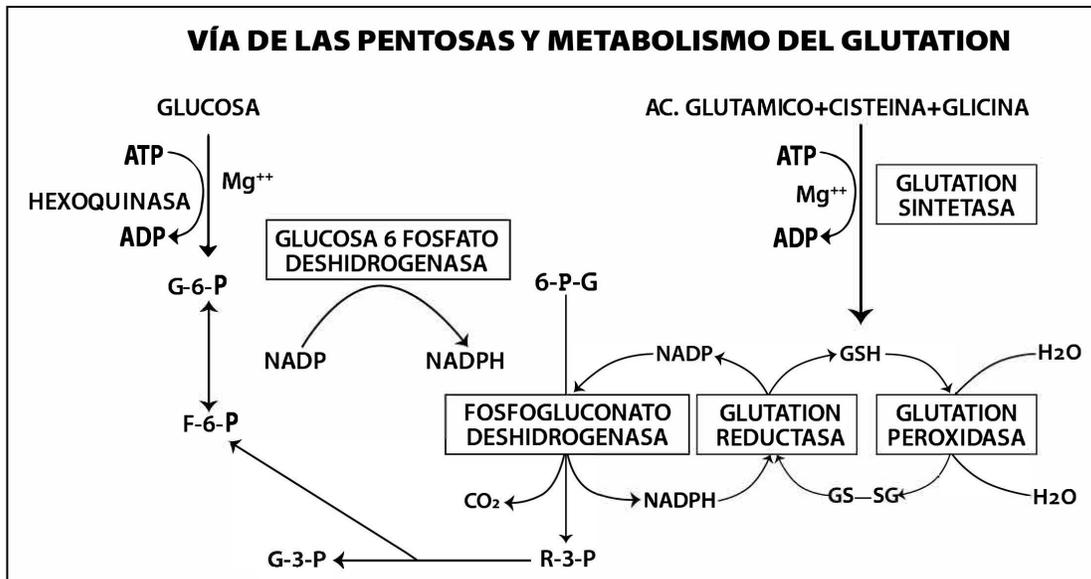


FIGURA N° 2



La deficiencia cualitativa o cambios en la estructura y por consiguiente función de algunas de las enzimas involucradas en los ciclos glicólisis, llamado también “shunt” de la hexosa monofosfato, puede dar origen a disminución del metabolismo de la glucosa a través de la vía glicolítica y por ende disminución de la producción, de ATP o disminución de la generación de NADPH por la vía del “shunt” de la hexosa monofosfato, cuyo resultado final puede ser el acortamiento de la vida media del eritrocito y por ende la aparición de una anemia hemolítica.

El eritrocito sin glucosa no puede funcionar ni sobrevivir. En estas condiciones el eritrocito no puede mantener el gradiente de sodio y de potasio que existe entre el medio extracelular y su medio intracelular, no puede prevenir la acumulación de calcio en su membrana, y en presencia de estrés oxidativo se le acumula metahemoglobina y glutatión oxidado. El eritrocito se transforma en equinocito y posteriormente en esferocito y sucumbe a la lisis osmótica [3].

DEFICIENCIAS DE ERITROENZIMAS ASOCIADAS A ANEMIAS HEMOLITICAS CONGENITAS

En el ciclo de la hexosa monofosfato han sido reportadas deficiencias de:

- glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- glutatión reductasa
- glutatión peroxidasa
- glutatión sintetasa
- glutamil-cisteína-sintetasa

En el ciclo glicolítico han sido descritas deficiencias de las siguientes enzimas:

- piruvato quinasa
- glucosa-fosfato isomerasa
- fosfofructoquinasa
- aldolasa
- triosa fosfato isomerasa
- 2,3 difosfogliceromutasa f
- fosfoglicerato quinasa
- enolasa

La deficiencia de otras enzimas no involucradas en las vías metabólicas anteriores, tales como la adenilato quinasa, ribosafosfato pirofosfoquinasa y adenosin trifosfatasa (ATPasa), también han sido asociadas a trastornos hemolíticos, aunque su frecuencia es relativamente pequeña [4].

ANEMIA HEMOLITICA POR DEFICIENCIA DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

Etiología de la Hemolisis. Importancia de la producción de NADPH

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) enzima que cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato (G-6-P) a 6P- gluconolactona y al mismo tiempo reduce el NADP a NADPH [Fig. N° 2].

Los pacientes que presentan una deficiencia hereditaria de esta enzima se caracterizan por presentar crisis hemolíticas cuando se exponen a drogas oxidantes, infecciones, acidosis o ingieren habas [Tabla N° I][4].

TABLA N° I
AGENTES MAS FRECUENTES ASOCIADOS CON HEMOLISIS EN INDIVIDUOS
DEFECIENTES EN GLOCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA

DROGAS	
SULFONAMIDAS Y SULFONAS	DIFENILSULFONA GLUCOSULFONATO DE SODIO SEPTRIN SULFANILAMIDA SULFAPIRIDINA SULFADIMIDINA SULFACETAMIDA SULFAFUROXONA (Gantrisin) SALICILAZOSULFAPIRIDINA DAPSONA
ANTIBACTERIANOS	CLORAMFENICOL NITROFURANTOINA FUZOLIDONA NITROFUZONA ACIDO NALIDIXICO ACIDO PARA AMINO SALICILICO
ANALGESICOS	ÁCIDOACETILSALICILICO EN DOSIS ALTAS ACETOFENETIDINA PARACETAMOL
ANTIMALARICOS	CLOROQUINA PAMAQUINA QUINACRINA
ANTIHELMINTICOS	BETA NAFTOL STIBOFAN NIRIDAZOLE

MISCELANEOS	ÁCIDO ASCORBICO AZUL DE METILENO VITAMINA "K" PROBENNECID DIMERCAPROL ARSINA FENILHIDRAZINA ACETIL FENIL HIDRAZINA AZUL DE TOLOIDINA
QUÍMICOS	BENCENO Y NEFTALINA
INGESTIÓN DE HABAS, INFECCIONES, HEPATITOS, ACIDOSIS	

El sustrato G-6-P puede ser utilizado ya sea a través de la vía principal de Embden-Meyerhof o a través de la vía de las pentosas o ciclo de la hexosa monofosfato [Fig. N° 1 y 2]. En condiciones ordinarias, sólo una fracción muy pequeña de glucosa-6-P es utilizada a través de la vía de las pentosas; la mayoría del flujo metabólico es derivado hacia la glicólisis, para generar ATP, 2,3-DPG y lactato. La vía de las pentosas o ciclo de la hexosa monofosfato provee al eritrocito de un mecanismo reductor efectivo.

Para sobrevivir el eritrocito tiene que proteger a los grupos sulfidrilos de la hemoglobina, de la membrana eritrocítica y de sus enzimas del daño oxidativo causado por la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido normalmente por reacciones metabólicas intracelulares, o por ingestión de drogas oxidantes. Esto lo logra manteniendo los niveles intraeritrocíticos de glutatión reducido (GSH) en cantidades adecuadas a través de la reacción de la glutatión reductasa, una de las enzimas que interviene en el ciclo del glutatión [Fig. N°2].

Cuando el eritrocito es atacado por el H_2O_2 , inmediatamente actúa la glutatión peroxidasa, la cual utiliza como sustrato GSH, transformando el H_2O_2 en H_2O y el glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG). A continuación, actúa la enzima glutatión reductasa, la cual utiliza como sustrato el GSSG y como coenzima al NADPH, producido en la reacción de la G-6-PD. Esta enzima controla el primer paso en la cadena de reacciones que constituye la vía de las pentosas, donde la G-6-P es convertida en 6-fosfogluconato y luego en ribulosa-5-P y ribosa-5-fosfato, los cuales se emplean en la síntesis de nucleótidos, donde son transformados en intermediarios glucolíticos a través de las enzimas del shunt de las pentosas. Por cada 3 moléculas de glucosa-6-P utilizada se forman 2 moléculas de fructosa-6-P y una de gliceraldehido-3-P (Fig. N° 2). La fructosa-6-P puede ser metabolizada a través de la glicólisis

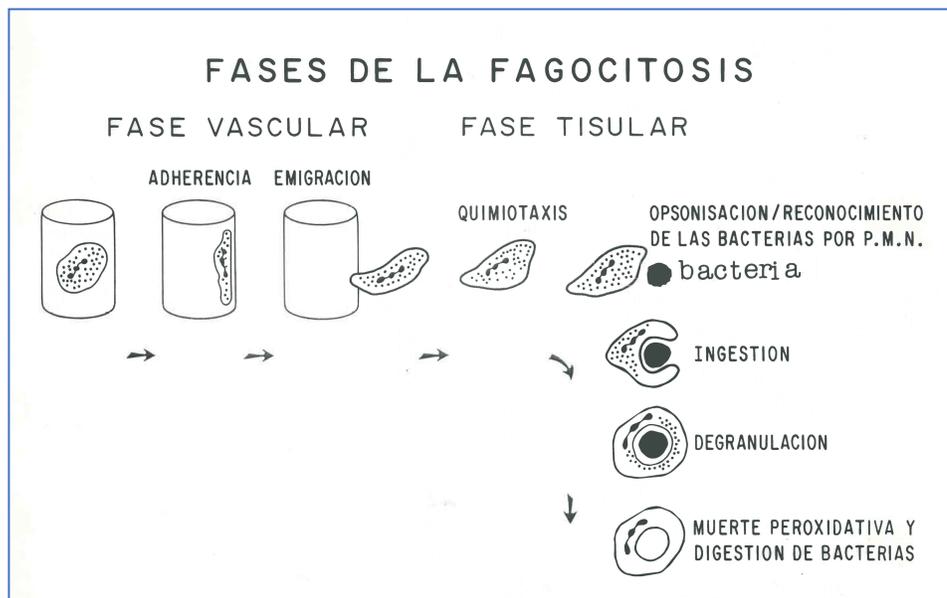
a lactato o convertida nuevamente a glucosa-6-P por la hexosa isomerasa para recomenzar el ciclo. Dos moléculas de gliceraldehido-3-P pueden ser convertidas en otra molécula de fructosa-6- p [Fig. N° 1][5].

CAPACIDAD BACTERICIDA DE LAS CELULAS FAGOCITICAS. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCION DE NADPH EN LA REACCION DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

Las células fagocíticas de nuestro organismo son los neutrófilos, macrófagos, monocitos y eosinófilos. El papel principal de dichas células fagocíticas es en la defensa contra una variedad de infecciones producidas por gérmenes gram negativos o positivos catalasa positiva. Dicha función la cumplen a través del proceso de fagocitosis de microorganismos invasivos bacterianos, virales u hongos.

La fagocitosis comprende varias etapas: adherencia al endotelio vascular, estiramiento, motilidad al azar, quimiotaxis, endocitosis o englobamiento de los microorganismos, activación metabólica, capacidad letal (Ej: bactericida, candidicida), digestión [Fig. N° 3].

FIGURA N° 3



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

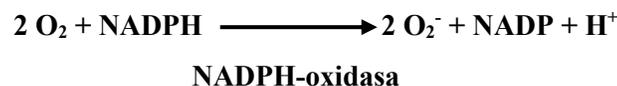
factores quimiotácticos producidos por el huésped (C5a, leucotrieno B4, C5,6,7), como mecanismo de defensa, y otros factores producidos por estos mismos agentes infecciosos.

Una vez que las células fagocíticas se han movilizado hacia los microorganismos infecciosos, ocurre el proceso de reconocimiento de los agentes infecciosos invasores. Estos microorganismos son previamente opsonizados, es decir, recubiertos por una serie de factores humorales u opsoninas (C3b, C4b, Ig G1, IgG3, IgM). El reconocimiento se realiza mediante receptores que hay en las células fagocíticas para las opsoninas, lo cual permite la fijación de los microorganismos recubiertos de opsoninas sobre la superficie de las células fagocítica.

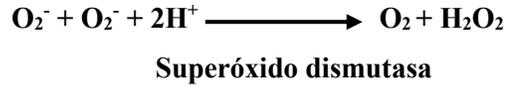
A continuación, ocurre el proceso de endocitosis, para lo cual, las células fagocíticas comienzan a emitir pseudópodos para englobar los microorganismos invasores. Se forma un fagosoma o vacuola que contiene al agente infeccioso

Una vez formado este fagosoma dentro del citoplasma celular, los lisosomas se acercan a él y se funden con él, formándose el fagolisosoma. Los lisosomas liberan dentro del fagolisosoma numerosas enzimas líticas y agentes oxidantes letales para los microorganismos infecciosos invasores. El sistema letal principal va a estar constituido por mieloperoxidasa, H₂O₂, iones cloro e iones iodo.

