

Tesis Doctoral titulada “Anemias Hemolíticas en Venezuela” introducida ante el Ilustre Consejo de la Facultad de Medicina del Estado Zulia, para optar al título de Doctor en Ciencias Médicas

**Dra. Aixa Müller de Soyano
Médico-Hematólogo**

Tesis Doctoral titulada “Anemias Hemolíticas en Venezuela” introducida ante el Ilustre Consejo de la Facultad de Medicina del Estado Zulia, para optar al título de Doctor en Ciencias Médicas

Autor:



**Dra. Aixa Müller de Soyano
Médico-Hematólogo**

Nombre: Aixa Müller de Soyano

Título: Médico Hematólog, UCV, 1968

Cargo: Especialista II. CQOH. Del MSAS UCV.

Dirección de Habitación: Urbanización Las Palomas nueva Ruta, Quinta Aixa. San Antonio de los Altos

Dirección Oficina: Centro de Quimioterapia Oncológica y Hematología de MSAS-UCV. Ciudad Universitaria

Dirección Postal: CQOH- Apartado 20253, Caracas 102

Telefono Oficina: 615666 – 612559- 616497





RESUMEN

El objeto de este trabajo es el estudio de 190 pacientes con sospecha de Anemia Hemolítica referidos al Centro de Quimioterapia Oncológica y Hematología para diagnóstico etiológico de dichas anemias. Se emplearon los siguientes métodos: historia clínica y examen físico, hematología completa, contaje de reticulocitos, investigación de drepanocitos, electroforesis y electro enfoque de la hemoglobina, prueba de inestabilidad de la hemoglobina, prueba pantallas para detección de eritroenzimopatías, cuantificación de las enzimas de los ciclos glicolíticos y hexosa mono fosfato, síntesis de cadenas de globina, estudio de los eritrocitos al microscopio electrónico de barrido, curva de disociación de oxígeno de la Hb.

Se detectaron 34 pacientes con deficiencias enzimáticas, siendo la más frecuente la deficiencia de G-6-PD. Se encontraron 3 pacientes deficientes en piruvato quinasa (PQ), dos de ellos con antecedentes de úlceras en miembros inferiores y probablemente con el mismo tipo de variante de PQ reportados en 1976 por Müller y Col. Se detectó la primera familia con anemia hemolítica crónica por deficiencia de hexoquinasa estudiada en Venezuela y Latinoamérica, y la primera familia en Venezuela con deficiencia de NADH meta Hb reductasa, que, en lugar de hemólisis, produce cianosis. Se estudiaron 12 pacientes con anemias por defectos de la membrana eritrocítica, 10 de ellos con esferocitosis congénita, un paciente con estomatocitosis y otro con ovalocitosis.

Entre los pacientes con esferocitosis se estudiaron 3 con presentación atípica: dos lactantes menores desarrollaron cuadros de anemia muy severa, que en uno de los casos condujo a hipoplasia selectiva de la serie roja, y un niño de 3 años presentó asociada a la esferocitosis una anemia hemolítica autoinmune. Se estudiaron 88 pacientes con hemoglobinopatias, de ellos 40 presentaron drepanocitosis -homocigótica, 4 taras drepanocíticas, 5 hemoglobinopatias tipo AC y 3 pacientes presentaron hemoglobinas inestables.

Entre estas se estudió: Un paciente de 12 años de edad con anemia hemolítica congénita secundaria, una hemoglobina inestable de migración electroforética lenta infrecuente. 2) Un donante asintomático con una variante de Hb inestable, de migración electroforética rápida 3) Un lactante de 6 meses de edad con una hemoglobina rápida - con afinidad al oxígeno disminuida, la cual produce cianosis y representa el primer caso reportado en Latinoamérica. Se estudiaron 29 pacientes con talasemia encontrándose el 15º caso de un paciente heterocigoto para deltabeta y talasemia beta con altos niveles de Hb A₂, con una anemia hemolítica mucho mas severa que la reportada previamente en los otros casos.

Además, se realizaron estudios en diferentes regiones de Venezuela para detectar la incidencia de la deficiencia de G6PD y PQ.

INDICE

	Páginas
- ANEMIAS HEMOLÍTICAS EN VENEZUELA	13
- ANEMIAS HEMOLITICAS (AH-) ASOCIADAS CON DEFICIENCIAS ENZIMATICAS	14
- ANEMIA HEMOLÍTICA ASOCIADA CON DEFICIENCIA DE (G6PD)	17
- ANEMIA HEMOLÍTICA ASOCIADAS CON DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA (PQ)	21
- ANEMIA HEMOLÍTICA ASOCIADA CON DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA (HQ)	22
- ANEMIAS HEMOLITICAS ASOCIADAS CON DEFECTOS DE LA MEMBRANA ERITROCÍTICA	23
- ESFEROCITOSIS HEREDITARIA:	23
- ELIPTOCITOSIS HEREDITARIA:	23
- ESTOMATOCITOSIS HEREDITARIA:	25
- ANEMIAS HEMOLITICAS PRODUCIDAS POR DEFECTOS EN LA PRODUCCIÓN DE LAS CADENAS DE GLOBINA	25
- DEFECTO DE LA ESTRUCTURA DE LAS CADENAS DE GLOBINA:	26
1. DREPANOCITOSIS	26
2. HEMOGLOBINAS INESTABLES:	27
3) HEMOGLOBINAS CON ALTERACIONES EN LA AFINIDAD POR EL OXIGENO	28
- DEFECTOS DE LA SINTESIS DE LAS CADENAS DE GLOBINA	28
<i>Los Síndromes Talasémicos:</i>	28
-MATERIALES Y METODOS	30
-HISTORIA CLÍNICA PRACTICADA A PACIENTES CON AMÉMIA HEMOLÍTICA	31

- ESTUDIOS DE LABORATORIO PRACTICADOS A LA SANGRE DE LOS PACIENTES CON ANEMIA	31
RESULTADOS	34
- DIAGNÓSTICO FISIOPATOLÓGICO EN PACIENTES CON SOSPECHA DE ANEMIA HEMOLÍTICA	34
- DEFICIENCIA DE LA GLUCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA	40
- GENÉTICA DE LA GLUCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA	51
- CINÉTICA DE LA GLUCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA	51
- DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA	53
- ESTUDIOS POBLACIONALES INCIDENCIA DE LA DEFICIENCIA DE G-6-PD Y LA PIRUVATO QUINASA	59
-DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA	61
-ANEMIA HEMOLITICA CRONICA ASOCIADA A UNA VARIANTE DE HEXOQUINASA	61
- DEFICIENCIA DE NADH METAHEMOGLOBINA REDUCTASA ASOCIADA CON CIANOSOS	68
- ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGENITAS POR DEFECTOS DE MENBRANA ESFEROCITOSIS CONGÉNITAS	71
- ANEMIAS HEMOLÍTICAS, SECUNDARIAS A OVALOCITOSIS	82
- ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGÉNITAS SECUNDARIAS A ESTOMACITOSOS	84
- ANEMIAS HEMOLITICAS PRODUCIDA POR DEFECTO EN LA ESTRUCTURA DE LAS CADENAS DE GLOBINA	87
Drepanocitosos	87
Talasemia Menor	93
Delta Beta Talasemia	97
- HEMOGLOBINAS INESTABLES	106
- ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGENITA ASOCIADA A UNA VARIANTE INESTABLE DE HEMOGLOBINA	106

- VARIANTE INESTABLE RAPIDA DE HEMOGLOBINA	108
- CIANOSIS PRODUCIDA POR UNA HEMOGLOBINA INESTABLE CON BAJA AFINIDAD DE OXIGENO	111
- HEMOGLOBINA SC	115
- HEMOGLOBINA HS CON PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL	117
DISCUSIÓN	118
BIBLIOGRAFIA	131

INDICE DE TABLAS

TABLA N° I. Clasificación de las anemias hemolíticas	13
TABLA N° II. Drogas y compuestos químicos que inducen hemolisis en pacientes con deficiencia de G-6-PD	17
Tabla N° III	8
Tabla N° IV. Variantes de G-6-PD	20
TABLA N° V. Valores normales de los métodos especiales utilizados para diagnosticar una Hemoglobina	34
TABLA N° VI. Valores normales de las diferentes enzimas intraeritrocíticas en adultos venezolanos	37
TABLA N° VII. Diagnóstico Fisiopatológico realizado en 190 Pacientes con anemia	38
TABLA N° VIII-A. Valores hematológicos y bioquímicos en pacientes y familiares deficientes en G-6-PD	45
TABLA N° VIII-B. Valores hematológicos y bioquímicos durante y fuera de crisis hemolítica en algunos pacientes deficientes en G-6-PD	45
TABLA N° IX. Niveles de G-6-PD intraeritrocitos en paciente y familiares	49
TABLA N° X. Valores hematológicos y bioquímicos de los pacientes deficientes en Piruvato Quinasa	54
TABLA N° XI. Deficiencia de G-6-PD y PQ en diferentes poblaciones venezolanas	59
TABLA N° XII. Variantes electroforéticas de G-6-PD en 96 habitantes de Tapipa	60
TABLA N° XIII. Actividades enzimáticas intraeritrocíticas en propósito LI y control	65

TABLA N° XIV. Niveles de hexoquinasa (UI/g HB) Intraeritrocíticos	66
TABLA N° XV. Actividades Erirocíticas (Familia LI)	66
TABLA N° XVI. Datos de Laboratorio familia Da Silva	71
TABLA N° XVII. Valores Hematológicos y bioquímicos en pacientes con esferocitosis	75
TABLA N° XVIII. Valores Hematológicos y bioquímicos en el paciente con anemia hemolítica secundaria a ovalocitos	82
TABLA N° XIX. Valores hematológicos y bioquímicos de la familia LDO.	96
TABLA N° XX. Datos de Laboratorio. Familia: Laguna	105
TABLA N° XXI. Variantes de Hexoquinasa	124

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1. Metabolismo de la glucosa	15
FIGURA N° 2. Vía de las pentosas y metabolismo del glutatión	16
FIGURA N° 3. Patofisiología de la hemólisis en globulos rojos deficientes en G-6-PD	18
FIGURA N° 4. Electroforesis de HB A en acetato de celulosa a pH 8.6	35
FIGURA N° 5. Electro enfoque de Hemoglobina	36
FIGURA N° 6. Curva de fragilidad globular en fresco / Curva de fragilidad globular incubada. Paciente (FA)	42
FIGURA N° 7. Curva de fragilidad globular en fresco / Curva de fragilidad globular incubada. Paciente (RC)	43
FIGURA N° 8. Curva de fragilidad globular en fresco / Curva de fragilidad globular incubada. Paciente (LI)	44
FIGURA N° 9. Cuerpos de Heinz vistos al microscopio de luz	46
FIGURA 10. Sangre de deficiente en G-6-PD con normoblasto Postcrisis hemolítica	46
FIGURA N° 11. Frotis de sangre de paciente deficiente en G6PD durante crisis hemolítica.	47
FIGURA 12. Se aprecia que la sangre del control muestra fluorescencia a los 5 min mientras que la del paciente deficiente en G-6-PD no flourece	48
FIGURA N° 13. Características bioquímicas de la enzima G-6-PD en 8 individuos deficientes en G-6-PD	52
FIGURA N° 14. Frotis de sangre de paciente deficiente en piruvato quinasa mostrando abundantes crenocitos, dianocito, esferocitos	56

FIGURA N° 15. Frotis de sangre del paciente deficiente en piruvatoquinasa mostrando cuerpos de Howell Jolly y abundantes crenocitos	57
FIGURA N° 16. Frotis de sangre de la paciente deficiente en piruvatoquinasa (EH) mostrando normoblasto (Ehy) crenocitos	58
FIGURA N° 17. Crenocito visto al Microscopio electrónico de barrido / Frotis de sangre periférica de paciente (LL) deficiente en hexoquinasa	62
FIGURA N° 18. Características clínicas y bioquímicas de la variante de Hexoquinasa. Caracas	64
FIGURA No 19. Curva espectrofométricas de absorción de la hemoglobina, después de oxidarla a Fe ⁺⁺⁺ con ferricianuro, se observan dos inflexiones de normales a 540 y 580 mm de longitud de onda tanto en el paciente como en el control	70
FIGURA N° 20. Frotis de sangre de la paciente con anemia hemolítica Congénita. Por esferocitosis	72
FIGURA N° 21. Curva de fragilidad globular en fresco / Curva de fragilidad globular incubada. Paciente A.A.B.	73
FIGURA N° 22. Frotis de aspirado de la médula ósea de la paciente con anemia hemolítica congénita secundaria a esferocitosis al microscopio de luz se observa hiperplasia eritroide y sangre con esferocitos vistos al microscopio electrónico de barrido	74
FIGURA N° 23. Frotis de sangre del paciente con anemia hemolítica congénita secundaria a esferocitosis con presencia de esferocitos/ Eritrocitos vistos al microscopio Electrónico de barrido	77
FIGURA N° 24. Curva de fragilidad globular en fresco / Curva de fragilidad globular incubada . Paciente F.T.	77
FIGURA N° 25. Frotis de médula ósea de paciente con anemia hemolítica congénita por esferiocitosis con hiperplasia eritride al microscopio de luz (40 x y 100X)	78
FIGURA N° 26. Frotis de sangre de paciente con esferocitosis congenita con esferocitos y esferocito al microscopio electrónico de barrido	79
FIGURA N° 27. Curva de fragilidad globular en fresco / Curva de fragilidad globular incubada . Paciente J.A	80
FIGURA N° 28. Curva de fragilidad globular incubada. Paciente madre J.A. / Eritrocito de la madre del paciente J.A.. Visto al microscopio electrónico de barrido	81

FIGURA N° 29. Frotis de sangre de paciente con ovalocitosis congénita / Ovalocitos al microscopio electrónico de barrido	82
FIGURA N° 30. Curva de fragilidad globular en fresco / Curva de fragilidad globular incubada . Paciente MP	83
FIGURA N° 31-A Estomatocitos vistos al microscopio electrónico de barrido	85
FIGURA N° 31-B Curva de fragilidad globular en fresco / Curva de fragilidad globular incubada . Paciente E.C	86
FIGURA N° 32. Frotis de sangre de paciente con drepanocitosis homocigota vistos al microscopio de luz y al electrónico de barrido	87
FIGURA N° 33. Prueba de solubilidad de la hemoglobina. Tubo de la izquierda Hb SS insoluble. Tubo de la derecha Hb AA soluble, transparente	88
FIGURA N° 34. Curva de disociación de oxígeno de la Hb	89
FIGURA N° 35. Electroforesis en acetato de celulosa a pH 8.6	90
FIGURA N° 36. Electroenfoque de HB mostrando las hemoglobinas S, As, AC	91
FIGURA N° 37. Curva de disociación de oxígeno de la Hb	92
FIGURA N° 38. Electroenfoque de diferentes variantes de hemoglobina	94
FIGURA N° 39. Frotis de sangre de paciente con talasemia intermedia , se observa poiquilocitosis, hipocromía, microcitosis, dianocitosis	95
FIGURA N° 40. Paciente con Delta-Beta Talasemia, se observó prominencia de huesos frontales, y maxilar superior con nariz en silla de montar / Paciente (izq.) muestra disminución del desarrollo pondo estatural. Niño a la derecha es hermano de 6 años de edad.	97-98
FIGURA N° 41-A. Curva de fragilidad globular en fresco / Curva de fragilidad globular incubada . Paciente HR	99
FIGURA N° 41-B. Frotis de sangre periférica del paciente con Delta-Beta Talasemia. Se observa marcada hipocromia, poiquilocitosis, microcitosis.	100
FIGURA N° 42. Electroferesis en acetato de celulosa a pH 8,6, se observa que el puesto No 7 migra la Hb del paciente con delta beta talasemia.	102
FIGURA N° 43. Curva de sisociación de oxígeno de la Hb. Delta beta talasemia	103
FIGURA N° 44. Picos obtenidos por cromatografía en carboximetilcelulosa de la Globina del paciente con delta-beta talasemia.	104
FIGURA N° 45. Radiografía de cráneo de paciente con delta beta talasemia mostrando cráneo en cepillo y prominencia d e hueso maxilar superior	104

FIGURA N° 46. Electroferesis en acetato de celulosa a pH 8,6 mostrando migración de la hemoglobina normal A	107
FIGURA N° 47. Curva de disociación de oxígeno de la Hb. Paciente con banda rápida de Hb	109
FIGURA N° 48. Electroferesis de hemoglobina en acetato de celulosa mostrando en el 2do. Lugar a la hemoglobina rápida del paciente Miguel Muñoz	110
FIGURA N° 49. Electroenfoque de hemoglobina	111
FIGURA N° 50. Curva de disociación de oxígeno (Familia DA)	114
FIGURA N° 51. Electroenfoque preparativo de HB	115
FIGURA N° 52. Frotis de sangre de paciente con hemoglobinopatía SC mostrando marcada dianocitosis con hipocromía y anisocitosis	116

ANEMIAS HEMOLÍTICAS EN VENEZUELA

Los eritrocitos normales son discos bicóncavos que miden alrededor de 7-8 μ y tienen una vida media de 100-120 días en sangre circulante (1) Las anemias hemolíticas son una consecuencia clínica de anormalidades intrínsecas o extrínsecas de los eritrocitos que conducen a una disminución de la vida media de los mismos. La hemólisis puede ser el resultado de condiciones extraglobulares tales como anticuerpos, drogas, infecciones, etc., que actúan sobre eritrocitos funcionalmente normales ó de anormalidades eritrocitarias intrínsecas, las cuales en su mayoría son defectos hereditarios en la formación o protección de los eritrocitos circulantes i.e., defectos de membrana, deficiencias enzimáticas y hemoglobinopatías (2), (Tabla N° I). Estas anormalidades eritrocitarias intrínsecas van a conducir a una disminución de la flexibilidad de la membrana cuya consecuencia es el secuestro y remoción de los eritrocitos por las células fagocíticas del bazo y del hígado (3).

TABLA N° 1: CLASIFICACIÓN DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS

- A) Congénita: Anormalidades intrínsecas
 - a) Defectos de la membrana del glóbulo rojo:
 1. Esferocitosis hereditaria
 2. Eliptocitosis hereditaria
 3. Acantocitosis (abetalipoproteinemia)
 4. Deficiencia de acetil colesterol acetil transferasa
 5. Defecto en la transferencia de ácidos grasos o fosfolípidos
 - b) Deficiencia de las enzimas de ciclo glicolítico:
 1. Piruvato quinasa
 2. Hexoquinasa
 3. Glucosa-fosfato-isomerasa
 4. Fosfofructoquinasa
 5. Aldolasa
 6. Triosa fosfato isomerasa

7. 7. 2.3. Difosfogliceromutasa
 8. Fosfoglicero-kinasa
 9. Enolasa
- c) Deficiencia de las enzimas del ciclo de la hexosa monofosfato y del metabolismo del glutatión
1. Glucosa 6 fosfato dehidrogenasa
 2. Glutatión reductasa
 3. Glutatión peroxidasa
 4. Glutation sintetasa
 5. Glutamyl cisteine sintetasa
- d) Defectos en la Estructura y Síntesis de la Globina:
1. Enfermedad de las hemoglobinas inestables
 2. Drepanocitosis
 3. Otras hemoglobinopatías homocigotas: CC, DD, EE, etc.
 4. Talasemia mayor
 5. Enfermedad por hemoglobina H
 6. Desórdenes heterocigotos dobles (enfermedad por hemoglobina SC, drepanocitosos-talasemia)
- B) ADQUIRIDOS (Anormalidades extrínsecos)
- a) Anemias Inmuno hemolíticas

ANEMIAS HEMOLITICAS (AH-) ASOCIADAS CON DEFICIENCIAS ENZIMATICAS

El eritrocito, a diferencia de otras células del organismo posee una maquinaria metabólica relativamente reducida cuya principal función es la de producir la energía necesario para mantener la flexibilidad celular, y para mantener por otro lado, en su forma reducido el hierro de la hemoglobina y ciertos grupos sulfidrilos. Esto se logra casi exclusivamente a través de la conversión de glucosa en ácido láctico, a través de dos vías metabólicas, estrechamente ligadas: 1) una vía directa (vía glicolítica) que consume alrededor del 90-95% de la glucosa y que resulta fundamentalmente en lo

generación de ATP (Fig. N° 1), una vía alterna (shunt de lo hexosa monofosfato) y cuya función es la producción de NADPH, el cual es un agente reductor (4) (Fig. N° 2).

FIGURA 1

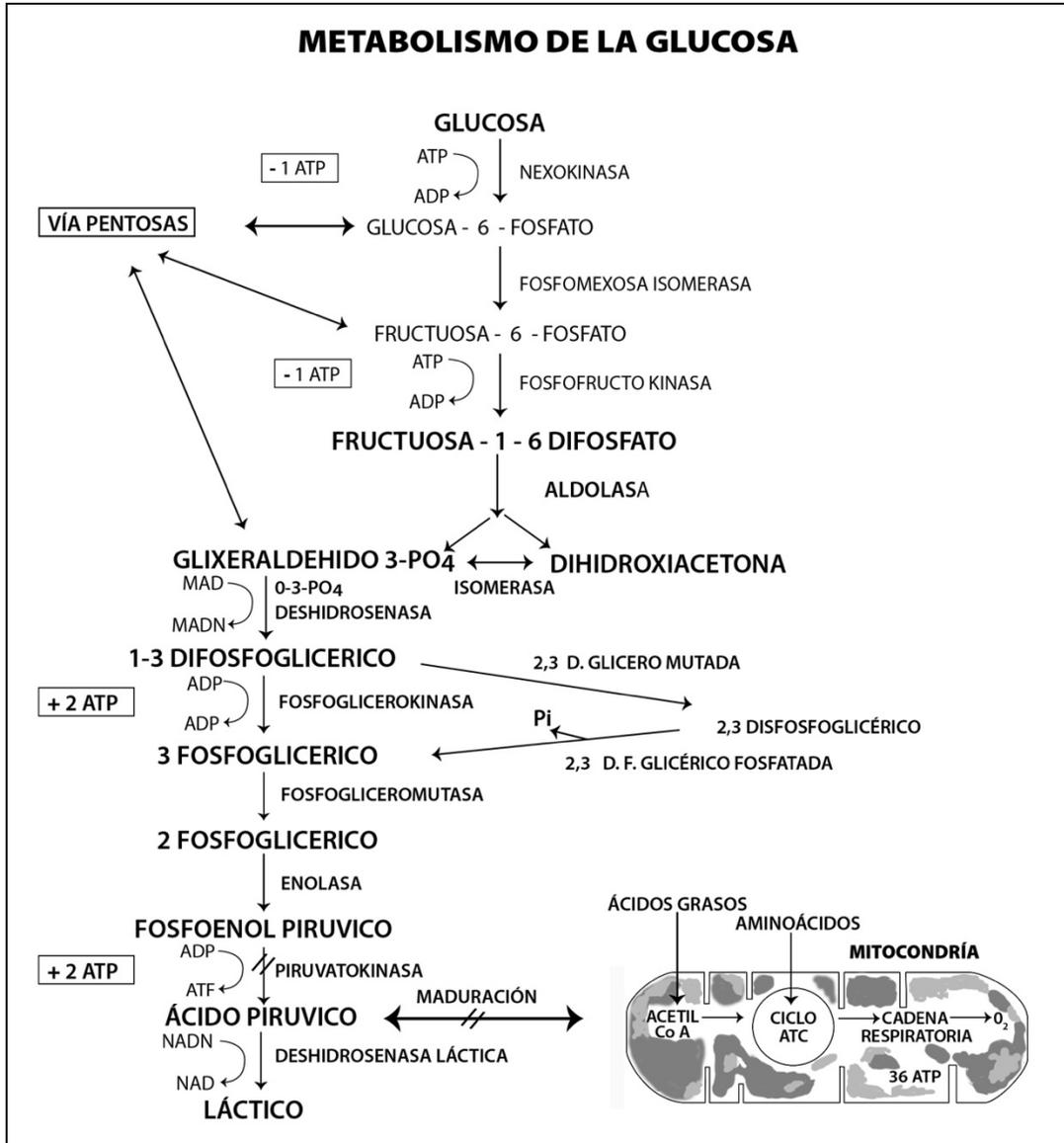
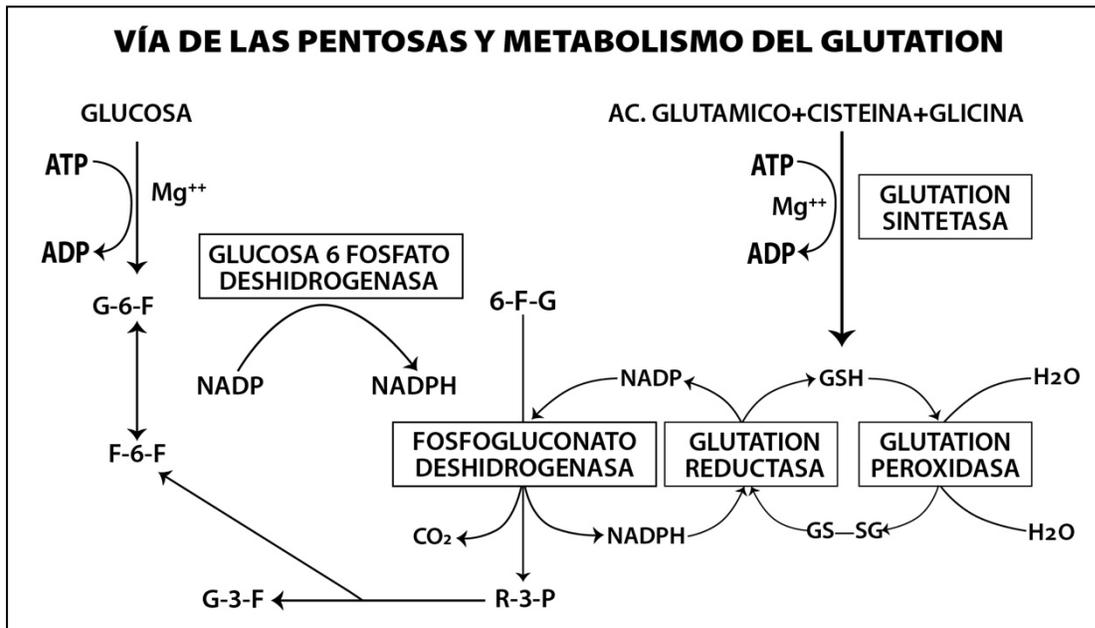


FIGURA 2



La deficiencia cualitativa o cuantitativa de algunas de las enzimas involucradas en estos procesos metabólicos puede dar origen a trastornos metabólicos cuyo resultado final puede ser el acortamiento de la vida media del eritrocito. Así, dentro del ciclo glicolítico, han sido descritos deficiencias de las siguientes enzimas: piruvatoquinasa, glucosa-fosfato isomerasa, fosfofructokinasa, aldolasa, triosafosfato isomerasa, 2, -3, difosfogliceromutasa, fosfoglicerato kinasa, y enolosa (4).

En el ciclo de la hexosa monofosfato han sido reportadas deficiencias de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, glutatión sintetasa, y glutamilo-cisteína sintetasa. La deficiencia de otros enzimas no involucrados en las vías metabólicas anteriores, tales como la adenilatoquinasa, ribosafosfato pirofosfoquinasa y adenosin trifosfatasa (ATPasa), también han sido asociadas a trastornos hemolíticos, aunque su frecuencia es relativamente pequeña (4, 5).

**ANEMIA HEMOLÍTICA ASOCIADA CON DEFICIENCIA
DE GLUCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA (G6PD)**

La G6PD es una enzima que pertenece al ciclo de lo hexosa monofosfato y cuya función es la de metabolizar la G6P a 6 fosfogluconato en presencia de NADP, el cual o su vez es reducida a NADPH. Este compuesto es una coenzima requerida para mantener el glutatión en estado reducido, mecanismo por el cual se protege a los eritrocitos del daño peroxidativo causado por ciertas drogas oxidantes o sus metabolitos, tales como sulfas, quinidinas, etc. (Tabla N° II).

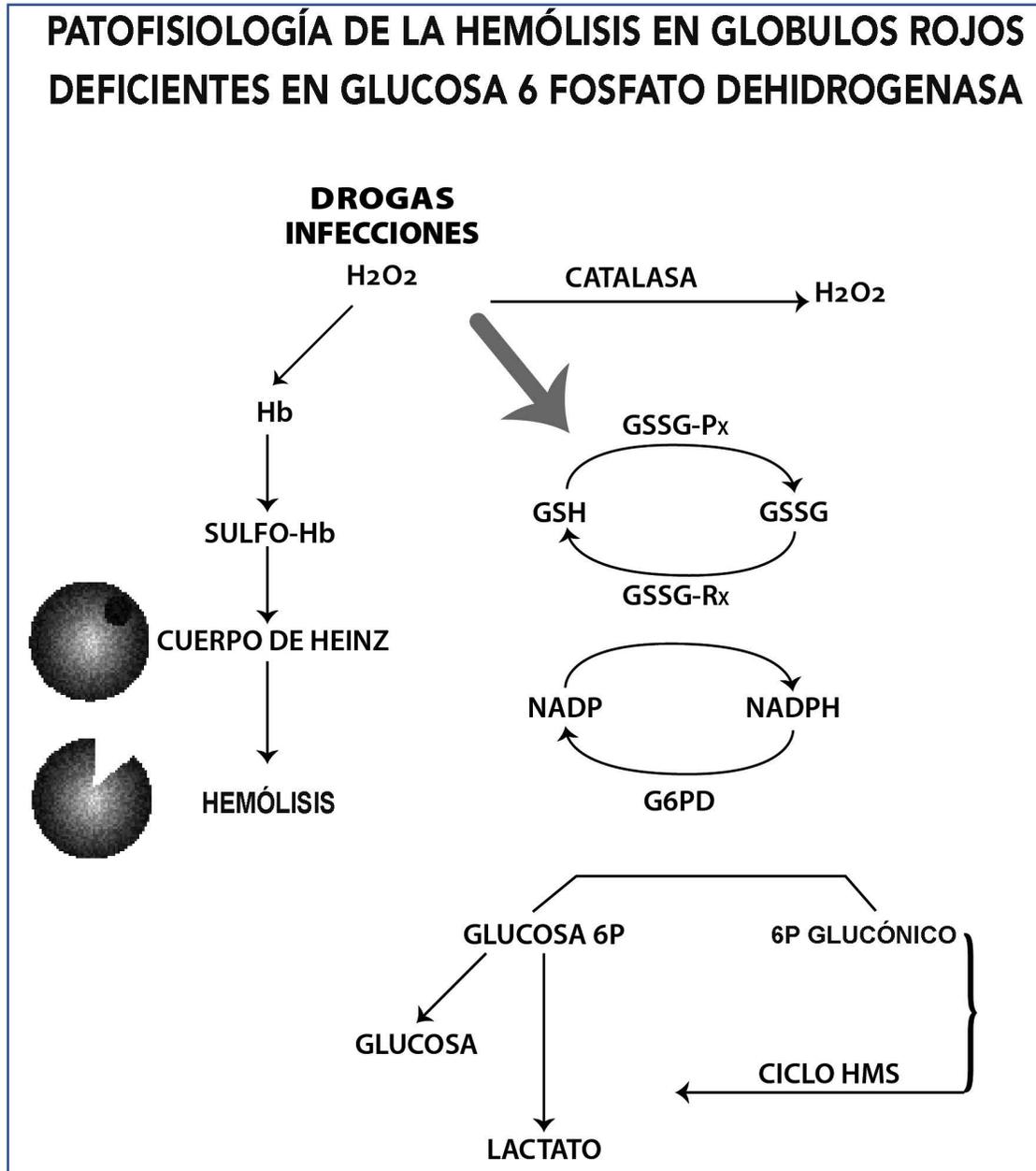
**TABLA N° II
DROGAS Y COMPUESTOS QUÍMICOS QUE INDUCEN HEMOLISIS
EN PACIENTES CON DEFICIENCIA
DE GLOCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA**