Al formarse el fagolisosoma, se estimula la producción de radical superóxido: O₂⁻, H₂O₂ y un número de compuestos adicionales que contienen oxígeno, todos los cuales son altamente reactivos. En adición existe un marcado incremento en la oxidación de la glucosa por la vía del “shunt” de la hexosamonofosfato con aumento de la producción de NADPH. Estos cambios en el metabolismo oxidativo son conocidos como *estallido respiratorio*, nombre que se deriva del incremento de muertes de microorganismos en los cuales el incremento de oxígeno es uno de los hallazgos constantes. En este estallido respiratorio 2 moléculas de oxígeno van a ser reducidas a 2 moléculas de radical superóxido 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:

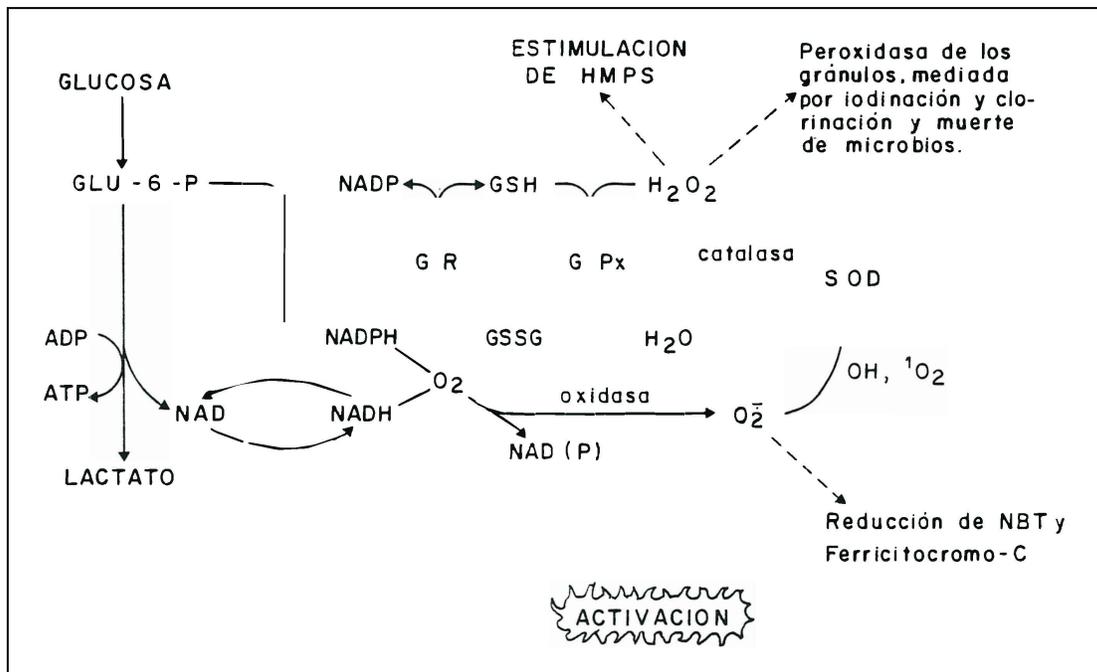


A su vez 2 moléculas de superóxido se combinan en presencia de la enzima superóxido dismutasa para formar H_2O_2



La mieloperoxidasa es depositada por degranulación en las vacuolas fagocíticas, donde en presencia de H_2O_2 y radicales haluros cataliza las reacciones microbicidas [Fig. N° 4]. En ausencia de G-6-PD no se producirá NADPH y por lo tanto el poderoso mecanismo letal que poseen las células fagocíticas contra los microorganismos invasores no funcionará y se producirán infecciones en el huésped [6].

FIGURA No 4
REDUCCIÓN METABÓLICA EN NEUTROFILOS



PATRON DE HERENCIA

El gen de la G-6-PD en humanos y otros mamíferos está localizado en el cromosoma X, por lo cual la herencia es ligada al sexo, con expresión del defecto en el varón hemicingoto, en forma

similar a como sucede en la hemofilia. Estudios recientes indican que el cromosoma 6 también está involucrado en la síntesis de la G-6-PD [7]. Los varones pueden tener niveles de G-6-PD normales o muy bajos (deficientes de G-6-PD hemicigotas). Las mujeres, en cambio, pueden tener niveles de G-6-PD normales, muy bajos (deficientes de G-6-PD homocigotas) o intermedios (heterocigotas) [8].

INCIDENCIA

La deficiencia de G-6-PD se encuentra distribuida a nivel mundial 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 [9].

En Venezuela muy pocos autores se han dedicado al estudio de este tipo de anemia hemolítica congénita, siendo Boada [10] el primero en reportar la presencia de deficiencia de G-6-PD en nuestro país, encontrando en Barquisimeto un 6% de deficientes. Posteriormente, Acquatella [11] encontró un 2% de deficientes en donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Caracas y su ausencia en indios paraujanos y maquiritares. Por su parte, Müller encontró una incidencia de deficientes en G-6-PD de 10% en la población de Tapipa y su ausencia en indios Yanomamis y Waraos [12].

HETEROGENEIDAD GENETICA

Más de 370 mutantes de G-6-PD han sido descritas de acuerdo a las siguientes características bioquímicas: movilidad electroforética, actividad enzimática (expresada como porcentaje de la actividad de G-6-PD normal), afinidad para los sustratos G-6-P (K_m G-6-P) y NADP (K_m NADP), utilización de los sustratos análogos 2-deoxi-G-6-P y deamino-NADP, termoestabilidad y pH óptimo. Las diferentes mutantes descritas se han denominado de acuerdo a sus propiedades electroforéticas o se le han asignado nombres propios de acuerdo a la región en que han sido detectadas [13].

GENETICA MOLECULAR

La G-6-PD es una proteína constituida por 531 aminoácidos. El gen para la G-6-PD ha sido caracterizado por clonación y secuenciación, y consiste de 13 exones (segmento de ADN que contiene la información genética estructural) y 12 intrones (segmento de ADN que separa los exones), que en conjunto representan 18 kilobases [14].

Se ha demostrado que la enzima G-6-PD es sintetizada mediante dos ARN mensajeros, cuyos genes estructurales están en los cromosomas X y 6, los cuales son corresponsables para la codificación de la enzima [7]. Los más recientes análisis de genética molecular demuestran que ciertas variantes o mutantes de G-6-PD que fueron consideradas bioquímicamente iguales, en realidad son diferentes cuando se realiza la clonación y secuenciación de los genes respectivos [15].

VARIANTES DE G-6-PD

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.

Aquellas variantes de G-6-PD que electroforéticamente migran por delante de la G-6-PD “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 [16].

La G-6-PD “A” es la variante más común alrededor del 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 la sustitución A-Gen el nucleótido 376[17].

La G-6-PD “A -” es una enzima electroforéticamente rápida, con una marcada inestabilidad intracelular y por lo tanto actividad disminuída. 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 producidas por cambios en los nucleótidos 371, 202 (transición G -> A), 680 (transición G -> T), 968 (transición T -> C). Estos tres genotipos han sido detectados en africanos y uno de ellos en una familia española previamente diagnosticada por métodos bioquímicos como G-6-PD Bética.

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 [18].

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 del 1%; es debida a una transición C ->T en el nucleótido 563 [19, 20].

La heterogeneidad genética de la G-6-PD resulta de diferencias cualitativas y cuantitativas de la enzima G-6-PD. Las diferentes mutantes han sido clasificadas de acuerdo al grado de deficiencia y al resultado de la evaluación clínica, dentro de 5 grupos o clases [20].

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 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.

4. DEFICIENCIA DE G-6-PD CLASE 4.

Deficiencia enzimática ligera o casi normal, sin consecuencias clínicas.

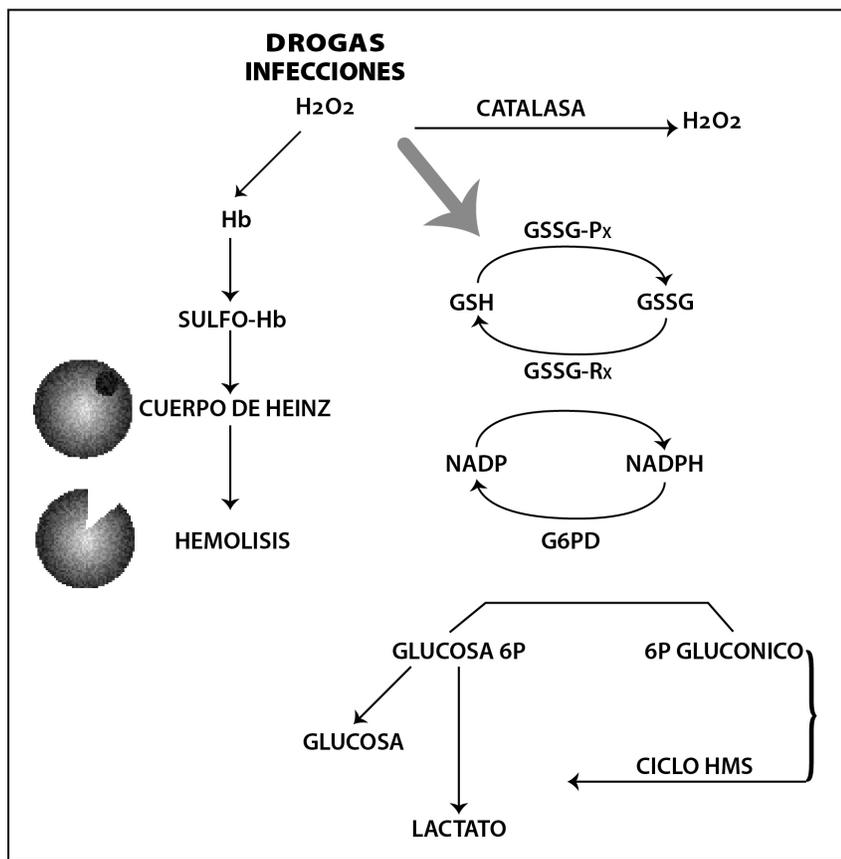
5. DEFICIENCIA DE G-6-PD CLASE 5.

Actividad enzimática aumentada.

MECANISMO FISIOPATOLOGICO DE LA CRISIS HEMOLITICA

En líneas generales los niveles de hemoglobina se mantienen normales en individuos deficientes en G-6-PD, excepto los de la clase 1, pero la administración de drogas oxidantes [Tabla N° I], las infecciones o la acidosis diabética pueden inducir una crisis hemolítica. En este caso el agente hemolítico libera H₂O₂, se producen radicales libres, y peroxihemoglobina [Fig. N° 5].

FIGURA N° 5
PATOFISIOLOGÍA DE LA MEMOLISIS EN GLOBULOS ROJOS DEFICIENTES
EN GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA



Las drogas oxidantes o sus metabolitos oxidan el glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Caen los niveles intracelulares de GSH. Una vez que el GSH es depletado, los grupos sulfidrilos de la hemoglobina y probablemente de otras proteínas son oxidados a disulfidos o sulfóxidos

En condiciones normales el sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa es utilizado para reducir nuevamente el GSSG a GSH y remover los peróxidos peligrosos [Fig. 2]. En los eritrocitos deficientes en G-6-PD este mecanismo no opera rápidamente debido a la producción inadecuada de NADPH. La hemoglobina precipita y forma los llamados cuerpos de Heinz, que no son más que cadenas de globina de la hemoglobina precipitados dentro de la cara interna de la membrana celular eritrocitaria.

Estudios recientes sugieren que la unión de hemicromos (originados de la hemoglobina desnaturalizada) a las moléculas de la banda 3 de la membrana del eritrocito daña dicha membrana, lo cual va a traer como consecuencia cambios en la permeabilidad pasiva del eritrocito con abertura de los canales de K. Estos eritrocitos van a ser reconocidos como anormales por el sistema fagocitario del bazo y del hígado y van a ser fagocitados.

Las células fagocíticas ingieren los cuerpos de Heinz de los eritrocitos con la consecuente fragmentación y hemólisis de los mismos. También puede ocurrir peroxidación de lípidos, con destrucción de la membrana eritrocítica a través de mecanismos de oxidación de los grupos tioles de dicha membrana, con la consecuente hemólisis. Esto puede ser directo o puede ser con la cooperación del radical oxidrilo OH⁻. La enzima superóxido dismutasa fabrica más H₂O₂ con los radicales O₂⁻, agravando el proceso.

Es de hacer notar que la mayoría de los eritrocitos severamente dañados van a ser destruidos en el torrente sanguíneo (hemólisis intravascular) mientras que los eritrocitos menos severamente dañados serán reconocidos como anormales por los macrófagos y serán sometidos a una hemólisis extravascular en el sistema reticuloendotelial o fagocítico mononuclear [21].

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 2.038 pacientes referidos al Instituto de Oncología y Hematología del M.S.A.S. desde diferentes estados de Venezuela en el transcurso de 15 años con el diagnóstico de anemia hemolítica.

MATERIALES

1. Historia clínica (seguida durante 15 años).
2. Hematología, conteo de reticulocitos, niveles séricos de bilirrubina total y fraccionada
3. Curva de fragilidad globular en fresco e incubada.
4. Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa Gelman y corridas en cámara microzonal Beckman, usando buffer Tris-borato-EDTA, pH 8 [22].
5. Cuantificación de la hemoglobina A2, aislada por cromatografía usando columnas de Sephadex de intercambio de aniones de los Laboratorios Helena, según la técnica de Bernini [23].
6. Cuantificación de la hemoglobina fetal por inmunodifusión usando placas con gel que contiene anticuerpos anti-hemoglobina fetal de los Laboratorios Helena.
7. Cuantificación de los niveles intraeritrocíticos de las enzimas de los ciclos glicolíticos y de la hexosa monofosfato por espectrofotometría usando un espectrofotómetro Gilford con registrador [24]

MÉTODOS

SEPARACION DE LOS ERITROCITOS DE LA SANGRE PARA ESTUDIO DE ENZIMAS

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 [24].

- * Se cuantificaron las siguientes enzimas del ciclo de la hexosa monofosfato:
 1. glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
 2. 6-fosfogluconato deshidrogenasa
 3. Glutación reductasa.

- * Se cuantificaron las siguientes enzimas del ciclo glicolítico:
 1. hexoquinasa
 2. glucosa-fosfato-isomerasa
 3. gliceraldehido-fosfato-deshidrogenasa
 4. fosfogliceroquinasa
 5. difosfogliceromutasa
 6. monofosfogliceromutasa
 7. enolasa
 8. piruvatoquinasa
 9. deshidrogenasa láctica

- * 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 Kirkman y modificado por Beutler [25].

- * 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 [26].

- * Niveles de Na y K intraeritrocíticos [27].

- * Cuantificación de los niveles de inmunoglobulinas por inmunodifusión radial [28].
 - IgG
 - IgA
 - IgM

- * Cuantificación de los niveles de complemento [29]:
 1. CH50
 2. C3
 3. C4

- * Determinación de la función fagocítica [30, 31]:
 1. Endocitosis con *Candida albicans*
 2. Reducción del nitrobluetetrazolium (N.B.T.)
 3. Capacidad bactericida contra *Stafilococcus aureus*
 4. Capacidad candidicida
- * Determinación de los niveles de calcio de los eritrocitos [32].

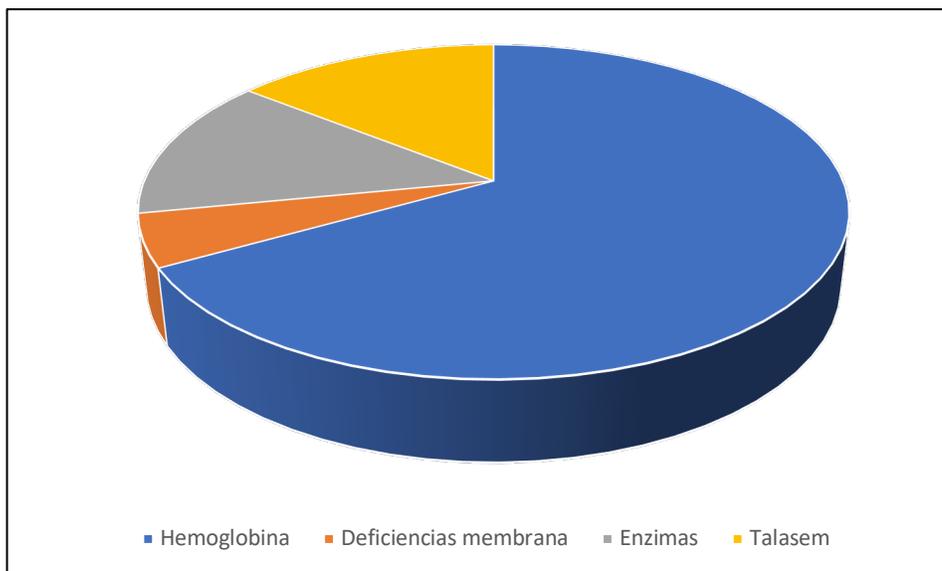
RESULTADOS

ETIOLOGIA DE LA HEMOLISIS EN 2.069 PACIENTES ESTUDIADOS

El estudio clínico, hematológico y bioquímico de 2.069 pacientes referidos al Instituto de Oncología y Hematología durante los últimos 15 años permitió diagnosticar las siguientes etiologías como causa de las anemias hemolíticas congénitas de los pacientes referidos:

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. N° 6].

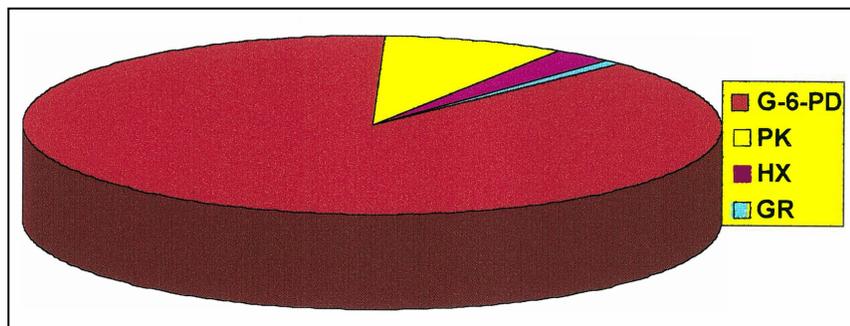
FIGURA N° 6
ETIOLOGÍA DE LA HEMÓLISIS EN 2069 PACIENTES CON AMENIA



INCIDENCIA DE LA DEFICIENCIA DE G-6-PD EN 2.069 PACIENTES Y FAMILIARES

De 2.069 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 los ciclos glicolíticos y de la hexosa monofosfato. De estos 287 individuos, 251 pacientes propósitos y familiares presentaron la deficiencia para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa [Fig. N° 7].

FIGURA N° 7
CLASIFICACIÓN DE 287 PACIENTES DEFICIENTES EN ERITROENZIMAS



CLASIFICACION DE 251 PACIENTES CON DEFICIENCIA DE G-6-PD SEGUN LOS NIVELES INTRAERITROCITICOS DE G-6-PD

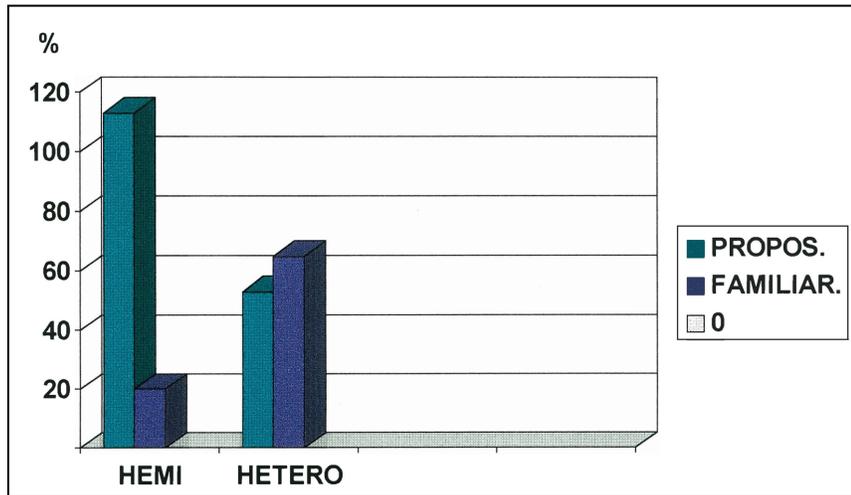
La cuantificación de los niveles intraeritrocíticos de la enzima G-6-PD residual permitió clasificar los pacientes y familiares, provenientes de 155 familias estudiadas en:

133 individuos deficientes hemicigotos (varones)

118 individuos deficientes heterocigotos (mujeres)

De 133 individuos hemicigotos encontramos que 113 eran propósitos y 20 eran familiares. De 118 individuos heterocigotos solo 53 eran propósitos y el resto, 65, eran familiares de los propósitos hemicigotos o heterocigotos [Fig N° 8].

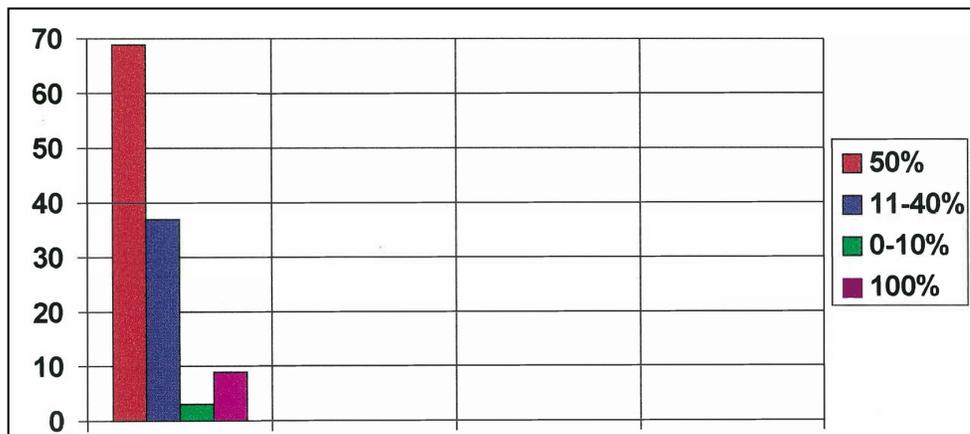
FIGURA N° 8
CLASIFICACIÓN DE 251 DEFICIENTES EN G-6-PD



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

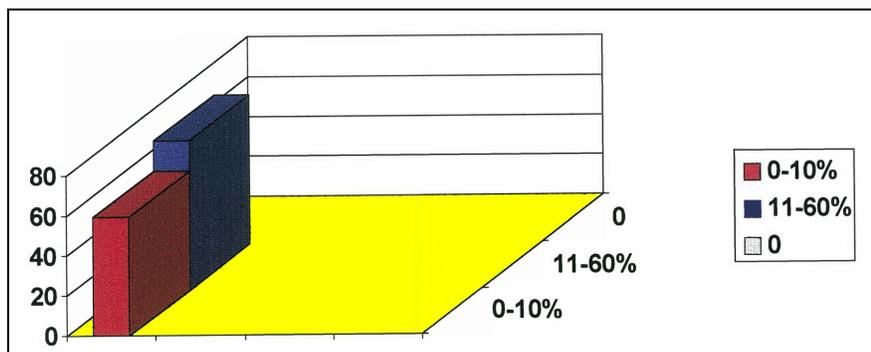
El nivel intraeritrocítico de la G-6-PD varió ampliamente en las 118 mujeres heterocigotas estudiadas, desde valores completamente normales hasta valores muy disminuidos, por debajo del 40%, como si fuesen varones hemicigotos. Así tenemos que, aunque la mayoría presentó valores de G-6-PD intraeritrocíticos intermedios alrededor del 50%, hubo 37 mujeres heterocigotas que presentaron valores entre 11-40% de la actividad de G-6-PD normal, 3 presentaron valores de G-6-PD menores del 10% y por último 9 de estas mujeres (7 madres de propósitos) presentaron niveles de G-6-PD intraeritrocíticos completamente normales [Fig. N° 9].

FIGURA N° 9
VALORES DE G-6-PD EN HETEROCIGOTOS



Los individuos hemicigotos se caracterizaron por presentar valores de G-6-PD intraeritrocíticos variables de cero hasta el 60%. Se detectaron 59 hemicigotos con valores intraeritrocíticos de G-6-PD menores del 10% y 74 individuos hemicigotos con dichos valores entre 10-60% [Fig. N° 10].

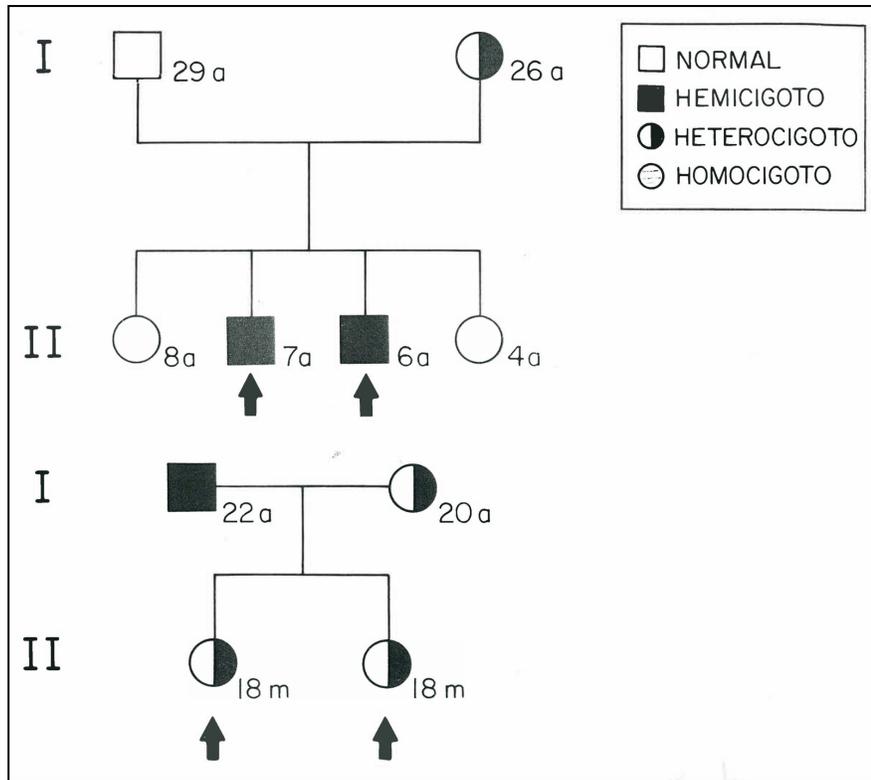
FIGURA N° 10
VALORES DE G-6-PD EN HEMICIGOTOS



**PATRONES DE HERENCIA DE LA DEFICIENCIA DE G-6-PD
EN VENEZUELA**

Encontramos que el gen para la deficiencia de G-6-PD se heredó a través del cromosoma materno X en las 155 familias. El padre en esos casos siempre presentó valores de G-6-PD intraeritrocíticos completamente normales. En sólo cuatro familias encontramos que tanto el padre como la madre tenían valores de G-6-PD compatibles con la deficiencia [Fig. N° 11].

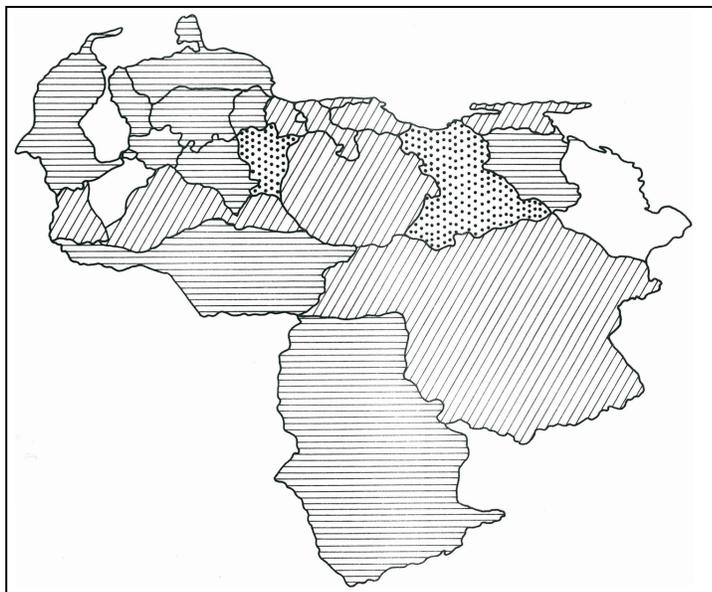
FIGURA N° 11
PATRONES DE HERENCIA DE 251 PACIENTES VENEZOLANOS
DEFICIENTES EN G-6-PD



PROCEDENCIA DE LOS PACIENTES DEFICIENTES EN G-6-PD

Aparece en el mapa de Venezuela de la Fig. N° 12.