Acetanilida	Pentaquina
Azul de Metileno	Sulfanilamida
Ácido Nalidixico	Salfacetamida
Naftaleno	Sulfacetamida
Niridazole	Sulfapiridina
Nitrofurantoina (Furadantin)	Sulfametoxazole
Fenilhidrazina	Tiazole sulfona
Primaquina	Trinitrotolueno
Pamaquina	Azul de Toloidina

En ausencia de NADPH, el glutatión reducido no puede ser repuesto rápidamente, por lo cual los niveles tóxicos de peróxido de hidrógeno se acumulen intracelularmente oxidando y desnaturalizando la globina la cual precipita originando los llamados cuerpos de Heinz (6). La precipitación de la globina origina alteraciones en la membrana eritrocítica que se manifiesta por una disminución de su flexibilidad, lo cual

conduce a una destrucción acelerada de los eritrocitos a nivel del sistema fagocítico mononuclear (6,7) (ver Fig. N° 3).

FIGURA N° 3



El defecto primario en los casos de deficiencia de G6PD se encuentra en el gen estructural que codifica la secuencia de aminoácidos de la enzima, lo cual conduce a la

síntesis de una enzima cualitativa o cuantitativamente anormal. Las manifestaciones clínicas se observan por lo general sólo en sujetos en los cuales la actividad enzimática está disminuida por debajo del 25% del valor normal (8). Esta deficiencia afecta numerosos individuos en todo el mundo, con una frecuencia más elevada en países del Mediterráneo, África y China. Aproximadamente el 13% de la población negroide residente en los Estados Unidos es deficiente en G6PD (9). En Venezuela han sido reportados valores de 6% en la población de Barquisimeto (10) y de 2% en donantes voluntarios del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Caracas (11).

La actividad de esta enzima disminuye normalmente a medida que el eritrocito envejece, pero en individuos normales la actividad enzimática residual de los eritrocitos maduros es suficiente para proteger al eritrocito de diversos agentes oxidantes. En la población general, la enzima se presenta en 2 formas identificadas por su movilidad electroforética. La G6PD tipo A, de migración rápida, se encuentra con mayor frecuencia en poblaciones negroides, mientras que la G6PD tipo 3, de migración más lenta, se encuentra principalmente en poblaciones caucasoides (12, 13)

Mediante el estudio de la migración electroforética, de la actividad enzimática y de la estabilidad a diferentes temperaturas se han encontrado más de 150 variantes, las cuales han sido subdivididas en 5 clases (13) (ver Tabla N° IV).

TABLA N° IV
VARIANTES DE GLUCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA

- CLASE I:** Muy inestable. Actividad desaparece 5-10 días.
 Regularmente asociada con anemias hemolíticas no esferocítica (marcada sensibilidad al efecto inhibitorio de NADPH).
 Rápidas: St. Louis, East Harlem, San Diego, Chinase
 Normal: Chicago, Boston Duarte, Hawái
 Lentas: Hong Kong, Manchester, Frebing, Rotterdam.
 Actividad (% de lo normal): 0-40%
 Actividad más alta que en la clase II.
- CLASE II:** Actividad enzimática residual menor del 10%. No hay enfermedad hemolítica crónica.
 Rápida: San José, Lublín, Unión, Taiwan-Hakka, Taheran
 Normal: Mediterránea, Indonesia, Bagdad, Matam.
 Lentas: Intanon, Panay, Onada, Lilta
- CLASE III:** Deficiencia moderada a leve. Actividad residual 10-60% de lo normal. No hay enfermedad hemolítica crónica.
 Rápida: A-, Toronto, Ube, Castilla, Gallura.
 Normal: Columbus, Hofu.
 Lentas: Athens, Siwa, Washington, Alexandra.
- CLASE IV:** Mutaciones con actividad enzimática normal o actividad más leve.
 Rápida: A+, King Country
 Normal: B+, (normal).
 Lentas: Tacoma, Ballimore, Manfacase
- CLASE V:** Actividades enzimática aumentada
 Hektoen.

ANEMIA HEMOLÍTICA ASOCIADAS CON DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA (PQ)

La deficiencia de PQ representa el más frecuente de los defectos genéticos de las enzimas del ciclo glicolítico (14). Esta enzima cataliza la generación de ATP a partir del fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP, según la siguiente reacción:



El piruvato generado es posteriormente convertido en ácido láctico (4).

A consecuencia de la deficiencia de PQ, la generación de ATP es insuficiente para el mantenimiento de ciertas funciones vitales especialmente el mantenimiento de niveles adecuados de Na y K. Como resultado, se produce una pérdida marcada de K y agua, con la consiguiente deshidratación celular (15, 16). Esto explica las distorsiones corpusculares (eritrocitos espiculados o crenocitos) que se observan en estos casos, lo cual contribuye a una acelerada destrucción de estas células, especialmente en el bazo (17,18).

Esta deficiencia enzimática se hereda como un rasgo autosómico recesivo, de manera que sólo los individuos homocigotos para el defecto manifiestan la enfermedad clínica. Los heterocigotos generalmente presentan una actividad enzimática alrededor del 50% del valor normal, lo cual no se manifiesta clínicamente (14). En la población general, la PQ existe en 3 tipos diferentes o isozimas, de las cuales, al igual que con otras enzimas se han descrito algunas variantes que presentan características cinéticas anormales. Clínicamente la hemólisis asociada a la deficiencia de PK se presenta por lo general en forma crónica y con una severidad variable (de moderada a severa), la cual no necesariamente guarda relación directa con la magnitud de la deficiencia enzimática (19). Esto sugiere que otros factores intraeritrocíticos diferentes de los niveles enzimáticos otras alteraciones metabólicas o de membrana pueden contribuir a

la hemolisis. El proceso hemolítico puede ser agravado por infecciones o situaciones de stress (14).

ANEMIA HEMOLÍTICA ASOCIADA CON DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA (HQ)

La HQ es la enzima que inicia el ciclo glicolítico mediante la fosforilización de la glucosa convirtiéndola a glucosa 6 fosfato (4). Normalmente la actividad de esta enzima es mucho mayor en reticulocitos que en eritrocitos maduros (20). La deficiencia de esta enzima se hereda con carácter autosómico recesivo.

Los individuos heterocigotos para el defecto usualmente no presentan signos de hemolisis a pesar de que la actividad enzimática es de alrededor del 50% de lo normal (21).

Los individuos deficientes homocigotos padecen de una anemia hemolítica congénita no esferocítica, y habitualmente la actividad enzimática intraeritrocitaria de la hexoquinasa es ligeramente menor que la de los heterocigotos. Esto se debe probablemente que a los individuos homocigotos anémicos mantienen en su sangre una población de eritrocitos inmaduros los cuales presentan una actividad enzimática normal o elevada que enmascara la verdadera severidad de la deficiencia (21). Los síntomas de la anemia hemolítica asociada con deficiencia de HQ son particularmente severos de lo que se esperaría por el grado de anemia. Se ha sugerido que esto es debido a la disminución de los niveles 2, 3, DPG, otro de los metabolitos del ciclo glicolítico, lo cual hace que la hemoglobina adquiera mayor afinidad por el oxígeno, por lo cual éste es cedido a los tejidos más difícilmente (22).

En varios de los casos reportados, además de una reducción cuantitativa de la actividad enzimática se han descrito alteraciones cualitativas en la enzima, por ejemplo, reducción de la afinidad por sus sustratos glucosa y ATP (23).

ANEMIAS HEMOLITICAS ASOCIADAS CON DEFECTOS DE LA MEMBRANA ERITROCÍTICA

La membrana del eritrocito es una bicapa de lípidos y proteínas que contiene la hemoglobina y todas las enzimas que intervienen en el metabolismo eritrocitario. La hematología comparativa sugiere que sin membrana eritrocítica, la actividad del hombre no hubiese sobrepasado la etapa de lombriz de tierra (24). La secuestación celular permite a la hemoglobina aumentar su concentración y poder llenar las demandas del metabolismo mamario, además que provee un ambiente que protege a la hemoglobina del asalto oxidativo del medio extracelular, ya que para que la hemoglobina cumpla su función de transportar oxígeno debe de estar en estado reducido. La membrana celular debe ser lo suficiente flexible para atravesar los canales esplénicos que miden la mitad del diámetro eritrocítico y debe ser lo suficientemente fuerte y durable para resistir la turbulencia del pasaje cardíaco: el eritrocito atraviesa el corazón 500.000 veces y viaja 450.000 kilómetros durante su vida media de 120 días (25). Varias anomalías de la membrana del eritrocito están asociadas a anemias hemolíticas: Estomatocitosis, eliptocitosis u ovalocitosis, desicitosis y esferocitosis.

Aparte de la esferocitosis, las otras anomalías son bastante infrecuentes (26).

ESFEROCITOSIS HEREDITARIA:

Este es un desorden autosómico dominante caracterizado por la presencia de eritrocitos esferocíticos en sangre periférica. Los esferocitos son eritrocitos con un volumen corpuscular medio normal; pero con menor cantidad de superficie globular. Esto en parte se debe a que los esferocitos pierden lípidos de la membrana durante su vida (27). Aunque los esferocitos *in vitro* son susceptibles a lisis osmótica (esto es: liberación de hemoglobina cuando el eritrocito se hincha en soluciones salinas hipotónicas), éste no parece ser el mecanismo hemolítico importante *in vivo*, más bien, la membrana rígida de los esferocitos conduce a secuestro esplénico y hemólisis (28).

Las manifestaciones clínicas de la esferocitosis hereditaria incluyen hemólisis moderada con reticulocitosis, hiperbilirrubinemia y esplenomegalia marcada. Esta hemólisis es un proceso bien compensado con poco o nada de anemia. Hay historia de ictericia neonatal en el 50% de los casos.

El diagnóstico de esferocitosis es sospechado cuando hay evidencia de hemólisis y se encuentran esferocitos en el frotis de sangre periférica con Prueba de Coombs negativa. La curva de fragilidad osmótica incubada (24 horas a 37o C) indica que los eritrocitos son osmóticamente más frágiles.

El papel hemolítico importante del bazo en esferocitosis se manifiesta después de la esplenectomía por la disminución rápida de la bilirrubina y los reticulocitos. Los esferocitos persisten después de la esplenectomía, pero la supervivencia de ellos es normal una vez que el bazo ha sido removido (28).

ELIPTOCITOSIS HEREDITARIA:

Los individuos normales pueden tener hasta un 15% de eritrocitos elípticos u ovalados, pero los pacientes con este desorden autosómico dominante poseen un 25-75% de ovalocitos en su sangre periférica.

El 12% de los pacientes con ovalocitosis sufren de anemia hemolítica significativa. El mecanismo de la hemólisis es desconocido y no se han encontrado anomalías bioquímicas.

La eliptocitosis asociada con hemólisis tiene un curso clínico parecido al de la esferocitosis hereditaria (29).

ESTOMATOCITOSIS HEREDITARIA:

En este grupo infrecuente de desordenes, aparentemente transmitidos a través de un gen dominante, los eritrocitos en los frotis de sangre periférica muestran una palidez

central en forma de hendidura (estoma) por lo cual son denominados estomatocitos. Estos son eritrocitos hidratados (hidrocitos) con un aumento de la permeabilidad para el sodio. Dichos estomatocitos son susceptibles a lisis osmótica que conduciría a anemia hemolítica (30, 31).

ANEMIAS HEMOLITICAS PRODUCIDAS POR DEFECTOS EN LA PRODUCCIÓN DE LAS CADENAS DE GLOBINA

La molécula de hemoglobina (Hb) es una proteína compuesta de 4 cadenas polipeptídicas (2 cadenas alfa y 2 cadenas no alfa), y 4 grupos prostéticos (heme) que contienen el hierro en forma ferrosa. Los eritrocitos de un adulto normal contienen la mayor parte de la hemoglobina en una forma molecular (más del 90%), constituida por 2 cadenas alfa y 2 cadenas beta (Hb A1). El resto de la hemoglobina está presente en varias formas moleculares, entre las cuales destacan la Hb A2, 2.5% y la Hb Fetal, menos del 2%, la cual está constituida por 2 cadenas alfa y 2 cadenas delta.

Las cadenas polipeptídicas adquieren una configuración tridimensional que provee un bolsillo hidrofóbico, donde se acomoda el heme y permite que las 4 subunidades de globina interactúen entre sí. La interacción de 2 grupos heme de 2 cadenas diferentes de globina (alfa 2 beta 2), es de gran importancia fisiológica porque permite una transferencia de oxígeno considerable de la hemoglobina a los tejidos, cuando existe una pequeña caída de la tensión de oxígeno (unión cooperativa con el oxígeno). Esto hace que la curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina tenga forma sigmoidal (32).

DEFECTO DE LA ESTRUCTURA DE LAS CADENAS DE GLOBINA:

Estos se presentan cuando existen sustituciones de aminoácidos en las cadenas de globina. En la gran mayoría de los casos la sustitución ocurre en una sola de las cadenas.

Si el aminoácido sustituido altera la carga eléctrica neto de la molécula, el punto isoelectrico y la movilidad electroforética de la hemoglobina, la variante de hemoglobina diferirá de la HbA normal (2)

Estas mutaciones pueden además afectar la estabilidad y funcionalidad de la hemoglobina y dar origen a diferentes síndromes o entidades clínicas (hemoglobinopatía), los cuales pueden ser clasificados:

- 1) Drepanocitosis producida por hemoglobina y trastornos afines causados por otras hemoglobinas anormales, tales como la C, D, E, O, G, etc.;
- 2) Enfermedad de las hemoglobinas inestables;
- 3) Síndromes producidos por alteración de la afinidad de lo hemoglobina por el oxígeno.