FIGURA N° 12
ORIGEN DE LAS FAMILIAS DEFICIENTES
EN GLOCOSA-6-FOSFATO DEHIDROGENASA



MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA DEFICIENCIA DE G-6-PD EN LOS PROPOSITOS ESTUDIADOS

La causa principal de consulta fue crisis de anemia hemolítica inducida por ingestión de drogas oxidantes en el 36,74% [Tabla N° II]. 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 varió de acuerdo al paciente estudiado y no al tipo de droga oxidante.

TABLA N° II
MOTIVO DE CONSULTA DE 166 PACIENTES
PROPOSITOS DEFICIENTES EN G-6-PD

N° Pacientes	CLINICA	PORCENTAJE
61	ANEMIA HEMOLITICA POR DROGAS OXIDANTES	36,74
51	ICTERICIA NEONATAL	30,72
10	ANEMIA HEMOLITICA INDUCIDA POR INFECCIÓN	6,02
10	HIPERBILIRRUBINEMIA	6,02
7	DONANTES DE SANGRE	4,21
4	ANEMIA HEMOLITICA INDUCIDA POR DROGAS OXIDANTES MAS INFECCION	2,40
4	ANEMIA HEMOLITICA CRONICA	2,40
4	FAVISMO	2,40
2	DESPISTAJE DE DEFICIENCIA DE G-6-PD	1,20
1	ASOCIADA A DREPANOCITOSIS	0,60
1	ASOCIADA A DREPANOCITOSIS-TALASEMIA	0,60
1	ASOCIADA A ESFEROCITOSIS CONGENITA	0,60

Las drogas ingeridas fueron sulfas administradas para el tratamiento de infecciones urinarias, cloroquina administrada como profilaxis para la malaria, acetofenetidina, aspirina, dipirona como analgésico o antipirético, azul de metileno, vitamina C, fenildimetilpirazolona y difenilpiperidino-etil-acetamida (Baralcina), clorofeniramina y salicilato de sodio (Coricidin), naftalina, pamoato de pyrantel (Combantrin), furoxona, metoclopramida o diclorhidrato de N

(dimetilamino etil) 2 metoxi-4-amino-5-clorobenzamida (Primperan), clorhidrato de meclizina y piridoxina (Bonadoxina) y nistatina.

La dosis de droga oxidante que causó la hemólisis varió con cada paciente, en algunos fue la dosis estándar y otros la dosis estuvo por arriba de la dosis estándar. Dependiendo de la severidad de la caída de la Hb y Hto se administró transfusión de concentrado globular.

Las crisis hemolíticas secundarias a ingestión de drogas oxidantes se presentaron a cualquier edad desde el período de lactante hasta adulto. Las drogas oxidantes precipitaron la crisis hemolítica en 7 pacientes femeninas heterocigotas para la deficiencia de G-6-PD y la ingestión de habas en una de ellas.

Las drogas oxidantes que precipitaron las crisis hemolíticas fueron:

1. Difenilpiperidino etil-acetamida (Baralcina) (1 paciente)
2. Neftalina (1 paciente)
3. Keforal (1 paciente)
4. Aspirina (1 paciente)
5. Furoxona (1 paciente)
6. Nistatina + Meclizina + Piridoxina + Metocloropramida (1 paciente).
7. Sulfa (1 paciente)

Tres pacientes heterocigotas ameritaron ser tratadas con transfusión de concentrado globular después de haberse expuesto a drogas oxidantes. Una de estas pacientes inhaló naftalina, otra de dichas pacientes recibió dosis elevadas de Baralcina para dolores cólicos por litiasis vesicular, y la tercera paciente recibió dosis elevadas de furoxona por infección urinaria.

Una niña de 4 años recibió sulfa en dos diferentes oportunidades y presentó crisis hemolítica acompañada de hematuria en las dos oportunidades cayendo su Hb a 8 g/dl.

La segunda causa de consulta fue ictericia neonatal a expensas del aumento de los niveles séricos de bilirrubina indirecta en el 30,72% de los pacientes [Tabla N° II]. Se estudiaron 51 neonatos deficientes en G-6-PD. 41 neonatos fueron clasificados como hemicigotos y 10 como heterocigotos. De los 41 hemicigotos 19 ameritaron fototerapia, 9 exanguinotransfusión y 13 requirieron sólo observación. De los 10 neonatos heterocigotos 9 ameritaron fototerapia y uno exanguinotransfusión.

El tiempo de aparición de la ictericia varió, siendo en el 80 % de los casos durante el segundo o tercer día de vida 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 y otras deficiencias de enzimas intraeritrocíticas de los ciclos glicolíticos y del “shunt” de la hexosa monofosfato. La mayoría de los neonatos presentaron más ictericia que anemia.

La tercera causa de consulta fue ictericia asintomática por aumento de los niveles séricos de bilirrubina indirecta [Tabla N° II]. 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 N° II].

Se estudiaron 3 pacientes con favismo [Tabla N° II]

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.

Sé 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.

Se diagnosticaron 2 pacientes deficientes en G-6-PD que habían sido referidos para descartar dicha deficiencia, ya que padecían de lepra e iban a recibir tratamiento con drogas oxidantes.

Es de hacer notar que estos pacientes propósitos deficientes en G-6-PD fuera de las crisis hemolíticas son completamente asintomáticos. Ellos comenzaron a presentar malestar general, cefalea, dolor lumbar y coluria a las 24 horas de haber ingerido la droga oxidante, o presentar una infección viral o bacteriana, acudiendo a la consulta en promedio de 3-5 días después de haber comenzado la sintomatología. A veces se hizo difícil precisar si el desencadenante de la hemólisis fue la infección o la droga utilizada para combatir dicha infección o ambos.

Entre los donantes de sangre utilizados como controles aparentemente sanos encontramos 9 individuos deficientes en G-6-PD tanto hemocigotos como heterocigotos [Tabla N° II].

HALLAZGOS DE LABORATORIO

A. 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. Si, observamos, la Tabla N° III, donde aparecen estos valores; podemos notar sólo un discreto aumento de los reticulocitos. El frotis de sangre periférica mostró en todos los pacientes eritrocitos morfológicamente normales.

TABLA N° III
VALORES HEMATOLÓGICOS EN PACIENTES
HEMOCIGOTOS DEFICIENTES EN G-6PD

No.	EDAD	Hb (g%)	Hto (%)	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	7 m - 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	12,4 ± 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	42,1 ± 3,3	2,6 ± 1,6
	v.n. varones	14,0 ± 2,0	41,0 ± 5,0	0,5 - 1,5

La curva de fragilidad osmótica de los eritrocitos en fresco e incubada fue normal.

Las pacientes femeninas heterocigotas fuera de crisis también presentaron niveles de Hb y Hto normales para su edad [Tabla N° IV].

TABLA N° IV
VALORES HEMATOLÓGICOS EN PACIENTES HETEROCIGOTOS
DEFICIENTES EN G-6-PD

No.	EDAD	Hb (g%)	Hto (%)	RETICULOCITOS (%)
1	0-3 MESES Valores normales	9,0 11,5 ± 2,5	32,5 35 ± 7	8 0 - 1
2	4-6 MESES Valores normales	10,5 11,5 ± 2,0	34 35,0 ± 6,0	0 - 1
2	7 - 23 MESES Valores normales	9,7 ± 0,6 12,0 ± 1,5	33,7± 2,3 36,0 ± 3,0	4,9 ± 0,91 0,5 - 1,5
4	2-6 años Valores normales	12,5 ± 0,7 12,5 ± 1,0	40,4 ± 1,7 34,0 ± 3,0	1,2 ± 1,0 0,5 - 1,5
2	7-12 años Valores normales	12,0 ± 2,0 13,5 ± 2,0	37,5 ± 1,8 40,0 ± 5,0	1,0 ± 0,5 0,5 - 1,5
18	>13 años v.n. varones	12,0 ± 2,0 14,0 ± 2,0	39,0 ± 3,1 41,0 ± 5,0	1,9 ± 1,2 0,5 - 1,5

B. Durante periodos de crisis hemolítica.

En los pacientes varones hemicigotos los valores basales de Hb y Hto cayeron durante las crisis hemolíticas desde valores normales hasta 1,95 g/dl y 9%, respectivamente, y los reticulocitos aumentaron a cifras hasta de 22%. La severidad del cambio dependió del paciente como puede apreciarse en la Fig. N° 13 y las Tablas N° V y VI.

FIGURA N° 13
HEMOGLOBINA, HEMATOCRITO, RETICULOCITOS PRE-HEMOLISIS
Y DURANTE CRISIS HEMOLÍTICA EN PACIENTES DEFICIENTES EN G-6-PD

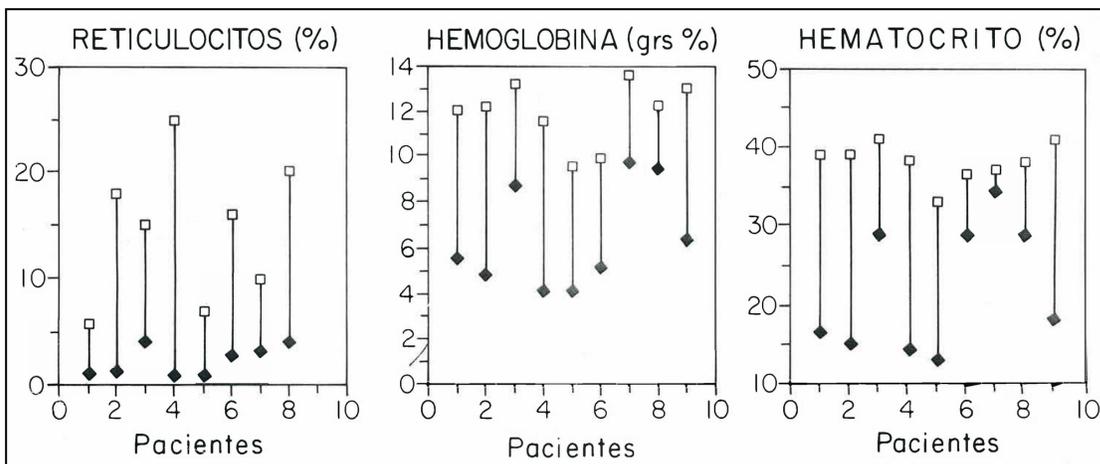


TABLA N° V
VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE Y FUERA DE
CRISIS HEMOLITICA EN ADULTOS HEMICIGOTOS DEFICIENTES EN G-6-PD

PACIENTE	EDAD (años)	Hb (g%)	Hto (%)	RETIC. (%)	BT (mg%)	BI
CAR (1)	31	12,6	41,9	4,1	1,0	0,9
CAR (2)*		6,2	18,0	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 N° VI
VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE Y FUERA
DE CRISIS HEMOLITICA EN NIÑOS HEMICIGOTOS
PARA LA DEFICIENCIA DE G-6-PD

PACIENTE	EDAD (años)	Hb (g%)	Hto (%)	RETICUL. (%)	BT (mg%)	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		
A.B (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 una ligera disminución de la fragilidad osmótica, lo cual pudo correlacionarse con el aumento de la cantidad de esferocitos, pero nunca como en la anemia hemolítica por esferocitosis hereditaria.

Estudiamos tres pacientes heterocigotas, en las cuales los valores de Hb y Hto cayeron desde niveles normales hasta valores de 4,6 g/dl y 15%, respectivamente, con reticulocitosis de 18%, después de la ingestión o administración de drogas oxidantes [Tabla N° VII].

TABLA N° VII
VALORES HEMATOLOGICOS DE PACIENTES HETEROCIGOTAS PARA LA DEFICIENCIA DE G-6-PD DURANTE Y FUERA DE CRISIS HEMOLITICA

PACIENTE	EDAD (años)	Hb (g%)	Hto (%)	RETICULOCITOS (%)
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 HEMOLITICA CONGENITA NO ESFEROCITICA PRODUCIDA POR DEFICIENCIA DE G-6-PD CLASE I

Detectamos anemia hemolítica congénita no esferocítica en 4 pacientes masculinos deficientes en G-6-PD no asociada a otras patologías hemolíticas o no hemolíticas, es decir, atribuible solamente a la deficiencia de G-6-PD. Estos pacientes se caracterizan por presentar antecedentes de ictericia neonatal que requirió exanguinotransfusión, ictericia crónica permanente con esplenomegalia, lo cual nos indica que estos pacientes padecen 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, siendo dos de

ellos hermanos; sin embargo, nos llamó la atención que los 4 pacientes presentaban clínicas muy similares.

EVOLUCION CLINICA DE LA ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA NO ESFEROCITICA PRODUCIDA POR DEFICIENCIA DE G-6- PD CLASE I

Con el transcurso de los años a estos pacientes les aumentó la ictericia y su esplenomegalia se acentuó con aparición de hepatomegalia. Se presenta como prototipo el siguiente paciente con anemia hemolítica crónica por deficiencia de G-6-PD clase I, por haber sido estudiado por mayor número de años, dicho paciente fue seguido en consultas clínicas desde los 6 hasta los 25 años.

PACIENTE J.G.P

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, de piel blanca, pero de raza mestiza; en buenas condiciones generales, pero con ictericia conjuntival. Abdomen blando, depresible, con polo esplénico palpable e hígado no palpable.

Exámenes de laboratorio

HEMATOLOGIA. Hb: 10,6 g/dl, Hto: 30%, conteo de reticulocitos: 4,6%, VCM: 90 fl, HCM: 29,1 pg, CHCM: 32,3 g/dl.

Frotis de sangre periférica

Normal excepto por esferocitosis leve.

Perfil químico completo incluyendo pruebas hepáticas

Normal, excepto hiperbilirrubinemia de 2,1 mg/dl a expensas de la indirecta 1,8 mg/dl.

Evolución clínica

Este paciente se ha caracterizado por presentar de base una anemia hemolítica crónica, con ictericia permanente a expensas del aumento de bilirrubina indirecta, hepatoesplenomegalia y crisis hemolíticas frecuentes de leves a moderadas, con episodios de coluria de varios días de duración, que no ameritan transfusiones ni hospitalizaciones. El paciente ha presentado aproximadamente 4 crisis hemolíticas anuales con caída evidente de la Hb y Hto generalmente asociadas a infecciones virales, o administración de antipiréticos tipo dipirona. En cada crisis su Hb desciende 2 a 3,5 g/dl, su Hto desciende de 2 a 4 ptos, sus reticulocitos suben hasta 4% y su hiperbilirrubinemia total a expensas de la indirecta alcanza valores de 5 mg/dl. El paciente a los trece años de edad presentó crisis dolorosas frecuentes en hipocondrio derecho secundarias a 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 se han presentado casi permanentemente. Su bazo ha aumentado de tamaño desde un polo esplénico a los 6 años de edad hasta un bazo palpable a 8 cm del reborde costal izquierdo a los 25 años de edad. Así mismo a pesar que su Hto se ha mantenido alrededor de 36%, sus reticulocitos han aumentado a 9% y la bilirrubina total a 6 mg/dl. El paciente no ha querido someterse a esplenectomía hasta el momento.

FAVISMO

Sólo 4 de los pacientes presentaron crisis hemolítica después de haber ingerido habas frescas cocidas [Tabla II]. Dos de los pacientes fueron escolares del sexo masculino, hermanos, de 4 y 6 años de edad, quienes aproximadamente 24 horas postingestión de las habas, comenzaron a presentar debilidad general, malestar, cefalea, náuseas, dolor lumbar y abdominal, ictericia y coluria. Ambos pacientes presentaron caída de su Hb a 4 g/dl y del Hto a 15%, con reticulocitosis de 15% y 18%, respectivamente, ameritando ambos, tratamiento con concentrados globulares. Los otros pacientes fueron dos adultos, uno masculino y otro femenino, que presentaron la misma sintomatología postingestión de habas y ameritaron administración de concentrado globular.

ASOCIACION DE LA DEFICIENCIA DE G-6-PD CON OTROS TIPOS DE ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA

Llama la atención en este estudio la detección de la asociación de otros tipos de anemia hemolítica congénita como DREPANOCITOSIS, DREPANOCITOSIS-TALASEMIA y ESFEROCITOSIS HEREDITARIA con la deficiencia de G-6-PD. Dichos pacientes presentaron clínicamente el cuadro hemolítico crónico que caracteriza su enfermedad, que se exacerbaba con la ingestión de drogas oxidantes, infecciones virales o bacterianas, etc.

El paciente con drepanocitosis (P.M.E) era una niña de 3 años de edad, quien consultó por anemia hemolítica acompañada de crisis de dolor articular. Sus valores hematológicos fueron Hb: 4,6 g/dl, Hto: 15%, conteo de 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% y con niveles normales de Hb A2: 2,55%. Esta paciente presentó niveles de G-6-PD intraeritrocíticos compatibles con el estado de heterocigidad para la deficiencia.

La paciente de la drepanocitosis-talasemia (M.V.) era una niña de 5 años de edad, quien fue referida por el médico hematólogo tratante desde Acarigua, Edo. Portuguesa, debido a la frecuencia con que presentaba crisis de anemia hemolítica y cuadros clínicos infecciosos. Con los estudios de laboratorio se demostró que esta paciente presentaba una drepanocitosis-talasemia, siendo la drepanocitosis heredada del padre, quien presentaba una hemoglobina SA y la talasemia heredada de la madre, quien era heterocigota para la talasemia beta. Esta paciente tenía asociada una enfermedad granulomatosa crónica secundaria a deficiencia de G-6-PD. El cuadro clínico y los valores de laboratorio de la paciente serán presentados más adelante cuando hablemos de enfermedad granulomatosa crónica secundaria a deficiencia de G-6-PD.

ASOCIACION DE DEFICIENCIA DE G-6-PD CON ANEMIA SECUNDARIA A DEFICIENCIA DE HIERRO

En 10,5% de los pacientes encontramos anemia microcítica hipocrómica, no explicable por la deficiencia de G-6-PD sino secundaria a disminución de los valores séricos de hierro por ingestión de dieta mal balanceada. Presentaremos como ejemplo el paciente con la deficiencia de hierro más severa asociada a la deficiencia de G-6-PD que estudiamos. Se trató de un

lactante de 19 meses con cifras de Hb de 7,2 g/dl, Hto de 29,2%, reticulocitos 0.9%, con índices globulares notablemente disminuidos, el volumen corpuscular medio (V.C.M.) fué de 64 mm³ [V.N.: 80-90], la hemoglobina corpuscular media (H.C.M.) fue de 15,8 pg [V.N.: 30,5±3] y la concentración de hemoglobina corpuscular media (C.H.C.M.) fue de 24,8 g/dl [V.N.: 34,8±2,2]. El frotis de este paciente presentó una hipocromía y microcitosis marcada con poiquilocitosis y anisocitosis moderada con presencia de escasos dianocitos y células en lágrima. El hierro sérico de este paciente estuvo muy disminuido: 12 mcg/dl [V.N.: 35-130 mcg/dl] con un nivel de ferritina sérica de 3 ng/dl [V.N.: 10-140 mcg/dl].

EMBARAZO Y DEFICIENCIA DE G-6-PD

Cuatro pacientes embarazadas deficientes en G-6-PD, con valores de Hb y Hto adecuados para su edad gestacional, con niveles de bilirrubina normales y examen físico normal para su edad gestacional, es decir sin anemia hemolítica congénita no esferocítica cursaron con embarazos normales. A todas ellas se les prohibió la ingestión de drogas oxidantes y no tuvieron problemas de hemólisis durante su embarazo.

NIVELES INTRAERITROCITICOS DE Na Y K EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE G-6-PD.

Se estudiaron valores intraeritrocíticos de Na y K en 10 pacientes hemicigotos y en 2 heterocigotos para la deficiencia de G-6-PD, obteniéndose los siguientes resultados en mEq/ml/célula:

Pacientes hemicigotos:

Na: 12,3±2,8 [V.N.: 14,8±2,7]

K: 94,6±8,0 [V.N.: 93,2±6,1]

Pacientes heterocigotos

Na: 12,45±1,6 [V.N.: 14,8±2,7].

K: 88,7±12,2 [V.N.: 93,2±6,1].

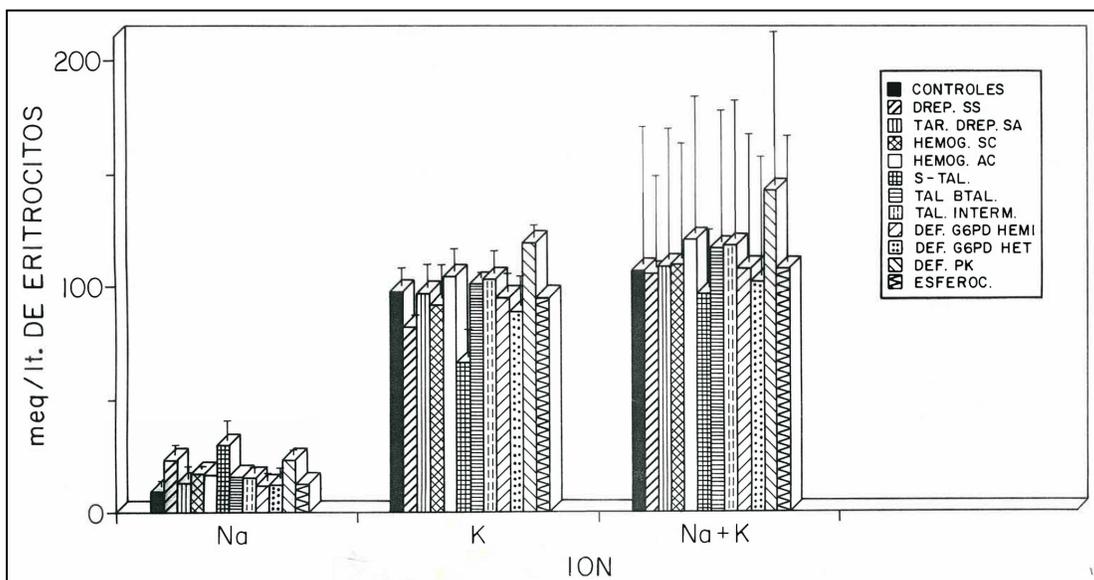
No hubo diferencias estadísticamente significantes entre los niveles de Na y K de los eritrocitos de los pacientes deficientes en G-6-PD y los eritrocitos controles provenientes de 15 donantes de sangre [Tabla N° VIII, Fig. N° 14].

TABLA N° VIII
VALORES INTRAERITROCITICOS DE Na Y K EN PACIENTES
DEFICIENTES EN G-6-PD

No	H ₂ O	Na	K		Na+K	
Meq/ml						
		Cel	H ₂ O	cel.	H ₂ O	cel
HEMICIGOTOS						
10	64,1± 2,8	12,2± 4,9	20,7±4,9	97,5±4,6	160,9±12	109,7
HETEROCIGOTOS						
2	62,1±2,7	12,5±1,6	20±1,	88,7±12,2	149±16,7	101,2
CONTROLES						
10	62,7±4,4	14,8±2,7	259±4,9	93,3±6,1	159,4±10,2	108,1

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

FIGURA N° 14
CONTENIDO INTRAERITROCITICO DE Na Y K EN PACIENTES CON
DEFICIENCIA TIPO DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGÉNITAS



CONCENTRACION 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, que se les midieron los niveles intraeritrocíticos de Na y K, 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 niveles más elevados que los deficientes en G-6-PD y que los donantes de sangre usados como controles [Tabla N° IX].

TABLA N° IX
CONCENTRACIONES DE CALCIO EN LOS ERITROCITOS DE PACIENTES
DEFICIENTES EN G-6-PD.

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

INMUNIDAD HUMORAL Y FUNCION FAGOCITICA EN DOS FAMILIAS DEFICIENTES EN G-6-PD Y ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRONICA

I. Estudio de la familia Gonz.

Procedencia:

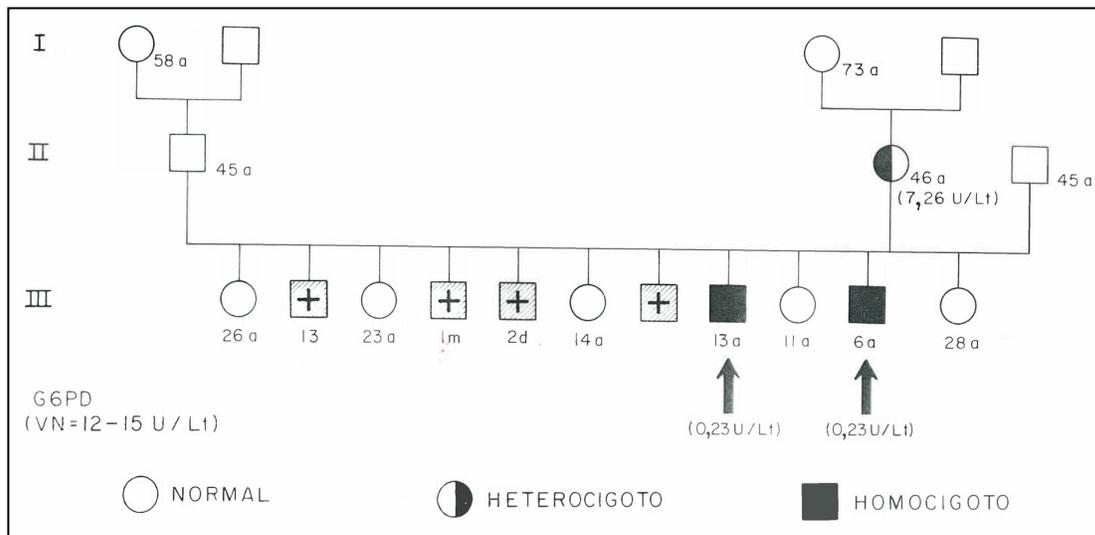
Ciudad Bolívar, Edo. Bolívar.

Motivo de consulta:

Los propósitos de la familia eran dos varones de 5 y 11 años que consultaron por infecciones a repetición desde los tres años de edad que se acompañaban de anemia severa de 3 g/dl, fiebre, vómitos, dolor abdominal e ictericia que ameritaban hospitalización para tratamiento con antibióticos intravenosos y transfusiones de concentrados globulares con una frecuencia de tres veces por año [Fig. N° 15]. Ambos pacientes tenían antecedentes de crisis de forunculosis en

piel a repetición, 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.

FIGURA N° 15
DEFICIENCIA DE G-6-PD Y ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA



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 Hb rápidamente a 6,7 g % y requiriendo transfusión de concentrado globular.

Antecedentes familiares:

Cuatro hermanos varones habían muerto con 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 o ictericia, con exámenes físicos normales [Fig 15].