1. DREPANOCITOSIS: En este síndrome la hemoglobina presenta sustitución de un ácido glutámico por una valina en lo posición seis de la cadena beta. (HbS). Este defecto estructural de la molécula de lo hemoglobina **S** se manifiesta como una disminución de la solubilidad de la hemoglobina y porque la hemoglobina **S** desoxigenada se polimeriza, se alarga en tactoides, que causan que el eritrocito cambie a la forma de hoz y aumente su viscosidad. Estas células drepanocíticas bloquean la red microvascular, aumentando la viscosidad sanguínea y reduciendo el flujo sanguíneo tisular. Esto conduce a una caída de la tensión de oxígeno y del pH lo cual favorece la formación de drepanocitos, formándose así un círculo vicioso (33).

La oclusión de vasos pequeños y capilares por los drepanocitos, causará micro y macroinfartos, los cuales pueden ocurrir en cualquier órgano y clínicamente originan

crisis dolorosas en los pacientes homocigotos (artritis), síndrome mano y pie en infantes (polidactilitis), necrosis aséptica de la cabeza del fémur, úlceras en las piernas (34).

La mayoría de las células drepanocíticas vuelven a su forma normal (disco bicóncavo) si son reoxigenadas. Algunos permanecen permanentemente en forma de hoz debido a alteraciones irreversibles de la membrana eritrocitaria. Tales eritrocitos cuando regresan a la circulación son rápidamente destruidos por las células fagocíticas del bazo y del hígado, dando origen a la anemia hemolítica de los drepanocíticos (33).

Los pacientes drepanocíticos homocigotos en líneas generales se caracterizan clínicamente por sufrir de anemia hemolítica (con crisis de hemólisis); crisis dolorosas; infecciones recurrentes, (quizás relacionadas a la autoesplenectomía secundaria a micro infartos del bazo), generalmente secundarias a neumococos, salmonella (osteomielitis); anemia megaloblástica y crisis hipoplástica como en cualquier anemia hemolítica secundaria a déficit de folatos (34). Los individuos heterocigotos generalmente presentan valores hematológicos normales en sangre periférica.

2. HEMOGLOBINAS INESTABLES: Las hemoglobinas anormales con una sustitución de aminoácidos en la región de contacto del heme, tienden a unirse al oxígeno de manera anormal, autooxidando la hemoglobina a methahemoglobina (Fe ferroso se oxida a férrico que no transporta oxígeno), más rápidamente que la hemoglobina A1, despegándose el heme de las cadenas de globina y precipitando éstas dentro del glóbulo rojo como cuerpos de Heinz originándose las llamadas hemoglobinas inestables.

Estas hemoglobinas causan hemólisis en sujetos heterocigotos. El estado homocigótico es probablemente letal. Los cuerpos de Heinz que resultan de la precipitación de la globina, distorsionan y hacen rígida la membrana celular y el eritrocito es atrapado por las células fagocíticas del bazo y el hígado. Las inclusiones de los cuerpos de Heinz,

pueden ser removidos del eritrocito o el eritrocito completo puede ser fagocitado. Clínicamente se caracterizan porque el paciente presenta una hemólisis crónica relativamente compensada: anemia discreta, ictericia y hepatoesplenomegalia. Las drogas oxidantes pueden precipitar las crisis hemolíticas en algunos casos (35).

3) HEMOGLOBINAS CON ALTERACIONES EN LA AFINIDAD POR EL

OXIGENO: Existen otro grupo de variantes de hemoglobinas en las cuales la afinidad por el oxígeno es anormal (aumentada o disminuida) y de éstas se conocen ejemplos clínicos sólo en estado de heterocidad, tales como la Hb Chesapeake, J. Capetown, Yakima, Kempsey y Seattle. La sustitución de aminoácidos ocurre en lo región de contacto de las cadenas de globina alfa y beta o en la terminal C de la cadena beta. (36)

DEFECTOS DE LA SINTESIS DE LAS CADENAS DE GLOBINA

Los Síndromes Talasémicos: Son un grupo de desórdenes en los cuales existe una disminución en lo síntesis de las cadenas beta (talasemia beta) o de las cadenas alfa (talasemia alfa), las cuales son estructuralmente normales. Las talasemias alfa o beta pueden ocurrir en forma heterocigótica (taras) u homocigota (sufren la enfermedad en forma severa) (37).

La tara talasémica beta comprende cuatro grupos principales:

1. Individuos con aumento de la hemoglobina A2 y aumento discreto de la HbF.
2. Individuos con niveles normales de HbA2 y elevados de HbF (la llamada delta-beta-talasemia).
3. Individuos con niveles normales de HbA2 y HbF (portador silente).
4. Individuos con HbA2 normal, niveles de HbF elevados y 10-15 % de una Hb anormal con movilidad de Hb S (Hb Lepore).

La tara talasémica alfa se caracteriza por una reducción moderada de la producción de cadenas alfa sin elevación de los niveles de HbA2 o F (portador silente) (38).

Las talasemias beta se caracterizan porque la producción deficiente de cadenas beta conduce a una disminución en la cantidad de hemoglobina por célula y por lo tanto anemia hipocrómica. Aunque la síntesis de cadenas beta está disminuida, la síntesis de cadenas alfa continúa, no hay cadenas beta con quien unirse, por lo cual hay acumulación intra eritrocítica de las cadenas alfas libres, las cuales precipitan sobre la membrana en forma de cuerpos de inclusión (cuerpos de Heinz). Esto está asociado con aumento de la permeabilidad de la membrana del eritrocito (que contiene los cuerpos de Heinz) para los cationes con secuestro eritrocitario y remoción de los cuerpos de inclusión por el sistema fagocítico, lo cual originará hemólisis e ictericia (39). Los heterocigotos beta y alfa sufren de una anemia discreta hipocrómica (glóbulos rojos pálidos por disminución de la síntesis de hemoglobina) y microcítica (glóbulos rojos disminuidos de tamaño) (40).

Los homocigotos para la talasemia beta sufren de anemia severa hipocrómica hemolítica con normoblastemia, cuerpos de inclusión dentro de los normoblastos medulares, eritropoyesis inefectiva con expansión medular masiva, retardo de crecimiento, acumulación de hierro en diversos órganos, hiperuricemia, hepatoesplenomegalia, susceptibilidad aumentada a las infecciones y muerte temprana debido a insuficiencias cardíacas (41).

En los casos de talasemia alfa homocigótica puede observarse una disminución extrema de la producción de cadenas alfa y formación de Hb con 4 cadenas beta (HbH) con hipocromía y hemólisis por precipitación de los tetrómeros B4 sobre la membrana. O puede resultar en producción exclusiva de cadenas gamma, las cuales se combinan en tetrómeros gamma (hemoglobina de Bart), que carece del efecto de Bohr de la hemoglobina normal, no cede su oxígeno a los tejidos y el infante muere de asfixia tisular (42,43).

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 190 pacientes con sospecho de anemia hemolítica y 60 familiares de dichos pacientes, referidos al Centro de Hematología y Quimioterapia Oncológica para estudio de la etiología de la anemia, durante el período 1979-1981. Se utilizaron 200 muestras de sangre proveniente de donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Caracas y del Centro de Hematología y Quimioterapia Oncológica para estandarizar las técnicas especiales que permiten detectar una hemoglobinopatía o una enzimopatía.

Para determinar la incidencia en la población general de la deficiencia de G6PD y PQ y detectar las variantes electroforéticas de G6PO se estudiaron muestras de sangre de individuos aparentemente normales provenientes de diferentes regiones de Venezuela, durante el periodo 1969-1972.

Dichas muestras provenían de:

- 54 donantes de sangre de Caracas;
- 29 donantes de sangre de San Cristóbal;
- 32 habitantes de Pregonero (Táchira);
- 102 habitantes de Adícora (Falcón);
- 169 habitantes de Tapipa (Miranda);
- 100 indígenas Yanomamas;
- 100 indígenas Waraos,
- 148 muestras de sangre de cordón de niños nacidos en la Maternidad Concepción Palacios de Caracas y
- 10 muestras de sangre de cordón de niños naturales de San Cristóbal (Táchira).

HISTORIA CLÍNICA PRACTICADA A PACIENTES CON AMÉMIA HEMOLÍTICA

A cada uno de los pacientes con sospecha de anemia hemolítica le fue practicado un interrogatorio exhaustivo con el fin de determinar posibles antecedentes familiares, factores desencadenantes y evolución de la enfermedad que permitieran un diagnóstico adecuado. Un examen físico completo acompañada de los exámenes de laboratorio permitió evaluar el estado actual de la enfermedad y a su vez descartar cualquier otro proceso sobre agregado.

ESTUDIOS DE LABORATORIO PRACTICADOS A LA SANGRE DE LOS PACIENTES CON ANEMIA

1. Hemoglobina, hematocrito, contaje rojo, índices globulares, contaje blanco, diferenciales y contaje plaquetarios fueron realizados en el analizador automático de la Casa Technicon.
2. Contaje de reticulocitos y prueba de inducción de drepanocitos (44).
3. Perfil Químico: Hierro sérico, proteínas totales, calcio, fósforo, colesterol, glucosa, ácido úrico, bilirrubina total, fosfatasas alcalinas, dehidrogenasa láctica, transaminasas, nitrógeno ureico, creatinina, fueron realizados en el analizador automático de la Casa Technicon (SMII).
4. Prueba de Coombs directa e indirecta (amplio espectro, anti C3 y C4).
5. Estudio de hemoglobinopatías (perfil para detectar hemoglobinopatías).

El perfil para detectar hemoglobinopatías fue realizado con hemolizados de los eritrocitos de los pacientes con sospecha de hemolisis, los familiares y los donantes de sangre que sirvieron de controles.

Dichos hemolizados fueron preparados en tetracloruro de carbono y se le practicaron las siguientes determinaciones:

- a) Electroforesis de Hb en membranas de acetato de celulosa Gelman y corridas en cámaras microzonales Beckman, usando Buffer -tris-borato-EDTA pH8 (45).
- b) Electroforesis de Hb en agar citrato a pH6, en agar fosfato a pH 7.1 y en agar tris EDTA-borata a pH 7.1 (46).
- c) Cuantificación de la HbA2:
 - 1) Aislada por electroforesis en acetato de celulosa (Celagram, Shandon Scientific, London) en cámaras modelo U77 Deluxe. Gelman (47).
 - 2) Aislada por cromatografía usando columnas de sephadex de intercambio de aniones de la Casa Helena, según la técnica de Bernini (48).
- d) Cuantificación de la Hb Fetal:
 - 1) Por inmunodifusión usando placas con Hb anti F de los laboratorios Helena;
 - 2) Por el método de la desnaturalización alcalina (49).
- e) Prueba de inestabilidad de la hemoglobina al alcohol isopropílico. (50).
- f) Prueba de la elución ácida de la Hb fetal (51).
- g) Curva de disociación de oxígeno y cálculo del P 50 en el Hemoscan aminco.
- h) Electroenfoco de hemoglobina en capa fina en geles de poliacrilamida (52).
- i) Prueba de Ham (53).
- j) Síntesis de cadenas de globina (54).
- k) Estudio de los eritrocitos en el microscopio electrónico de barrido Jeol-100.
- l) Determinación del porcentaje de metahemoglobina y curva espectrofotométrica de la hemoglobina y metahemoglobina (55).

6. Estudio de enzimopatías (Perfil para detectar eritroenzimopatías).

Los eritrocitos provenientes de los pacientes con sospecha de anemia hemolítica, familiares y donantes de sangre que sirvieron como controles fueron aislados de sangre fresca usando columnas de celulosa + sigmagel y hemolizados (8). A dichos hemolizados se le practicaron las siguientes determinaciones:

- a) Pruebas pantallas para detectar deficiencias de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa, piruvato quinasa, glutatión reductasa, triosa fosfato isomerasa, glucosa fosfato isomerasa, NADH metahemoglobina reductasa. (8).
- b) Cuantificación de las enzimas del ciclo de la hexosa mono fosfato (HMP), glucosa 6 fosfato dehidrogenasa. 6 fosfoglucosa dehidrogenasa, glutatión reductasa.
- c) Cuantificación de las enzimas del ciclo glicolítico: hexoquinasa, glucosa fosfato isomerasa, gliceraldehido fosfato dehidrogenasa, fosfogliceroquinasa, difosfogliceromutasa, monofosfogliceromutasa, enolasa, piruvatoquinasa, dehidrogenasa láctico (8).
- d) Determinación de 2.3 difosfoglicerato (2.3 DPG), ATP y lactato (8,56)
- e) Cuantificación de las enzimas NADH metahemoglobina reductasa y NADPH metahemoglobina reductasa (8).
- f) Determinaciones de Km, estabilidad al calor, curva de pH óptima, electroforesis en gel de almidón, usando hemolizado crudo o enzima parcialmente purificada. (57).

También se practicaron: curva de fragilidad globular en fresco e incubada (58), sobrevida globular con cromo 51 (59).

RESULTADOS

DIAGNÓSTICO FISIOPATOLÓGICO EN PACIENTES CON SOSPECHA DE ANEMIA HEMOLÍTICA

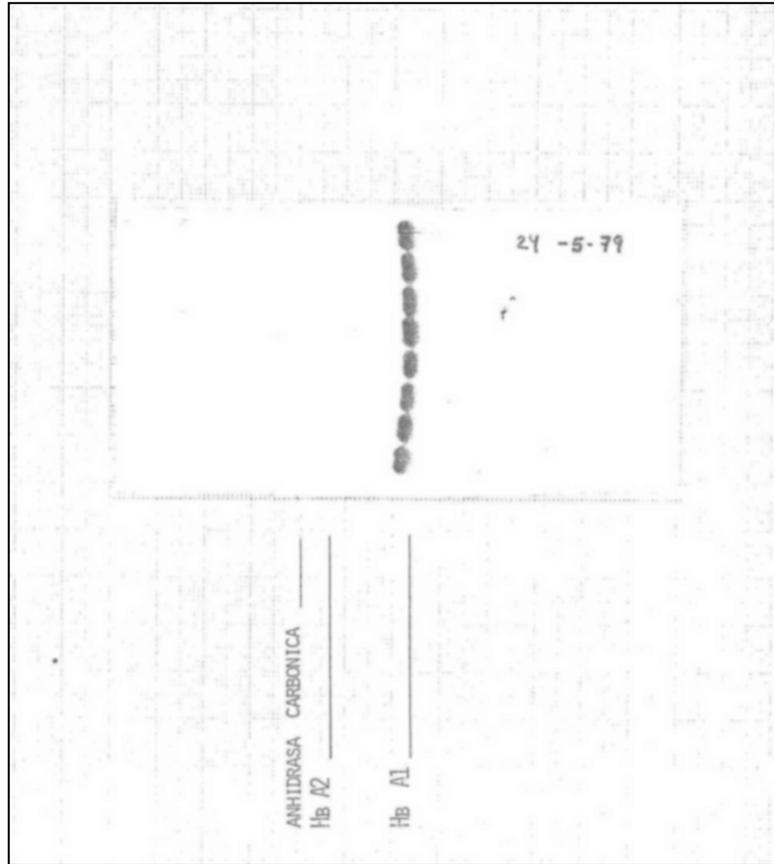
Con el objeto de obtener los valores normales en donantes de sangre venezolanos, los cuales servirán de referencia para el estudio subsiguiente. Se estandarizaron una serie de técnicos especiales (enumerados en la Sección de Materiales y Métodos). En esta forma se establecieron valores normales para la presión parcial de oxígeno (P50), al cual la hemoglobina se halla saturada en un 50%, hemoglobina A2, hemoglobina fetal, metahemoglobina, etc. (Tabla N° V).

TABLA N° V
VALORES NORMALES DE LOS MÉTODOS ESPECIALES UTILIZADOS
PARA DIAGNOSTICAR UNA MEMOGLOBINA

		TECNICA	N° DE DONANTES DE SANGRE	VALORES NORMALES (porcentaje)
1.	Hb A2	a) Evolución de las tiras de acetato de celulosa	86	1.94 ± 2.14
		b) Cromatografía en microcolumnas de DEAE celulosa	25	2.19 - 3.13
2.	Hb Fetal	a) Por inmunodifusión radial	20	0.6 ± 0.43
		b) Por desnaturalización alcalina de Betke	32	0.1 - 1.14
3.		Determinación de los niveles de meta Hb	25	0.2 - 1.2
4.		Curva de disociación de oxígeno (P50 mmHg)	40	Sigmoidal 25.5 - 27.5

La electroforesis de hemoglobina de los donantes de sangre usados como controles mostró 3 bandas que migraron en dirección anódica de la siguiente manera: una banda menor de anhidrasa carbónica, una banda menor de hemoglobina A2, y una banda principal anódica de hemoglobina A1 (Fig. N° 4).

FIGURA N° 4
ELECTROFORESIS DE HB A EN ACETATO DE CELULOSA A pH 8.6



El electroenfoque de hemoglobina mostró mayor número de bandas que la electroforesis. En dirección anódica migraron las siguientes bandas: hemoglobina A2, metahemoglobina, dos bandas intermedias de metahemoglobina, y una de hemoglobina fetal; una banda principal de hemoglobina A1, y otras dos bandas anódicas menores de hemoglobina A1 C y hemoglobina A 3.

La banda de hemoglobina A3 se observó solamente en muestras de hemoglobina conservada varios días a 4 °C. Las bandas de metahemoglobina desaparecieron al añadir KCN al hemolizado (Fig. N° 5). Igualmente se establecieron los valores normales de las actividades bioquímicas de diversas enzimas eritrocitarias necesarias para mantener la integridad funcional y estructural de los eritrocitos (Tabla N° VI).

Los niveles intraeritrocíticos de 2.3 DPG de los controles fueron de 4 ± 1 micromol/ml eritrocitos y de ATP de 0.6-1.2 micromoles ATP/g Hb.

FIGURA No 5

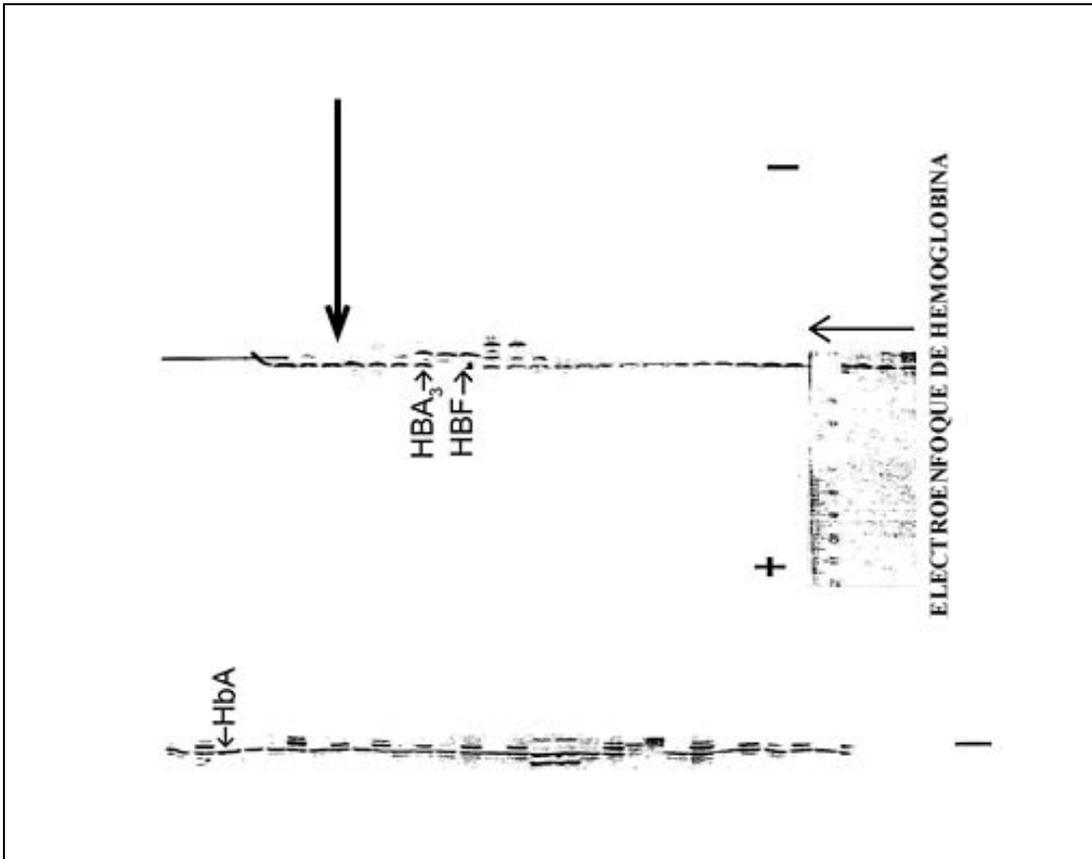


TABLA N° VI
VALORES NORMALES DE LAS DIFERENTES ENZIMAS
INTRAERITROCITICAS EN ADULTOS VENEZOLANOS

ENZIMA	N° ESTUDIADO	VALORES NORMALES UI/G HB
Hexoquinasa	37	0.9 ± 0.19
Glucosa fosfato isomerasa	34	40. ± 7.0
Fosfofructosa quinasa	34	3.7 ± 1.56
Aldolasa	25	1.71 ± 0.40
Triosa fosfato isomerasa	-	-
Difosfoglicero mutasa	17	4.42 ± 0.89
Monofosfolicero mutasa	12	14.74 ± 4.2
Enolasa	24	2.65 ± 0.86
Piruvato quinasa	129	1 ± 0.2
LDH	21	27.8 ± 9.38
Glucosa 6 fosfato dehidrogenasa	73	8.86 ± 1.69
6 Fosfogluconico dehidrogenasa	20	5.45 ± 0.85
Glutation reductasa: sin FAD	15	3.15 ± 0.74
con FAD	15	5 ± 1.42
NADH meta Hb reductasa	12	1.24 ± 0.37
PGK	35	263.6 ± 44.8

De 190 pacientes estudiados por sospecho de anemia hemolítica (Tabla N° VII) se encontró que 34 de ellos (28%) presentaron deficiencias enzimáticas, siendo la más frecuente la deficiencia de Glucosa o Fosfato Dehidrogenasa (14.74%). Se detectaron 3 pacientes deficientes en piruvato quinasa (1.55%), dos deficientes en glutacion reductasa (1.05%) y una paciente deficiente en NADH metahemoglobina reductasa, (éste último no aparece incluido en la Tabla N° VI porque dicha deficiencia en lugar de producir anemia, produce cianosis).

TABLA VII
DIAGNOSTICO FISIOPATOLÓGICO REALIZADO
EN 190 PACIENTES CON ANEMIA

CLASIFICACIÓN DE LA ANEMIA	Nº DE PACIENTES	%
I. RESPUESTA MEDULAR INADECUADA		
A) MEDULA OSEA INTRINSECAMENTE ANORMAL		
1) Anemias aplásticas congénitas		
1. Selectivos de Serie Roja		
a. Blackfan Diamond	1	0.53
b. Diseritropoyética	1	0.53
2. Pancitopenia congénita		
a. Anemia de Fanconi	1	0.53
2. Preleucemia		
II. RESPUESTA MEDULAR ADECUADA		
1. ANEMIAS HEMOLITICAS CONGENITAS		
a) Defectos de la membrana del glóbulo rojo		
1. Esferocitosis hereditaria	9	4.73
2. Eliptocitosis hereditaria	1	0.53
3. Estomatocitosis hereditaria	1	0.53
b) Deficiencias de las enzimas del ciclo glicolítico		
1. Piruvato quinasa	3	1.58
2. Hexoquinasa	1	0.53
c) Deficiencia de las enzimas de la hexosa monofosfato		
1. Glucosa 6 fosfato dehidrogenasa	28	14.74
2. Glutation reductora	1	1.05

d) Defectos en la estructura y síntesis de la globulina		
1. Enfermedad de las hemoglobinas insolubles	3	1.58
2. Drepanocitosis homocigótica (HbSS)	40	21.05
Heterocigótica (HbSA)	41	21.58
3. Otras Hemoglobinopatías	5	2.63
4. Talasemia		
a) Menor	26	13.68
b) Delta-beta	1	0.53
c) Intermedia	1	0.53
5. Desórdenes heterocigotos dobles		
a) Enfermedades por hemoglobina SC	7	3.68
b) Persistencia hereditaria de HbF + HbS	1	0.53

2. ANEMIAS HEMOLITICAS ADQUIRIDAS

1. Anemias hemolíticas autoinmune debido a anticuerpos IgG		
a) Idiopáticos	5	2.63
b) Secundarios	2	1.05
2. Hemoglobina Nocturna Paroxística	2	1.05
3. Anemia Hemolítica de causa no precisada	7	3.68

TOTAL: PACIENTES CON ANEMIA	190	100%
------------------------------------	------------	-------------

Se estudiaron 88 pacientes con hemoglobinopatías (46.1%), de los cuales 40 presentaron drepanocitosis homocigótica, 41 taras drepanocíticas, 5 hemoglobinopatías tipo AC y 3 pacientes eran portadores de hemoglobinas inestables.

Se detectaron 29 pacientes con talasemias (15.26%), de los cuales 26 eran portadores de la forma menor, un paciente presentaba una talasemia tipo delta-beta y otros dos pacientes presentaban talasemia tipo intermedio. También se encontraron 8 pacientes portadores de desórdenes heterocigotos dobles: 7 de ellos sufrían de enfermedad por

hemoglobina SC y un paciente con persistencia hereditaria de HbF y HbS. Además, se estudiaron 11 pacientes (5.79%), con defectos de la membrana eritrocítica, de las cuales 9 presentaban esferocitosis congénita; un paciente presentó ovalocitosis y otro de ellas una estomatocitosis. El resto de los pacientes presentaron otros tipos de anemia, destacándose por ser de frecuencia muy baja, 3 tipos de anemias aplásicas congénitas, a saber: Anemia de Blackfan Diamond, Anemia secundaria, Síndrome de Fanconi y Anemia Diseritropoyética.

DEFICIENCIA DE GLUCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA

Se detectaron 27 pacientes deficientes en glucosa 6 fosfato dehidrogenasa (Tabla N° VII), 11 de ellos fueron estudiados por ictericia neonatal; 5 tenían antecedentes de crisis hemolítica severas por ingestión de drogas oxidantes (sulfas, acetofenetidina); 2 de los pacientes habían presentado hemólisis después de ingestión de habas; un paciente presentó anemia hemolítica después de una infección de los vías respiratorias (bronquiolitis) y 7 pacientes fueron encontrados al realizar los perfiles especiales para el estudio de anemia de causa no precisadas. Un caso fue encontrado casualmente entre los donantes que se usan habitualmente como controles normales.

En ausencia de crisis hemolíticas, estos pacientes se caracterizaron por estar asintomáticos y por presentar un examen físico normal, excepto un paciente de 6 años, el cual presentó un polo esplénico palpable.

Los valores hematológicos en la mayoría de pacientes que no presentaban crisis hemolíticas, fueron normales para su edad, excepto en aquellos donde se encontraron deficiencias nutricionales asociadas secundarias a falta de ingesta de nutrientes o diarrea crónica. Se puede observar en la Tabla N° VIII que el paciente de 19 meses de edad presentó niveles bajos de Hb y Hto sin reticulocitosis, con índices globulares notablemente disminuidos: el VCM fue de 64 u^3 (VN=80-90 u^3), y la HCM fue de 15.8 pg VN= $30,5 \pm 3 \text{ pg}$ y la CHCH fue de 24.8% NV= $34.8 \pm 2.2 \%$.

El frotis de este paciente presentó una hipocromía y microcitosis marcada con poiquilocitosis y anisocitosis moderada con presencia de escasos dianocitos y células en lágrimas. El perfil químico practicado en este paciente evidenció un hierro sérico muy disminuido 12 mcg%. (VN 35-130 mcg%). El cuadro hematológico de este paciente mostró que había una deficiencia de hierro asociado o la deficiencia de la glucosa 6 fosfato dehidrogenosa.

En general los pacientes deficientes de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa fuera de crisis presentaron la curva de fragilidad globular en fresco, normal o ligeramente desviado o la izquierda; pero inmediatamente después de la crisis hemolítica, la curva de fragilidad globular estuvo moderadamente desviada o la izquierda. Esto dependió del grado de esferocitosis presente en sangre periférica, a mayor número de esferocitos, mayor era lo desviación de la curva de fragilidad globular incubada (Fig. N^{os} 6,7,8).