Exámen físico:

Paciente [O.G.] de 11 años de edad, quien 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 R.C.D.

Paciente [E.G.] de 5 años de edad, quien el 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 R.C.I.

Hallazgos de laboratorio:

1. Paciente [O.G.] de 11 años de edad:

Hematología:

Hb: 10,5 g%, Hto 39%, reticulocitos: 7,5% (recibió transfusión 2 semanas antes), conteo blanco: 4.811 leucocitos/mm³, diferencial: 45 neutrófilos, 19 eosinófilos, 31 linfocitos, 4 monocitos, 1 basófilo [Tabla N° X].

TABLA N° X
HEMATOLOGÍA DE LA FAMILIA GONZ. CON DEFICIENCIA DE G-6-PD Y
ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRONICA

MIEMBRO	EDAD (años)	Hb g/dl	Hto (%)	Ret (%)	C. Blanco /mm ³	Neutr. (%)	Linf. (%)
MADRE	46	12	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

Química sanguínea:

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. del adulto: 47-140].

Perfil de detección de 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.: hasta 1,2%].

Prueba de inestabilidad de la hemoglobina: negativa.

Cuantificación de las eritroenzimas de los ciclos hexosa monofosfato y glicolíticos [Véase Tabla N° XI].

TABLA N° XI
NIVELES DE LAS ENZIMAS INTRAERITROCITICAS DE LA FAMILIA GONZ.
CON DEFICIENCIA DE G-6-PD Y ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

MIEMBRO	EDAD Años	G-6-PD UI/gHb	6-GPD UI/gHb	GR UI/gHb	G6PD leucocitos
MADRE	46	7,26	5,2	3,5	45
PADRE	45	12,59	4,0	3,8	98
HERMANA	23	12,25	4,9	3,9	100
HERMANA	14	13,71	5,1	4,0	97
HERMANA	12	12,10	4,1	4,4	98
PROPOSITO	11	0,23	7,0	5,9	4
PROPOSITO	5	0,23	7,0	5,9	3
VALORES NORMALES		12-15	4,35-6,07	3,5-4,5	95-100

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

6-PG: 6 FOSFOGLUCONICO DESHIDROGENASA

GR: GLUTATIÓN REDUCTASA

TABLA N° XI-A

	ENZIMA	MADRE 46 AÑOS	PADRE 45 AÑOS	PROPOSITO 11 AÑOS	PROPOSITO 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.:0.633-0.653)	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 dehidrogenasa

PGK: fosfogliceroquinasa

PGM: fosfo glicero mutasa

PK: piruvato quinasa

LDH: deshidrogenasa láctica

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]

Niveles séricos de complemento:

CH50: 122 U. 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.] de 5 años de edad:**Hematología:**

Hb 9,7 g/dl, Hto: 36%, reticulocitos: 14%, conteaje blanco: 6596 leucocitos/mm³, diferencial: 45 segmentados, 6 eosinófilos, 46 linfocitos, 2 monocitos, 1 basófilo [Tabla N° X].

Química sanguínea:

S.G.P.T.: 17 U/L [V.N.: 8-30], S.G.O.T.: 29 U/L [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/Lt [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.: 0,5-1,2]

Prueba de la inestabilidad de la Hb: negativa.

Cuantificación de las enzimas de los ciclos de la hexosa monofosfato y glicolíticas: Tabla N° XII

TABLA N° XII
NIVELES SERICOS, CAPACIDAD TOTAL DE FIJACIÓN E ÍNDICE DE
SATURACIÓN DE LA FERRITINA DE LA FAMILIA GONZ. CON DEFICIENCIA
DE G-6-PD Y ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

MIEMBRO	EDAD Años	HIERRO mcg/dl	CAPACIDAD mcg/dl	ÍNDICE %
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
PROPOSITO	13	99	266	43,23
PROPOSITO	6	138	22	62,16
VALORES NORMALES		60-160	250-400	20-55

Estudio de la inmunidad humoral:

Niveles séricos de inmunoglobulinas:

IgG: 1.150 mg/dl [V.N.: 571-1.597]

IgM: 240 mg/dl [V.N.: 28-115]

IgA: 180 mg/dl [V.N.: 52-329]

Niveles séricos de complemento:

CH50: 128 U. hem/cc [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, química, cuantificación de las enzimas de los ciclos hexosa monofosfato y glicolíticos, inmunidad humoral aparecen en las tablas N° X, XI, XII, XIII.

TABLA N° XIII
ESTUDIO DE LA INMUNIDAD HUMORAL DE LAS FAMILIA GONZ. Y Ve
CON DEFICIENCIA DE G-6-PD Y ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

MIEMBRO	INMUNOGLOBULINAS			COMPLEMENTO		
	IgG	IgA	IgM	CH50	C3	C4
	(mg/dl)			(U/h/CC)	(mg/dl)	
1. FAMILIA GONZ.						
MADRE (46 a)	1360	270	190	135	158	24
PADRE (45 a)	1150	150	130	172	174	49
PROP. (11 a)	1070	260	280	122	158	31
PROP. (5 a)	1150	180	240	128	146	31
2. 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
	575-1607	94-588	26-105			
PROP: propósito						

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE FAGOCITOSIS
DE LOS POLIMORFONUCLEARES:

Los propósitos de la familia Gonz. con deficiencia de G-6-PD, varones hemigotos O.G. de 13 años y E.G. de 6 años presentaron disminución marcada de diversas funciones relacionadas con la fagocitosis de sus polimorfonucleares [Tabla N° XIV]:

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*.

Los polimorfonucleares del padre presentaron la función de fagocitosis [endocitosis, reducción del NBT, capacidad bactericida y candidicida] completamente normales como puede apreciarse en la Tabla XIV.

Los polimorfonucleares de la madre, por el contrario, a los del padre, presentaron una función de fagocitosis disminuida pero solo 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 nos dieron valores intermedios entre los normales y los deficientes en la función de fagocitosis [Tabla N° XIV].

TABLA N° XIV
ESTUDIO DE LA FUNCIÓN FAGOCITICA DE LOS POLIFORNUCLEARES DE LA FAMILIA GONZ. Y Ve. CON DEFICIENCIA DE G-6-PD Y ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

MIEMBRO	ENDO-CITOSIS	N.B.T	CAPAC <i>S. aureus</i>	BACTERICIDA <i>C. albicans</i>
1. FAMILIA GONZ.				
MADRE	54	52	dism.	45
PADRE	5	85	normal	66
HIJO (13 años)	20	11	dism.	45
HIJO (6 años)	63	44	dism.	33
2. FAMILIA VE.				
MADRE	80	74	dism.	
PADRE	63	95	normal	
HIJA (5 años)	60	8	dism.	
V.N	85-90	85-95		60-80

2. Estudio de la familia Ve

Procedencia:

Acarigua, Edo Portuguesa.

Motivo de consulta:

Paciente femenina de 5 años de edad, quien consulta por cuadros de infecciones a repetición y anemia e ictericia que ameritaban hospitalización para tratamiento con antibióticos y transfusión de concentrados globulares.

Antecedentes personales:

A los 8 meses de edad presentó bronconeumonía y anemia con caída de la Hb a 3 g/dl requiriendo hospitalización para antibioticoterapia parenteral y transfusión de concentrado globular. Desde ese momento presentó cuadros de bronconeumonía cada vez que tenía gripe, los cuales evolucionaron a 9 neumonías, siendo 8 del pulmón derecho y 1 del izquierdo. Ameritando transfusión de concentrados globulares 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 raza mestiza con ictericia y palidez mucocutánea. No presentaba visceromegalia.

Hallazgos de laboratorio

Hematología: Hb: 6,98 g/dl, Hto: 21%, conteo de reticulocitos: 18%, conteo de blanco: 270.000 leucocitos/mm³, conteo 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**Niveles séricos de las inmunoglobulinas:**

IgG: 2.072 mg% [V.N.: 571-1.597]

IgM: 107 mg% [V.N.: 28-115]

IgA: 264 mg% [V.N.: 52-329]

Niveles séricos de complemento

CH50 150 U. hem./cc [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 de fagocitosis de los polimorfonucleares

La paciente presentó una marcada disminución de la función fagocítica de sus polimorfonucleares [Tabla XIV].

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: disminuída, 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* estuvo disminuída

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 XIV].

ESTUDIO ELECTROFORÉTICO DE LA G-6-PD INTRAERITROCITICA 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 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 rápida G-6-PD "A". Esta variante "A" migra por delante de la G-6-PD "B" normal, por lo cual se considera una variante de migración electroforética rápida. [Fig. N° 16 y Fig. N° 17]

FIGURA N° 16
PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y ELECTROFORETICAS DE LA G-6-PD "B-"

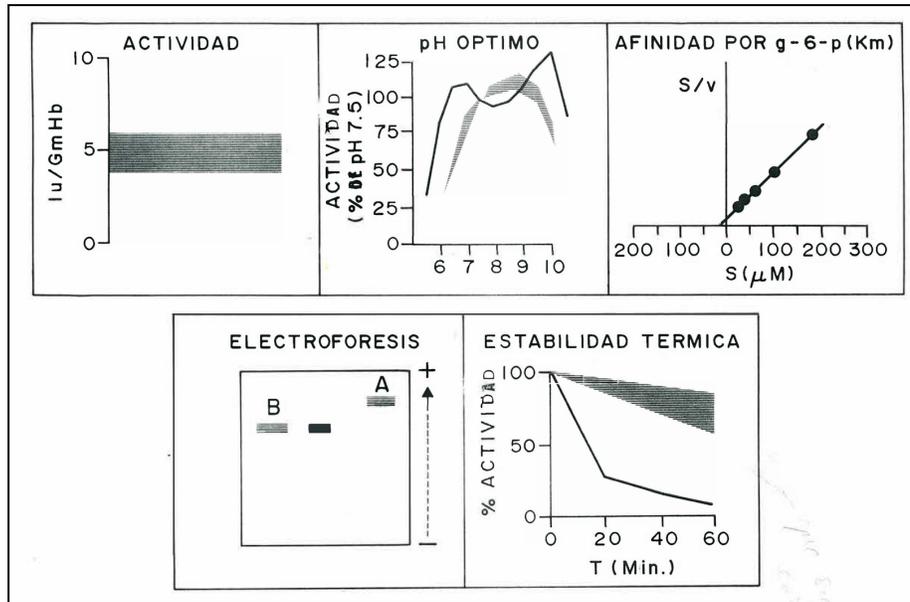
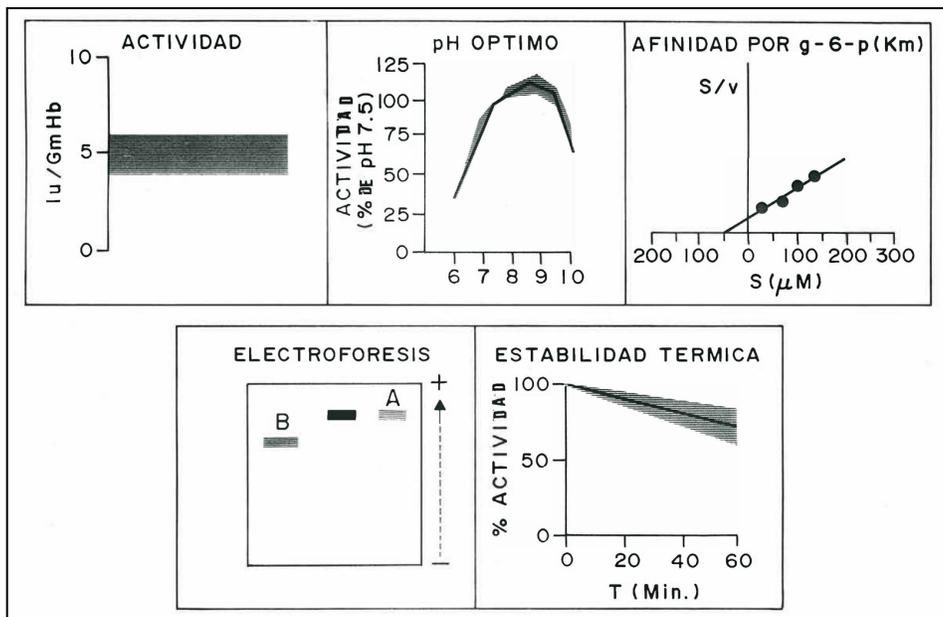


FIGURA N° 17
PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y ELECTROFORETICAS DE LA G-6-PD "A-"



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 una combinación de la G-6-PD “B” y G-6-PD “A”.

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LA G-6-PD RESIDUAL INTRAERITROCÍTICA EN 52 PROPOSITOS DEFICIENTES

El estudio de las propiedades bioquímicas de la enzima residual aparece en la Tabla N° XV.

**TABLA N° XV
CLASE DE G6PD EN 52 PACIENTES VENEZOLANOS DEFICIENTES**

	CLASE I	CLASE II	CLASE III
% de pacientes	4,9	45,7	49,4
% de actividad	7,5-13	0-10	11-58
Km G-6-P (V.N.: 50-70 μ M)	133-220	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	Inestable	Inestable	Inestable-estable
pH óptimo	8 y 9	6,5 y 9,5	8,9 y bifásica
Electroforesis	“A”	“B”	“A”, “B”
Movilidad electroforética (% de lo normal en buffer Tris)	110	100	100-110

Clases de G-6-PD obtenidas 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 difosfato [N.A.D.P.], 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 en el 4,9 % de los pacientes solamente.
2. **CLASE II:** con deficiencia severa de G-6-PD y sin anemia hemolítica congénita no esferocítica en el 45,7% de los pacientes.
3. **CLASE III** con deficiencia moderada en la actividad de la G-6-PD en 49,4 % de los pacientes [Tabla N° XV].