FIGURA N° 6
CURVA DE FRAGILIDAD GLOBULAR EN FRESCO /
CURVA DE FRAGILIDAD GLOBULAR INCUBADA. PACIENTE (FA)

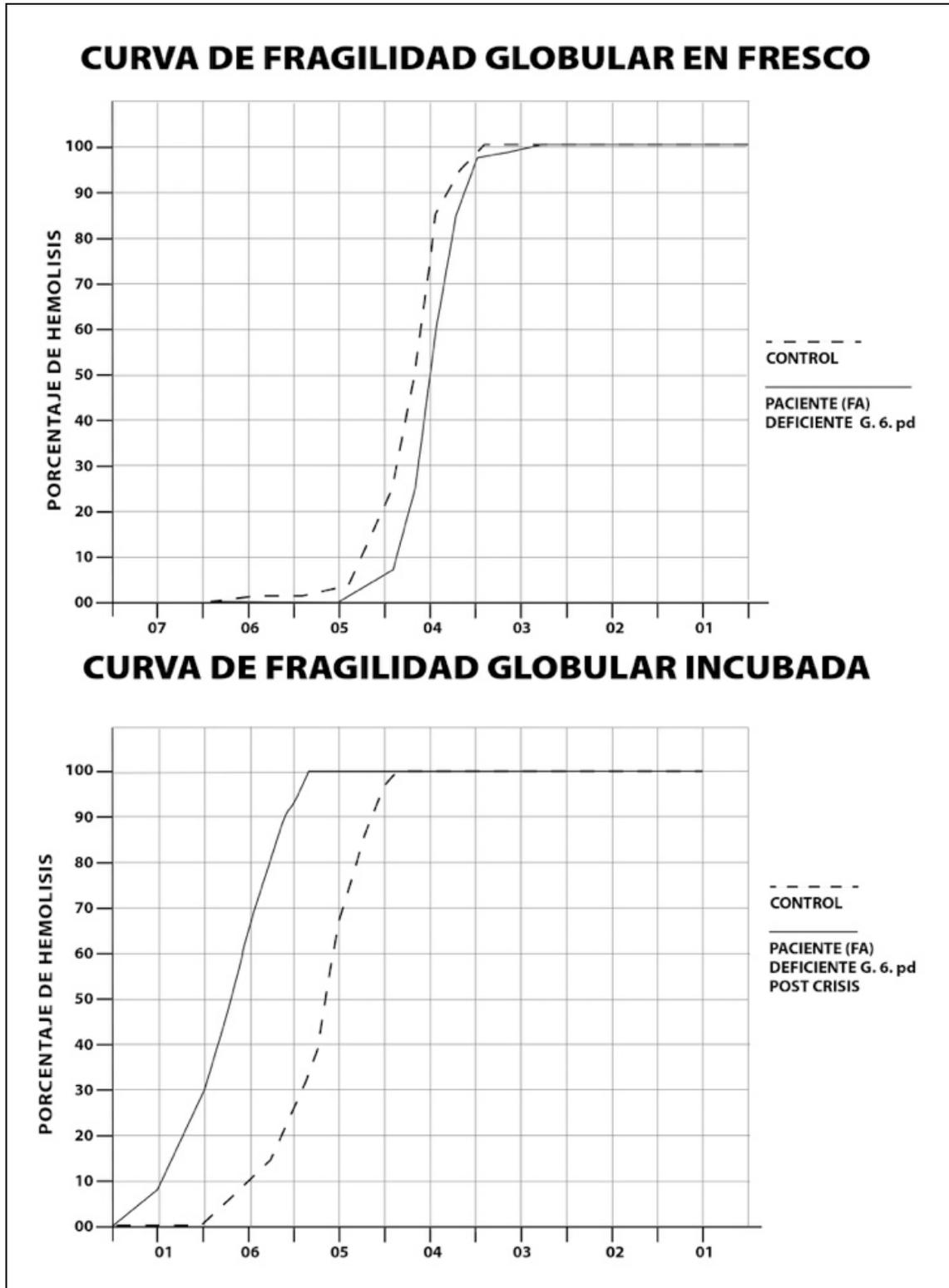


FIGURA N° 7
CURVA DE FRAGILIDAD GLOBULAR EN FRESCO /
CURVA DE FRAGILIDAD GLOBULAR INCUBADA. PACIENTE (RC)

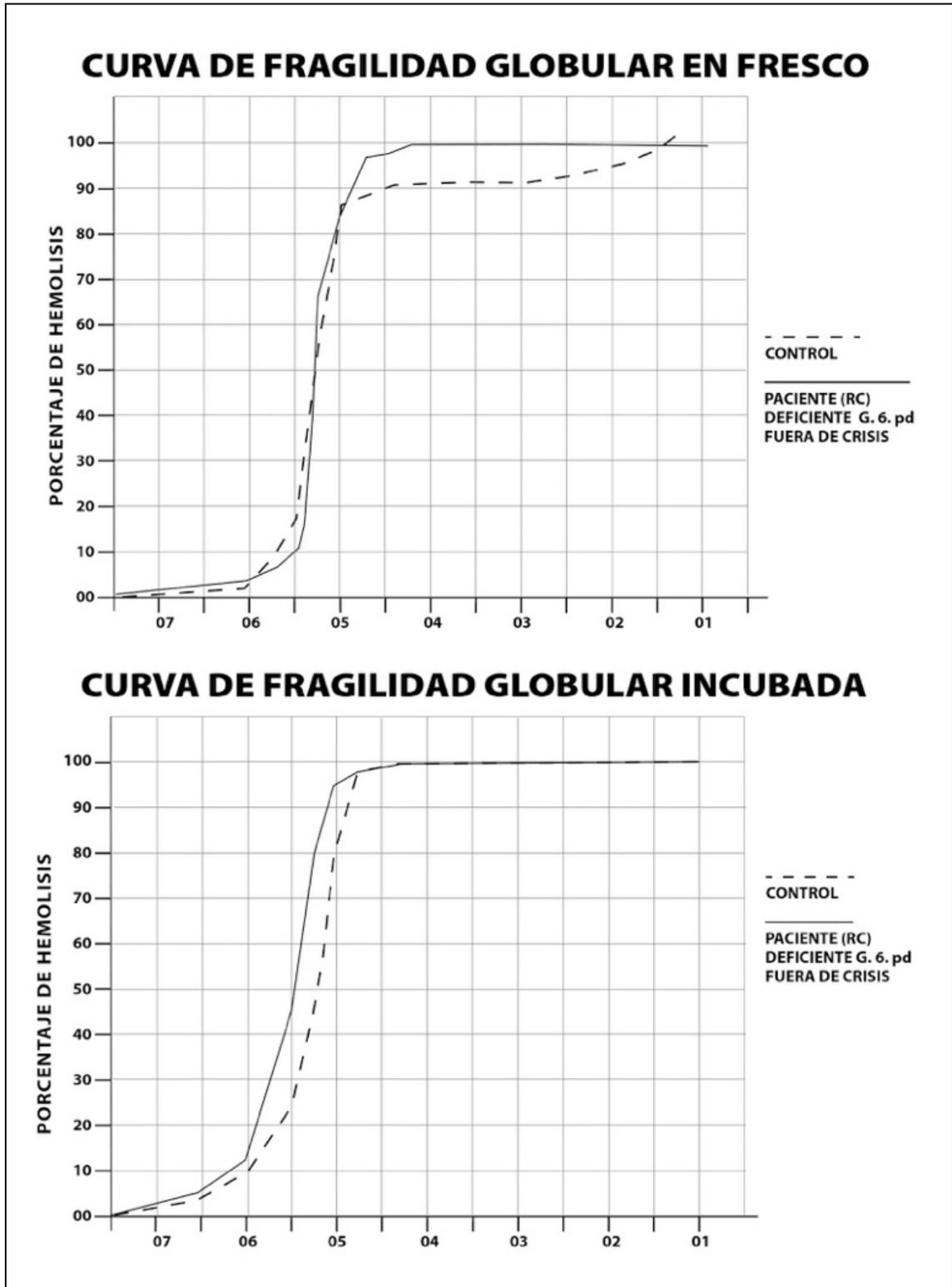
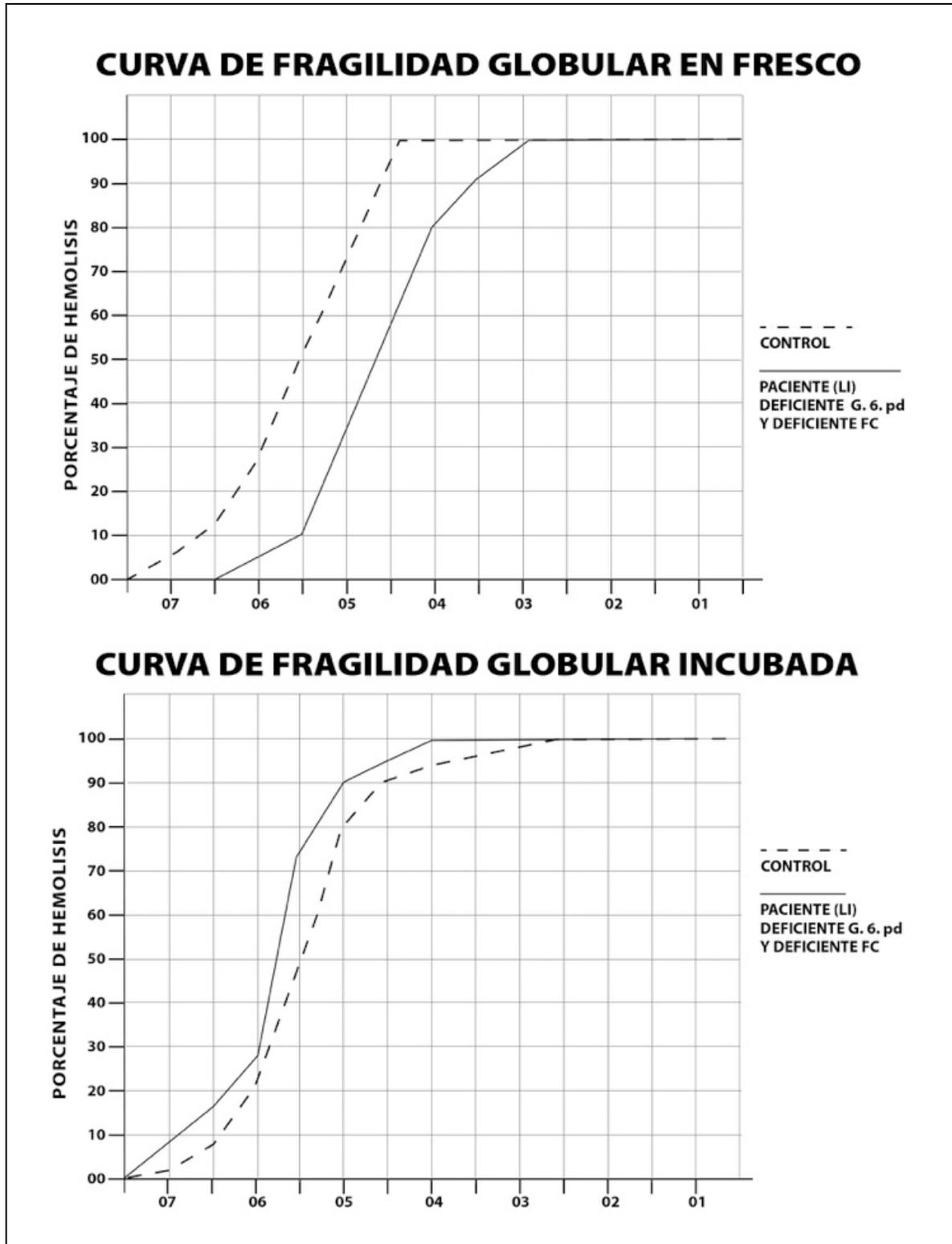


FIGURA N° 8
CURVA DE FRAGILIDAD GLOBULAR EN FRESCO /
CURVA DE FRAGILIDAD GLOBULAR INCUBADA. PACIENTE (LI)



Estos pacientes que como se mencionó anteriormente estuvieron asintomáticos fuera de crisis, comenzaron a presentar síntomas de debilidad acompañados de palidez progresiva 24 horas después de haber ingerido drogas oxidantes o haberse expuesto a ellas (sprays sobre la piel) o haber comido habas y generalmente consultaron al 4º o 5º día después de haber comenzado su sintomatología, por agravamiento de la misma y la presencia de coluria.

En la Tabla VIII A y B puede observarse que durante las crisis hemolíticas la hemoglobina y el hematocrito cayeron desde valores normales hasta 4 g% y el Hto. cayó a 15% respectivamente; con reticulocitosis y presencia de normoblastos y Cuerpos de Heinz en sangre periférica. (Fig. No 9 y 10).

TABLA N° VIII-A
VALORES HEMATOLOGICOS Y BIOQUIMICOS EN PACIENTES Y FAMILIARES DEFICIENTES
EN GLUCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA

DF			30	33	0.6	4 x 10 ⁶				85	0.45		
FAMILIA	SUJETO	EDAD	HB 9%	Hto. %	RETIC.	CONTAJE ROJO X ₃ 10 ⁶ /mm	VCM m ³	HCM Pg.	CHCM %	FE Mg. %	Bill Total mg. %	FOSFATA- SA ALCALI U/Lt.	LDHU/LC
JCR	PROPOSITO	3 meses	11.2	38	0.6	4.59	82	24.4	29.8				
	Madre	20 años	41.6	41.6	1.8	4.84	86	25.0	29.1		0.8	101	91
	Padre	19 años	15.4	48	0.4	5.87	81	26.3	32.4				
JK	PROPOSITO	4 meses	10.2	34.6	0.2	3.9	85	27.2	30.6	61	0.6	62	425
	Madre		14.7	41.0	0.5	4.84	92	30.5	33.3				
	Padre		18.3	52.1	0.5	5.78	90	31.7	35.2				
	Hermano			50.2	0.3	5.36	94	32.0	34.2				
L.I.	PROPOSITO	19 meses	7.2	29.2	0.9	4.58	64	15.8	24.8	12	0.3	123	296
	Madre		12.5	40.4	0.4	5.04	80	24.8	30.9				
	Padre		44.3	44.3	0.5	5.14	86	28.8	33.4				
	Hermana		12.9	41.1	2.8	5.4	77	23.9	31.3				
CR	PROPOSITO	2 años	11.2	36	1.8	5.00	72	22.4	31.1	115	0.8	59	140
JGP	PROPOSITO	6 años	13.3	39.7				33.5	36.3				
	Hermano		12.9	40.2	1	2.38	92	29.4	32.1				
C.B.	PROPOSITO	26 años	12.2	39	1.5	-	-	-	-	98	0.5	119	278
DF			30	33	0.6	4 x 10 ⁶				85	0.45		
C.A.R	PROPOSITO	31 años	12.6	41.9	1	4.15	101	30.3	30.0	107	1	112	174

TABLA N° VIII-B
VALORES HEMATOLOGICOS Y BIOQUIMICOS DURANTE Y FUERA DE CRISIS HEMOLITICA
EN ALGUNOS PACIENTES DEFICIENTES EN G-6-PD

PACIENTE	EDAD (años)	Hb 9%	Hto. %	RETICULOCITOS %	NORMOBLASTOS %	VCM micras ³	HCM Pg	CHCM %	BT mg%	BI mg%	CONTAJE BLANCO/mm ³
CAR (1)	31	12.6	41.9	1.1	0	101	30.3	30	1	0.2	5.300
* (2)	31	6.2	18	20.0	20%	-	-	-	8.4	7.0	12.500
CB (1)	26	12.2	39	1.5	0				0.5		
* (2)	26	4.6	15								15.050
J.GP (1)	6	13.3	39.7	1.0	0	86.5	33.5	36.3			
* (2)	6	10.6	30.0	9.3							6.600
FA (1)	3	12.3	39	1.2	0						6.400
* (2)	3	5.5	17	5.5	0						

(1) Durante crisis hemolítica

(2) Fuera de crisis hemolítica

FIGURA N° 9
CUERPOS DE HEINZ VISTOS AL MICROSCOPIO DE LUZ

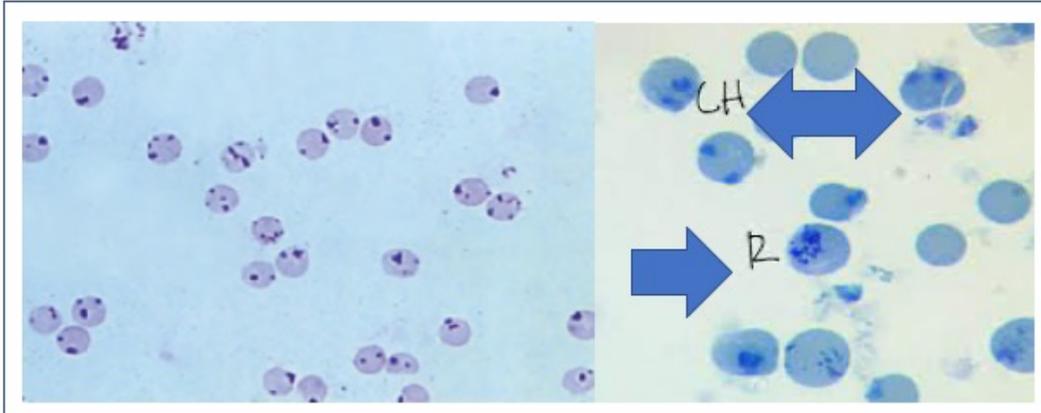
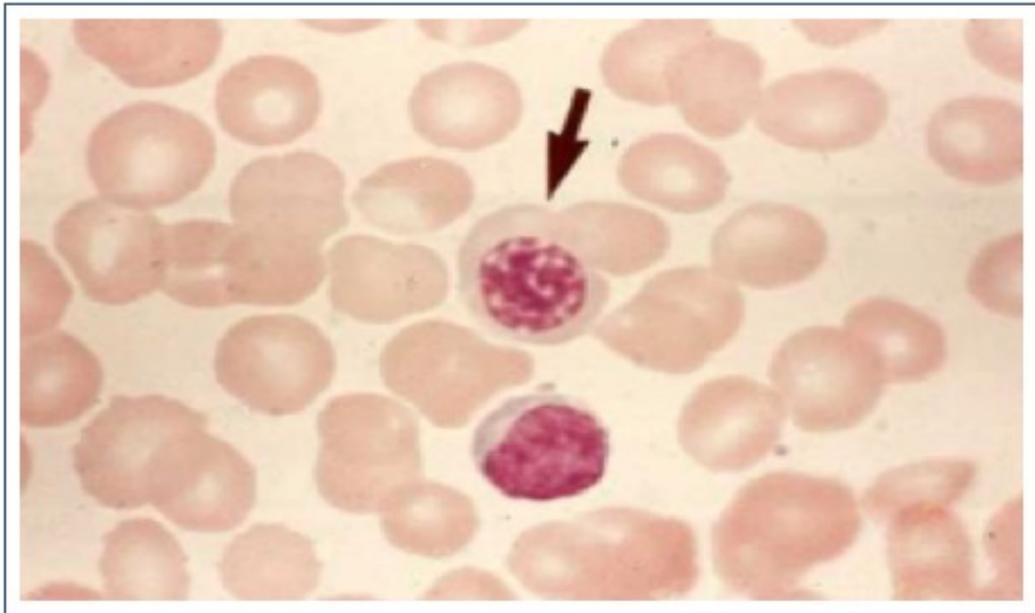
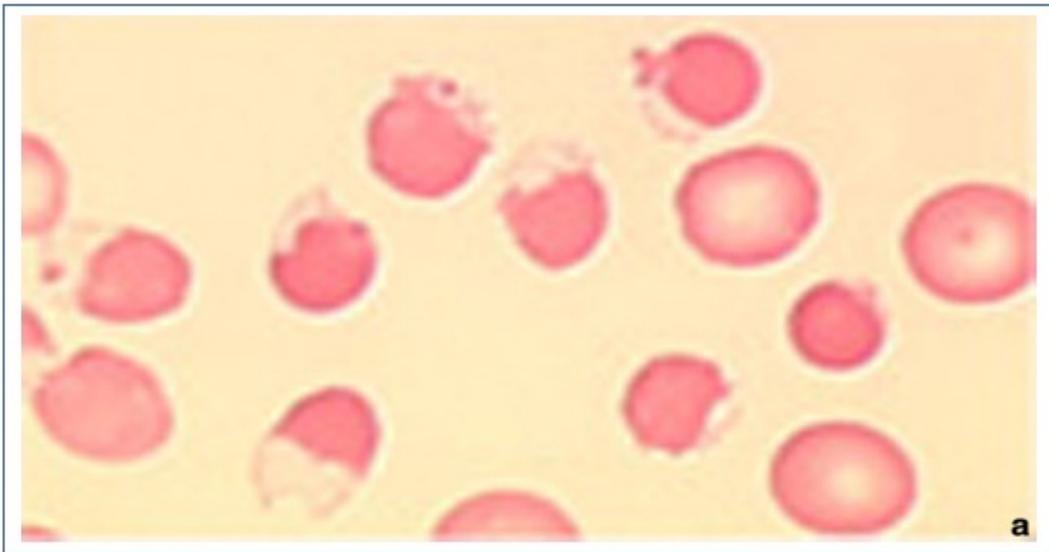


FIGURA 10
SANGRE DE DEFICIENTE EN G-6-PD CON NORMOBLASTO
POSTCRISIS HEMOLÍTICA
(SEÑALADO CON FLECHA)



Durante las crisis el frotis de sangre periférica presentó eritrocitos deshidratados (con hemoglobina polarizada a un extremo del eritrocito) y esquistocitosis con ligera esferocitosis. (Fig.Nº 11).

FIGURA Nº 11
FROTIS DE SANGRE DE PACIENTE DEFICIENTE
EN G6PD DURANTE CRISIS HEMOLÍTICA.
SE APRECIAN ERITROCITOS DESHIDRATADOS CON LA
HEMOGLOBINA POLARIZADA HACIA UN EXTREMO



Dos de los pacientes con ictericia neonatal requirieron exosanguinotransfusión por hiperbilirrubinemia marcada mayor 20 mg% en la primera semana del periodo neonatal y otros dos recién nacidos que requirieron fototerapia. El resto de los pacientes con ictericia neonatal no requirieron tratamiento.

Los padres de los pacientes presentaron valores hematológicos normales (Tabla Nº VIII-B).

Los pacientes hemicigotos deficientes en glucosa 6 fosfato dehidrogenosa presentaron la prueba pantalla de Beutler para detectar deficiencias de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa francamente anormal (Fig. N° 12), y los niveles intraeritrocíticos de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa muy disminuidos. Tabla N° IX).

FIGURA N° 12
SE APRECIA QUE LA SANGRE DEL CONTROL MUESTRA
FLUORESCENCIA A LOS 5 MIN MIENTRAS QUE LA DEL PACIENTE
DEFICIENTE EN G6PD NO FLUORECE

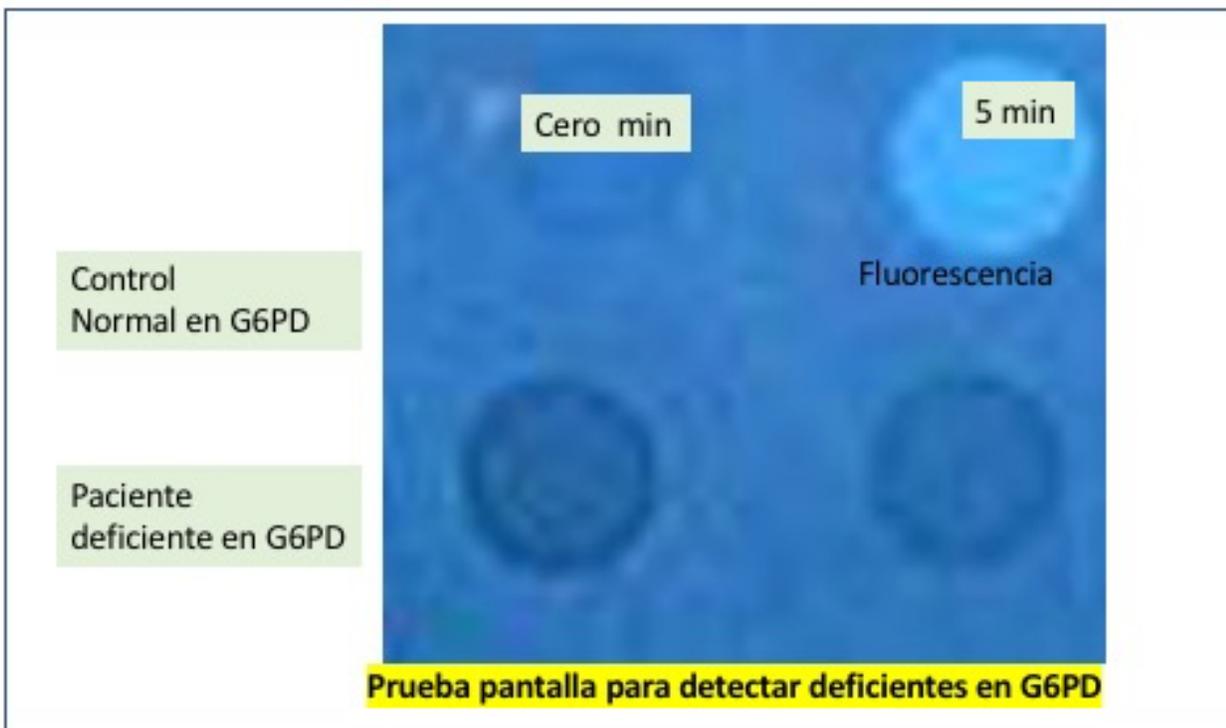


TABLA N° IX
NIVELES DE G-6-PD INTRAERITROCITOS
EN PACIENTE Y FAMILIARES

FAMILIA	SUJETO	RELACIÓN CON EL PROPÓSITO	G-6-PD % DE LA MEDIA NORMAL
1	DM	Propósito	46%
	MM	Madre	74%
	JM	Hermana	100%
	VM	Hermana	60%
	RM	Hermana	64%
	JM	Hermana	63%
	IM	Hermano	100%
2	RR	Propósito	40%
	MR	Madre	50%
	AR	Hermana	100%
3	AM	Propósito	43%
	GM	Madre	100%
	FM	Padre	100%
	FM	Hermano	54%
	FM	Hermano	100%
4	MM	Propósito	54%
	MN	Madre	47%
	MA	Hermana	60%
5	DCG	Propósito	32%
6	JB	Propósito	21.5%
	IB	Madre	42%
7	AB	Propósito	3%
	AB	Hermano	6%
	AB	Madre	32%
	AB	Padre	100%
8	MM	Propósito	0%
9	AS	Propósito	46%
10	JR	Propósito	30%
11	GR	Propósito	0%
		Madre	60%
		Padre	100%
	FB	Propósito	0%

12		Madre Hermano Padre	Normal X Normal Normal
13	LI	Propósito Madre Padre Hermana	13% 54% 100% 36%
14	KB	Propósito Madre Padre	9% 46% 100%
15	JGR	Propósito Madre Padre	0% 60% 100%
16	CR	Propósito Madre Padre	4.6% 53% 200%
17	CAR	Propósito	0%
18	AGG	Propósito Madre Padre	0% 31% 100%
19	MIP*	Propósito	42%
20	JGP	Propósito Hermano	0% 0%
21	DF*	Propósito	60%
22	AF	Propósito	0%
23	JM	Propósito Hermano	0% 0%
24	JER	Propósito Madre Hermana Hermana	6% 78% 100% 65%
25	AG*	Propósito	36%
26	TAC*	Propósito	40%
27	FA	Propósito Madre Padre	20% 100% 51%

* Propósitos Femeninos

Mientras que los pacientes heterocigotos para tal deficiencia mostraron una prueba pantalla de Beutler para detectar deficiencias de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa normal y sólo pudimos detectar el defecto cuando procedimos a cuantificar los niveles de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa intraeritrocíticos, cuyo resultado fue disminución moderada en estos pacientes.

GENÉTICA DE LA GLUCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA

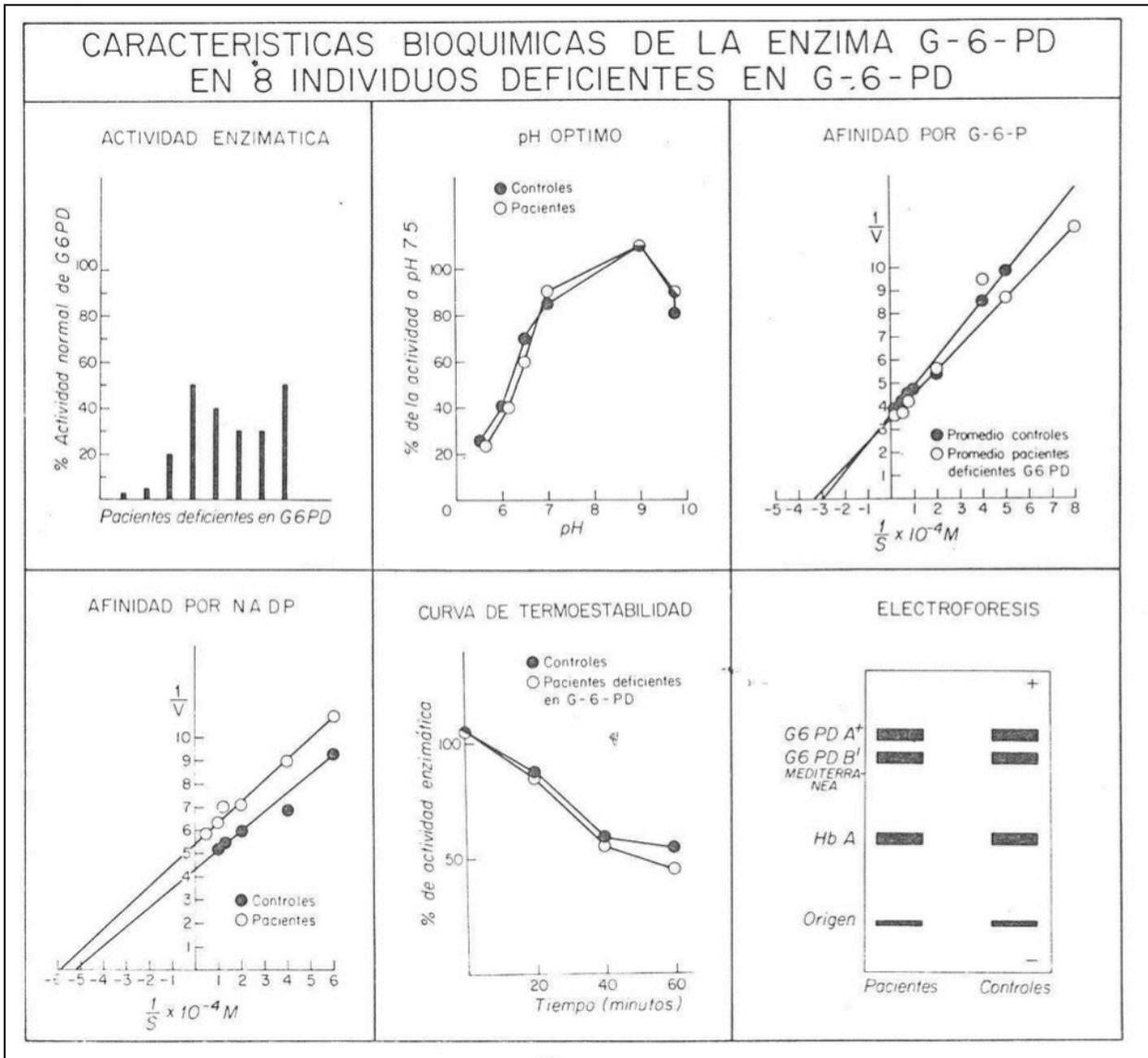
El estudio de 35 familiares de los 27 pacientes reveló que casi todas las madres de los pacientes estudiados presentaron niveles disminuidos de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa intraeritrocítica compatible con el estado de heterocigocidad para la deficiencia. Una de las madres MM (de la familia N° 1) presentó niveles muy bajos como los que vemos en los hemocigotos para la deficiencia de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa y otras de las madres GM (de la familia N° 3) presentaron niveles de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa intraeritrocíticos dentro del rango de valores normales para adultos. (Tabla N° IX).