Características de la CLASE I de G-6-PD:

Los pacientes de la CLASE I de G-6-PD se caracterizaron clínicamente por presentar anemia hemolítica congénita no esferocítica 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 e 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 es tomada como 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 μM [V.N.: 50-70]. El Km de la G-6-PD parcialmente purificada para su sustrato N.A.D.P. se encontró en un rango que osciló entre 3,8-4 μM [V.N.: 2-6,9].

La enzima G-6-PD residual parcialmente purificada de estos pacientes se comportó como termolábil al exponerse a temperaturas 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 de 110%, en todos los casos [Tabla N° XV].

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 es tomada como 100%. El Km de la G-6-PD parcialmente purificada para su sustrato glucosa-6-fosfato se encontró entre 31-200 μM en los pacientes estudiados [V.N.: 50-70]. El Km de la G-6-PD parcialmente purificada para su sustrato N.A.D.P. se encontró en 2,2-4,4 μM [V.N: 2,9-4,4] en los pacientes estudiados [Tabla N° XV].

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 N° XV].

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 dentro de nuestros pacientes deficientes en G-6-PD con la clase II, la cual se caracterizó por presentar actividad de G-6-PD muy disminuida, con el Km para el sustrato PEP disminuido y el Km para el sustrato N.A.D.P normal, inestable al calor, con pH bifásico 6,5 y 9 [Fig. N° 16]

Características de la CLASE III de G-6-PD.

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 habían presentado crisis hemolítica después de la ingestión de habas. No tenían evidencia clínica ni de laboratorio de anemia hemolítica congénita no esferocítica.

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 es tomada como 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 N.A.D.P. también se encontró en valores de 1.4-2.9 μ M [V.N: 2.9-4.4] de acuerdo al paciente estudiado [Tabla N° XV].

La enzima G-6-PD parcialmente purificada de estos pacientes se comportó como estable al calor en unos pacientes y como termolábil al exponerse a temperaturas de 40 y 46 grados centígrados en otros pacientes.

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 diferentes [Tabla N° XV].

La electroforesis de la enzima parcialmente purificada mostró migraciones electroforéticas tipo "B" normal en el 20% de los pacientes y tipo rápida "A" 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. N° 17.

DISCUSION

El estudio clínico, hematológico y bioquímico para detectar anemias hemolíticas congénitas practicado 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 congénitas 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 [34].

La tercera etiología detectada fue la deficiencia de enzimas intraeritrocíticas de los ciclos de la hexosa monofosfato y glicolíticos, constituyendo la deficiencia de G-6-PD, la causa directa principal de anemia hemolítica congénita en 251 pacientes. Aunque la deficiencia de G-6-PD tiene áreas de alta prevalencia en Africa, y el Mediterráneo, se ha encontrado también en otros continentes, incluyendo América [35]. Es la deficiencia enzimática más frecuente que hay a nivel mundial. Se calcula que hay cuatrocientos millones de individuos afectados por esta enfermedad [36].

Nuestros indígenas carecen del gen para la deficiencia de G-6-PD como ha sido previamente reportado en estudios poblacionales por Müller y Acquatella [34], por lo cual podemos deducir que estos 251 pacientes venezolanos poseen el gen de la deficiencia de G-6-PD a través de sus ancestros caucásicos o africanos que inmigraron a Venezuela.

La incidencia de la deficiencia de G-6-PD en Venezuela ha sido encontrada entre 2 y 11,88%, de acuerdo al grupo étnico estudiado, siendo del 2% en donantes de sangre mestizos del Hospital Universitario de Caracas y del 11,88% en la población de Tapipa, Edo. Miranda, la cual está formada por individuos de raza negroide, que han permanecido aislados por muchos años, mezclándose muy escasamente con personas de otras razas [34].

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. N° 8]. Llamó la atención que las mujeres heterocigotas para la deficiencia presentaron niveles de G-6-PD intraeritrocíticos que variaron desde muy disminuídos (niveles menores del 10%) hasta

valores normales [Fig. N° 9]. Las 9 mujeres con valores de G-6-PD normales eran heterocigotas obligadas, ya que eran las madres de pacientes varones hemicingotos para la deficiencia. Esta variación de los niveles de G-6-PD de los eritrocitos de las mujeres heterocigotas puede explicarse por la teoría de Mary Lyon o imbalane 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 derivados del padre, con su cromosoma X activo, con niveles normales de G-6-PD [37]. Así, la proporción de eritrocitos variará entre eritrocitos con niveles muy bajos de G-6-PD, producto de la actividad génica del cromosoma X activo derivado de la madre y eritrocitos con niveles normales de G-6-PD producto de la actividad del cromosoma X activo paternalmente derivado. 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 a nivel celular fue realizada en eritrocitos provenientes de mujeres heterocigotas por Beutler y col. [38], quienes detectaron dos poblaciones de eritrocitos, normales y deficientes en G-6-PD, en este tipo de pacientes.

Las mujeres heterocigotas con niveles normales de G-6-PD son muy difíciles de diagnosticar al medir los niveles intraeritrocíticos de la enzima, y sólo se detectan con los estudios familiares, como lo hicimos en este estudio. El patrón de herencia en todas las 155 familias deficientes estudiadas fué a través del cromosoma X, que es la forma de transmisión genética establecida. Detectamos 4 parejas con hijos deficientes en G-6-PD, que se caracterizaron porque ambos padres eran deficientes en la enzima, lo cual nos habla de que la prevalencia de la deficiencia de G-6-PD en Venezuela permite que se reúnan dos deficientes y tengan hijos. Estas parejas podrían en el futuro tener hijas deficientes en G-6-PD, verdaderas homocigotas con valores intraeritrocíticos de la enzima muy deficientes y por lo tanto sufrirán la enfermedad como los varones hemicingotos.

Los pacientes procedían de las diferentes regiones de Venezuela, lo cual está de acuerdo con la literatura que indica que esta deficiencia se encuentra a nivel mundial en cualquier región [37]. Estudiamos 2.038 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 causa principal 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 para la deficiencia, mientras que la mayoría de las pacientes heterocigotas para la deficiencia son asintomáticas [36]. Al analizar las drogas oxidantes que indujeron la 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 dentro del eritrocito, oxidan el directamente o indirectamente y en el curso de su metabolismo son capaces de autooxidarse y generar radicales libres, que oxidan el glutatión reducido, y originan depleción del mismo, disminuyendo la actividad del ciclo del glutatión, y oxidando las drogas o sus radicales a los grupos sulfidrilos de la membrana del eritrocito y de la hemoglobina que se convierten en disulfidos o sulfóxidos, que precipitan la hemoglobina dentro del eritrocito y se forman los cuerpos de Heinz; se originan así daños irreversibles a la membrana del eritrocito y este será hemolizado [39, 40].

De 118 mujeres heterocigotas para la deficiencia de G-6-PD estudiadas encontramos que 53 de ellas eran propósitos y habían consultado por anemia. De estas 53 mujeres heterocigotas deficientes encontramos que 8 de ellas presentaron crisis hemolítica después de la 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 del fundamentalmente del paciente y no de la droga oxidante responsable del cuadro clínico, y que la droga precipita la hemólisis ya sea por ingestión, inhalación o absorción a través de la

piel. La segunda causa de consulta fue la ictericia neonatal, diferenciándose de la ictericia por incompatibilidad Rh porque ningún neonato deficiente en G-6-PD nació icterico, es decir no se presentó ictericia secundaria a deficiencia de G-6-PD dentro de las primeras 24 horas después del nacimiento y la anemia no fue severa, es decir presentaron más ictericia que anemia. La observación de que los neonatos deficiente en G-6-PD presentan más ictericia que anemia ha sido reportado previamente en otros países [41].

De 41 neonatos hemicigotos para la deficiencia de G-6-PD e ictericia estudiados, 19 requirieron fototerapia y 9 exanguinotransfusión. De 10 neonatos femeninos heterocigotos para la deficiencia de G-6-PD e ictericia, 9 de ellas ameritaron fototerapia y una de ellas exanguinotransfusión, lo cual nos habla de la severidad de la hemólisis, siendo de grado severa en los neonatos que requirieron exanguinotransfusión, para evitar el desarrollo de kernícterus. 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 en G-6-PD desarrollan ictericia; también es conocido que los eritrocitos neonatales poseen una actividad de G-6-PD más elevada que los eritrocitos del adulto, por lo cual se presume que otros factores deben estar involucrados en el desarrollo de la ictericia en el neonato deficiente en G-6-PD [42]. En Nigeria se ha reportado como causa precipitante de la ictericia el uso frecuente de naftaleno en los closets y ropas los bebés, 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 contaje 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 N° III, IV, V, VI, VII) [37].

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 pacientes con deficiencia de G-6-PD se caracterizan, como ya dijimos, por presentar en condiciones basales cifras de Hb y Hto normales, con crisis de hemólisis, sin embargo, estos pacientes por el contrario presentan el cuadro de anemia hemolítica congénita crónica y se comportan 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 congénita no esferocítica secundaria a deficiencia de G-6-PD se presenta en el 1% de los pacientes deficientes en G-6-PD e 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 [40]. Los pacientes estudiados con anemia congénita no esferocítica por deficiencia de G-6-PD presentaron coluria, pero nunca hemoglobinuria, lo cual sugiere que el proceso hemolítico es básicamente extravascular.

Estudios recientes 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 pacientes deficientes que sufren solo de crisis hemolítica es suficiente para mantener el potencial reductor dentro del eritrocito y por ende al paciente compensado desde el punto de vista de hemólisis, mientras que 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 y esto lleva a una hemólisis continua [44].

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 fue muy infrecuente aquí en este estudio, por lo cual podemos deducir que es infrecuente en Venezuela [45, 46, 47, 48]. En este estudio encontramos sólo 4 pacientes con favismo, 2 adultos y 2 niños. Se sabe que el favismo severo afecta principalmente a niños entre 2 y 5 años, y es más frecuente al ingerir habas frescas o incompletamente cocidas, rápidamente hervidas o fritas [45].

La causa de la hemólisis en estos casos de 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 sobre el eritrocito. Las habas tiernas contienen cantidades elevadas de vicina y convicina [49].

Las consecuencias de la oxidación del eritrocito que han sido estudiadas en experimentos in vitro realizados con eritrocitos deficientes en G-6-PD y que merecen especial atención son:

interferencia de la homeostasis del calcio y alteraciones de las proteínas de la membrana del eritrocito [9].

Cuando el eritrocito se oxida ocurre:

1. Oxidación del glutatión reducido (GSH) y de los tioles de la membrana.
2. Disminuye la actividad de la ATPasa del calcio.
3. Aumentan los niveles de calcio dentro del eritrocito.
4. Los niveles elevados de Ca activan las endopeptidasas que pueden atacar las proteínas de la membrana del eritrocito denominadas 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 sobre la cara externa de la banda 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. [9] [Fig. 18].

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 hacen que puedan coincidir. Dichos 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 estudiada la asociación con la deficiencia de G-6-PD trajo como consecuencia que la paciente sufra un curso clínico más severo, que, si presentara solamente la drepanocitosis homocigótica, mientras que la otra 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 [50]. Desde el punto de vista bioquímico la reticulocitosis 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 [40].

Se estudiaron pacientes deficientes en G-6-PD y deficientes en hierro, lo cual ocurre en nuestro país por la alta prevalencia de la deficiencia de hierro. Es de hacer notar que estos pacientes presentan anemia hipocrómica microcítica con índices globulares disminuidos, que no es habitual en los pacientes deficientes en G-6-PD, ya que en condiciones basales los pacientes deficientes en G-6-PD poseen un frotis de sangre periférica e índices globulares normales y durante las crisis hemolíticas podemos observar en los frotis aparición de eritrocitos con la hemoglobina polarizada hacia un extremo, presencia de esferocitos, células en casco, policromatofilia e índices globulares normales [34].

Las pacientes con deficiencia de G-6-PD que resultaron embarazadas presentaron un embarazo normal, ya que no eran portadoras de la variante clase I de G-6-PD, que se caracteriza por anemia hemolítica congénita no esferocítica, ni se expusieron a drogas oxidantes ni presentaron infecciones. Los niveles 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. Por el contrario, los eritrocitos provenientes de pacientes con drepanocitosis presentan aumento de los niveles de calcio, lo cual habla en favor de trastornos de la permeabilidad de la membrana y de la bomba de calcio [50, 51].

Estudiamos dos familias con deficiencia de G-6-PD, cuyos propósitos presentaban infecciones a repetición y crisis hemolítica, que ameritaban hospitalizaciones y fueron diagnosticadas como anemias hemolíticas por deficiencia de G-6-PD y enfermedad granulomatosa crónica secundaria a la deficiencia de G-6-PD.

La enfermedad granulomatosa crónica (E.G.C.) es un desorden 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 [53]. En la mayoría de los pacientes (más del 90%) el defecto es tan severo que virtualmente no se genera O₂. En el resto de los pacientes con E.G.C. un pequeño estallido respiratorio es observado (aproximadamente de 1-10% de lo normal) y se dice que estos pacientes poseen una variante de E.G.C. [54]. En todos los casos analizados el defecto a nivel molecular es causado por mutaciones de una de las 4 subunidades de la N.A.D.P.H.-oxidasa [53, 54]. Los genes para esos componentes están ubicados en cromosomas autosómicos o en el cromosoma X, lo cual

explica la heterogeneidad de la E.G.C. Puesto que los productos generados en el estallido respiratorio juegan un papel importante en la capacidad microbiciada 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 E.G.C. se manifiesta 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 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* [55]. Por largos años ha sido observado que estos pacientes son susceptibles a sólo cierto tipo de bacterias catalasas positivas, las cuales metabolizan el H₂O₂ que requiere la N.A.D.P.H.-oxidasa como sustrato para que se lleve a cabo el mecanismo bactericida dentro de las células fagocíticas [56].

Los propósitos de la familia Gonz. y de la familia Ve pueden ser catalogados como afectados de una E.G.C. secundaria a deficiencia de G-6-PD en los neutrófilos, siguiendo los postulados de Curnutte [57] para el diagnóstico de deficiencia de G-6-PD en los neutrófilos:

1. Está ligada al cromosoma X: estos propósitos que estamos reportando lo heredaron de su madre, como quedó establecido en los estudios de los niveles intraeritrocíticos 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.
2. En el caso de la niña M.V. con drepanocitosis-talasemia no encontramos niveles intraeritrocíticos disminuidos de la G-6-PD, pero como explicamos previamente esto puede suceder en las heterocigotas, y no es de extrañar que la prueba del N.B.T. de la madre dio normal.
3. Los pacientes propósitos de la familia Gonz. padecen una anemia hemolítica congénita no esferocítica permanente 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.
4. La paciente V.M. con drepanocitosis-talasemia también posee una anemia hemolítica crónica, pero en este caso está mezclada la drepanocitosis-talasemia con la deficiencia de G-6-PD.
5. La actividad de G-6-PD en los neutrófilos de los propósitos fue menor del 5%, por lo cual presentaron muy disminuido el estallido respiratorio y por lo tanto la prueba del N.B.T. en estos pacientes dio valores de 11 y 44 % en los propósitos de la familia Gonz. y de sólo 8% en la niña con drepanocitosis-talasemia (V.N.: 85-95%).

6. Disminución de los niveles intraeritrocíticos de G-6-PD: lo cual ocurrió en ambos propósitos.

Clínicamente los propósitos presentaron infecciones a repetición en piel y ganglios por *Stafilococcus aureus*, en pulmón (neumonías recurrentes), lo cual es una característica de la E.G.C.

La E.G.C. en nuestros pacientes deficientes en G-6-PD puede explicarse porque la N.A.D.P.H., 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 (6PGD). Ya que la G-6-PD es 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 N.A.D.P.H. 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 E.G.C. [58, 59, 60, 61].

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 [62, 63], uno esperaría encontrar con frecuencia E.G.C secundaria a deficiencia de G-6-PD; sin embargo, sólo 7 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 los niveles tan bajos de G-6-PD dentro del neutrófilo [40].

En este estudio presentamos 3 clases de G-6-PD detectadas haciendo estudio bioquímico y electroforético de la G-6-PD residual intraeritrocítica a 52 pacientes hemicigotos. Si observamos la Tabla XV podemos ver que hay una amplia variación en las propiedades cinéticas, los Km para los sustratos G-6-P y N.A.D.P. variaron de acuerdo a la clase y dentro de la clase hubo un rango de valores que varió 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 G-6-P estuvo aumentado y para el sustrato N.A.D.P. normal, y la enzima era inestable al calor. En esta clase de variante han sido reportadas G-6-PD con K_m elevado para la G-6-P e inestables al calor las variantes de G-6-PD de la clase I: Saint- Louis de Francia [64], Fukuck de Japón [65], East-Harlem en negros americanos [66]. Han sido reportadas 73 variantes de la clase I y solo 15 variantes electroforéticamente rápidas [15].

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".

Al comparar nuestros resultados con los ya reportados encontramos que nuestros pacientes presentaban 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 N.A.D.P. normal, estabilidad de la enzima al calor disminuida y curva de pH bimodal [Fig. 16]. 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 [67, 68], o con K_m para G-6-P normal como ha sido reportado con las variantes El Faayoum de Egipto, Bagdad, Ogori de Japón, Jammu de La India y Dushanba II [15].

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 N.A.D.P. 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 III detectamos la variante "A-" [Fig. N° 17], la cual se caracterizó por presentar los Km para los sustratos G-6-P y N.A.D.P. 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 ID con movilidades electroforéticas normales, rápidas o lentas. Aquí solo detectamos la variante de movilidad electroforética normal y rápida [15].

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 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.

BIBLIOGRAFIA

1. Dacie JV, Mollison PL, Richardson N, Selwyn JG, Shapiro L: Atypical congenital hemolytic anemia. *Quart. J. Med.* 85: 79, 1953.
2. Newton WA Jr, Bass JC: Glutathion sensitive chronic nonspherocytic hemolytic anemia. *Am. J. Dis. Child.* 96: 501, 1958.
3. Paglia DE: Biochemistry of the red cell. En: Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H (Edit.) "Hematology. Basic Principles and Practice", Churchill Livingstone Inc, 1991.
4. Beutler E: Red cell enzyme defects as no diseases and as diseases. *Blood* 54: 1, 1979.
5. Lehninger AL: Ciclo del ácido tricarbóxico y ruta del fosfogluconato. En: Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1972.
6. Gorlin JB, Stossel T: The Phagocyte System: Structure and function. Chapter 23 in Nathan & Oski (eds): Hematology of Infancy and Childhood, 4th edition. W.B Saunders Co, 1993.
7. Kanno H, Huang IY, Kan YW, Yoshida A: Two structural genes on different chromosomes are required for encoding the major subunit of human red cell G-6-PD. *Cell*: 58: 595, 1989.
8. Rinaldi A, Filippi G et al: Variability of red cell phenotypes between and within individuals in an unbiased sample of 77 certain heterozygotes for G-6-PD deficiency in Sardinians. *Am J. Hum. Gen.* 28: 595, 1989.
9. Arese P, De Flora A: Pathophysiology of Hemolysis in Glucose-6- Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Seminars in Hematology* 27: 1, 1990.
10. Boada J: Estudio preliminar sobre la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa. V Congreso de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas, Caracas, Venezuela, 1963.
11. Acquatella G: Deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa en diferentes grupos raciales de Venezuela. *Acta Médica Venezolana* 4: 269, 1967.
12. Müller A: Anemias Hemolíticas en Venezuela. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Médicas. Universidad del Zulia, 1984.
13. Beutler E. Yoshida A: Genetic variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. A catalogue and future prospects. *Medicine* 67: 311, 1988.
14. Persico MG, Viglietto G, Martini G, Tomolo D et al: Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase c_DNA clones: Primary structure of the protein and unusual 5' non coding region. *Nucleic Acid Res.* 14: 2511, 1986.
15. Beutler E: The Genetics of Glucose-6-phosphate dehydrogenase Deficiency. *Seminars in Hematology* 27: 137, 1990.
16. Yoshida A: Glucose-6-phosphate dehydrogenase of human erythrocyte. Purification and characterization of normal "B" enzyme: *J. Biol.Chem.*241: 4966, 1966.
17. 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.

18. Hirono A, Beutler E: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3951, 1988.
19. 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. U.S.A.* 85: 5171, 1988.
20. Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Capítulo 58, pag 561. En: Williams WJ, Beutler E, Erslev A, Lichtman M (eds): *Hematology*, Me Graw Hill, Inc, 1993.
21. Luzzatto L: G-6-PD deficiency and hemolytic anemia. Capítulo 19, pág. 674; en: Nathan and Oski (eds), *Hematology of Infancy and Childhood*, 4th edition, 1993, by W.B. Saunders Co.
22. Simple Electrophoretic System for presumptive identification of abnormal Hemoglobins by The International Committee for Standardization in Hematology. *Blood*: 52: 1058, 1978.
23. Bemini LR: Rapid determination of Hemoglobin A2 by DEAE cellulose chromatography. *Biochem. Genet.* 2: 305, 1969.
24. Beutler E: *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods* 2nd edition, 1975 by Grune E Stratton, New York.
25. Beutler E, Mathai C and Smith J: Biochemical Variants of G-6-PD giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic Disease. *Blood*: 31, 131, 1968.
26. Kirkman HN, Kidson C, Kennedy M: Variants of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Studies of samples from New Guinea, in Beutler E (ed): *Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism*. New York, Grune & Stratton, 1968, p 126.
27. Müller-Soyano A, Ramsey B, Glader B: Comparative monovalent cation transport in neonatal and adult red blood cells. *Ped. Res.* 18: 778, 1984.
28. Milford-Ward A: Immunoprecipitation in the evaluation of the proteins in plasma and body fluids. En: Thompson RA (ed), *Techniques in Clinical Immunology*, 2nd edition, Blackwell Scientific Publication, 1981.
29. Brown D, Hobart MJ: Complement and complement fixation. En: Thompson RA (ed), *Techniques in Clinical Immunology*, 2nd edition, Blackwell Scientific Publication, 1981.
30. Wilkinson PC: Neutrophil leucocyte function tests. En: Thompson RA (ed), *Techniques in Clinical Immunology*, 2nd edition, Blackwell Scientific Publication, 1981.
31. Stossel TP: Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. *Blood* 42: 121, 1973.
32. Romero PJ: Role of membrane-bound Ca in ghost permeability to Na y K. *J. Membrane Biol.* 29: 329, 1976.
33. WHO Scientific Group: Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Who Techn. Rep. Ser.* 366, Geneva, 1967.

34. Müller A: Anemias Hemolíticas congénitas por deficiencia de Glucosa-6- fosfato deshidrogenasa en Venezuela en Hematología Básica (3ªed). Editor J.L.Perez Requejo. Facultad de Medicina de Carabobo.
35. WHO WORKING GROUP: Glucose-6-phosphate deficiency. Bull. WHO 61: 6011, 1989.
36. Lisker R: Deficiencias enzimáticas de la vía de las pentosafosfato y metabolismo del glutatión. En: Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Ediciones de la Universidad de Salamanca, España, 1992.
37. Lyen MF: Gene action in the X chromosome in the mouse. Nature 190: 372, 1961.
38. Beutler E, Yeh M, Fairbanks 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. U.S.A. 48: 9, 1962.
39. 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.
40. 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.
41. Meloni, S, Costa S, et al: Haptoglobin, hemopexin, hemoglobin, hematocrit in newborn with erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Acta Haematol. (Basel) 54: 284, 1975.
42. Doxiadis SA, Valaes F: Toe clinical picture of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in early childhood. Arch. Dis. Child. 39: 545, 1964.
43. Owa JA: Relationship between exposure to icterogenic agents, G-6-PD deficiency and severe neonataljaundice in Nigeria. Acta Paediatr. Scand. 78: 848, 1989.
44. Johnson 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.
45. Kattamis CA, Kyriazakou M, Chaidas S: Favism. Clinical and biochemical data. J. Med. Genet. 6: 34, 1969.
46. Kattamis CA, Chaidas S: G-6-PD deficiency and favism in the island of Rhodes (Greece). J. Med. Genet. 6: 286,1969.
47. Donoso G, Hedayat H, Khayatian H:Favism with special reference to Iran. Bull WHO 40:513, 1969.
48. Arese P: Favism. A natural model for the study of hemolytic mechanisms. Rev. Pure Appl.Pharmacol. Sci. 3:123, 1982.
49. Arese P, Mannuzzu L, Turrini F et al: Etiological aspect of favism. En: Yoshida A, Beutler E (eds): Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, San Diego, Academic, 1986, pp45-75.
50. Smith HL, Oski FA, Brody JI:Toe hemolytic crisis of sickle cell disease :the role of glucose-6-phosphate dehydrogenase.J. Pediatr.74:544, 1969.

51. Sachs J R, Knauf PA, et al: Transport through red cell membranes. En: *Toe Red Blood Cell*. 2nd ed, vol 2. Surgenor DN (ed), New York Academic Press, 1975, pp 613-703.
52. Gardos G: The role of calcium in the potassium permeability of the erythrocyte membrane. *Acta Physiol.Acad.Sci.HIUIg*.15:121, 1959.
53. Curnutte JT, Babior BM: Chronic granulomatous disease. En: *Advances in Human Genetics*. Harris H and Hirschhom K (eds), New York, Plenum Pub. Corp, 1987, pp.229-297.
54. Smith RM, Curnutte JT: Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 77:673, 1991.
55. Cohen MS, Isturiz, RE et al: Chronic granulomatous disease. *Ann. Intem. Med.*99:657, 1983.
56. Mandell 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.
57. Curnutte JT: Disorders of phagocyte function. En: *Hematology: Basic Principles and Practice*. Hoffman R, Benz EJ et al (eds), New York, Churchill Livingstone, 1991, pp 577-587.
58. Gray GR, Klebanoff SJ et al: Neutrophil dysfunction in chronic granulomatous disease and non-spherocytic haemolytic anaemia caused by complete deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Lancet* 2: 530, 1973.
59. 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.
60. 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.
61. Mamlok RJ, Mamlok V et al: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, neutrophil dysfunction, and *Chromobacterium violaceum* sepsis. *J. Pediatr.*111:852, 1987.
62. Yoshida □ Stamatoyannopoulos G et al: Biochemical genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase variation. *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 155:868, 1968.
63. Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase: New perspectives. *Blood* 73:1397, 1989.
64. Khan A Boulard M, Hakim J et al: Anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire par déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase érythrocytaire. Description de deux Nouvelles variantes: Gd (-) Saint Louis (Paris) et Gd (-) Hayem. *Nouv. Rev. Fr. Hematol* 14: 587, 1974.
65. Fujii H, Miwa S, Tani K et al: Glucose-6-phosphate dehydrogenase found in Japan. *Hum.Genet.*66:276, 1984.

66. 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. Pediatr.* 90: 89, 1977.
67. Yennakov N, Tokarev J, Chemjak N et al: New stable mutant Gd (-) variant G-6-PD Tashkent and G-6-PD Nucus. Molecular basis of hereditary enzyme deficiency. *ActaBiol. Med. Geriat.* 40: 559, 1981.