Todos los padres de los propósitos de este estudio presentaron niveles intraeritrocíticos de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa normales. Algunos hermanos de los propósitos presentaron niveles de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa intermedios compatibles con el estado de heterocigocidad y otros hermanos tuvieron niveles muy bajos compatibles con el estado de homocigocidad.

CINÉTICAS DE LA GLUCOSA 6 FOSFATO DEHIDROGENASA

Las propiedades cinéticas de la enzima residual de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa de 8 pacientes homocigotos y 8 donantes de sangre (Fig. N° 13), se determinaron en hemolizado crudo.

FIGURA 13



El pH óptimo tanto de la glucosa 6 fosfato dehidrogenasa intraeritrocítica de los donantes de sangre como de los pacientes fue de 9. Se encontró que la enzima glucosa 6 fosfato dehidrogenasa obtenida de los hemolizados de los pacientes mostraba los K_m para sus sustratos G6P y NADP en el rango de valores normales encontrados para la enzima glucosa 6 fosfato dehidrogenasa de adultos sanos.

La curva de termoestabilidad realizadas con el hemolizado crudo de los pacientes, mostraron que la enzima glucosa 6 fosfato dehidrogenasa contenida en los mismos era termoestable en los mismos era termoestable en todos los casos.

Con respecto a la electroforesis de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa de los ocho pacientes estudiados se encontraron 2 variedades electroforéticas de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa: La variante A y la variante B. La variante A migraba por delante de la variante B a pH 8.6 en Buffer Tris-EDTA Borato. Cuando los niveles de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa intraeritrocíticos estaban casi en cero, que dificultaba el estudio cinético, entonces se procedió a purificar dicha enzima.

DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA

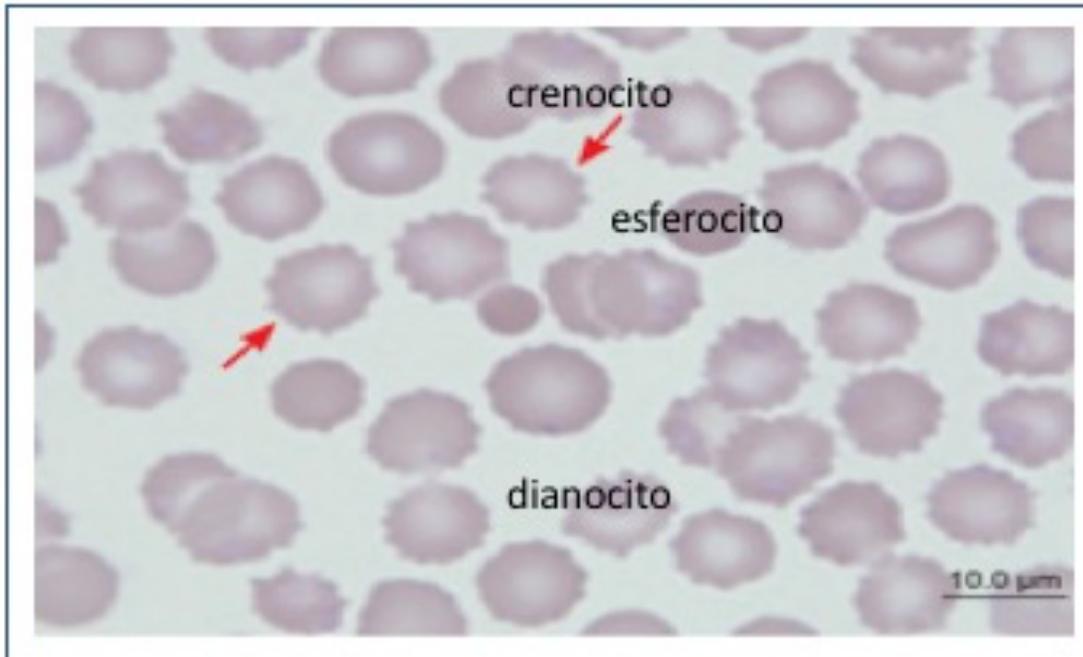
CASOS N^{os} 1 y 2: Un paciente masculino (FC) de 47 años de edad, natural del Estado Táchira fue referido por presentar desde su infancia ictericia congénita y anemia moderada crónica. El paciente había sido esplenectomizado a los 32 años. El examen físico reveló que el paciente presentaba ictericia moderada, palidez moderada de piel y mucosas y cicatrices residuales de úlceras en las caras internas del tercio inferior de ambas piernas (pretibiales). No se encontró hepatomegalia. El estudio hematológico de la sangre periférica mostró una anemia hemolítica moderada: Hb = 9.3g %, Hto = 33.1% con reticulocitosis del 25% y volumen corpuscular media aumentado de 129 micros cúbicas (Tabla N^o X). El frotis de sangre mostró policromasia 3+, crenocitosis 2+, dianocitosis 2+, esquistocitosis 1+, microcítosis :+, poíquilocitosis 2+, esferocitosis +, microcítosis + cuerpos de Howell Jolly (Fig. N^o 14). El perfil químico practicado mostró una bilirrubina total elevada a expensas de la indirecto (Tabla N^o X).

TABLA N° X
VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS PACIENTES
DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA

PRUEBAS REALIZADAS	PACIENTES (FC)	PACIENTES (LC)
1. Contaje blanco X10 ³ /mm ³	10.4	8.5
2. Contaje rojos X10 ⁶ /mm ³	2.58	2.3
3. Contaje plaquetas X10 ³ /mm ³	479	645
4. Hb g %	9.3	8.1
5. Hto %	33.1	29.6
6. VCM micras ³	129	129
7. HCM pg	36.2	35.1
8. CHCM %	28.2	27.4
9.. Reticulocitos %	25.2	17.4
10. Coomb directo e indirecto	neg.	neg.
11. Pruebas pantalla para detectar deficiencias enzimáticas: a) G6PD glucosa 6 fosfato dehidrogenasa b) TPI Triosa fosfato isomerasa c) GPI Glucosa fosfato isomerasa d) PK Piruvatoquinasa e) GR Glutación reductasa f) NADH DIAFORASA	Normal Normal Normal Anormal Normal Normal	Normal Normal Normal Anormal Normal Normal
12. Curva fragilidad globular	Anormal: desviación izquierda	Anormal: desviación izquierda
13. Cuantificación de niveles intraeritrocíticos de las enzimas: a) Del ciclo glicolítico 1- 1-Hx 2- GPI 3- PFK 4- Aldolasa 5- GAPD 6- PGK 7- DPGM 8- MPMG	1.1 47 5 1.7 - 264 4.6 14.7	1.2 48 4.9 2.2 - 265 4.6 14

9- Enolasa	2.6	2.7
10- PQ	0.7	0.7
11- LDH	35	40
b) Hexosa Monofosfato:		
1. Glucosa 6 fosfato dehidrogenasa	12	14
2. 6 Fosfogluco dehidrogenasa	5	5.1
3. Glutation reductasa SIN FAD	3.1	3.0
CON FAD	5	6
14. Curva Disociación de O ₂ P50 mmHg	-	-
15. Electroforesis	AA	AA
16. Electroenfoque Hb	AA	AA
17. Cuantificación Hb A2	2.2 %	2%
18. Cuerpos de Heinz	Negativo	Negativo
19. P. Inestabilidad de la Hb	Normal	Normal
20. Curvas Espectrofotométricas		
a) De OXI Hb	Normal	Normal
b) META Hb	Normal	Normal
21. FE SERICO Mg %	118	100
22. Bilirrubina total	4.2	3.8
Bilirrubina indirecta	3.5	3.0
23. Fosfatasas alcalinas U/Lt	98	90
24. LDH U/Lt	157	50
25. SGOT U/Lt	26	30

FIGURA N° 14
FROTIS DE SANGRE DE PACIENTE DEFICIENTE EN PIRUVATO
QUINASA MOSTRANDO ABUNDANTES CRENOCITOS, DIANOCITO,
ESFEROCITOS



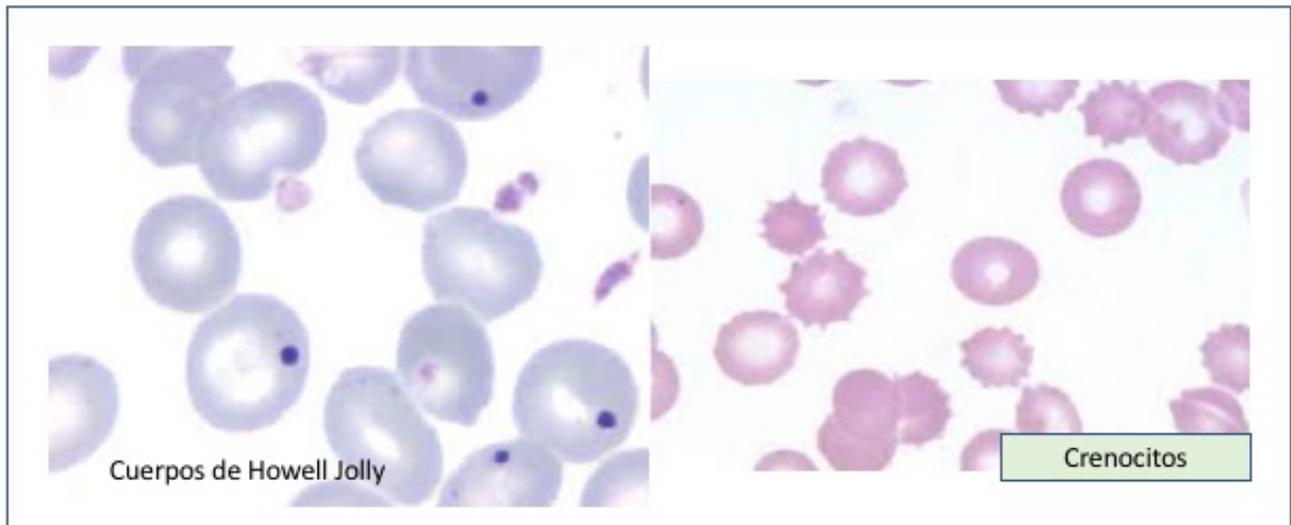
La prueba de Coombs directa e indirecta fueron negativas. La electroforesis y electroenfoque de hemoglobinas fueron normales, detectándose la hemoglobina AA del adulto normal. Los niveles de las hemoglobinas A2 y fetal fueron normales. La prueba de inestabilidad de la hemoglobina fue negativa. Las pruebas pantallas y cuantificación de las enzimas de los ciclos glicolíticos y hexosa monofosfato fueron normales excepto las correspondientes a la piruvato quinasa que indicaban una deficiencia parcial de la misma.

La única hermana (LC) del paciente anterior consultó por presentar un cuadro clínico similar. También había sido esplenectomizada hacía 15 años. El examen físico reveló una paciente de mediana edad con sobrepeso, ictericia conjuntiva y palidez moderada

de piel y mucosas sin hepatomegalia. Ella presentaba cicatrices de úlceras previas en miembros inferiores, también pretibiales

El estudio de la sangre periférica de esta paciente mostró una anemia hemolítica moderada con Hb = 8.1 g%, Hto = 29,6% reticulocitosis del 17.4%, un volumen corpuscular medio aumentado a 129 micras cúbicas (Tabla X): El frotis de sangre periférica mostró poiquilocitosis 2+, con presencia de crenocitos 2+, esquistocitos 1+, dianocitos, células en lagrima 1+, normoblastos, cuerpos de Howell Jolly +, policromasía +, esferocitos + (Fig.Nº 15). El perfil químico practicado mostró heperbilirrubinemia a expensas de la indirecta. El perfil para detectar hemoglobinopatías fue normal y el perfil para detectar eritroenzimopatías reveló una deficiencia de piruvato quinasa, con una prueba pantalla de Beutler para detectar este tipo de deficiencia francamente anormal y valores de PQ intraeritrocíticos disminuidos.

FIGURA 15
FROTIS DE SANGRE DEL PACIENTE DEFICIENTE EN
PIRUVATOQUINASA MOSTRANDO CUERPOS DE HOWELL JOLLY Y
ABUNDANTES CRENOCITOS

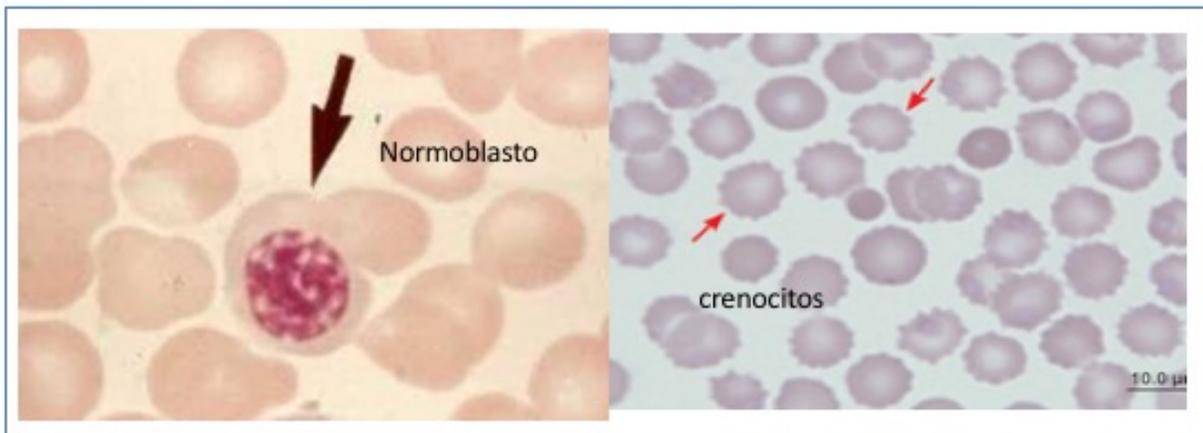


Aunque los valores íntraeritrocíticos de piruvato quinasa de ambos hermanos podrían clasificarse como heterocigotos, el cuadro clínico orienta hacia un edo. de homocidad para dicha deficiencia.

Los padres de dichos pacientes habían muerto y no existen otros familiares.

CASO N° 3: Se recibió una muestra de sangre fresca proveniente de una paciente de 15 años de edad, natural de Cumaná, Edo. Sucre con diagnóstico de anemia hemolítica congénita y antecedente de esplenectomía. El estudio hematológico practicado mostró Hb = 7-gr % Hematocritos; 26%, conteje de reticulocitos: 15%; VCM = 112 micras cúbicas (m3), HCM = 29.6 p.g., CHCM = - 30% = El frotis de sangre periférica presentaba poiquilocitosis 3+, esferocitos 3+, normoblastos 20%, esquistocitos 2+, cuerpos de Heinz, cuerpos de Howell Jolly. (Fig . N° 16).

FIGURA N° 16
FROTIS DE SANGRE DE LA PACIENTE DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA (EH) MOSTRANDO NORMOBLASTO (EHY CRENOCITOS



El perfil para detectar hemoglobinopatías fue normal y el perfil para detectar eritroenzimopatías reveló una deficiencia de piruvato quinasa evidenciada por una prueba pantalla de Beutler para detectar deficiencia de dicha enzima francamente anormal y unos niveles intraeritrocíticos de piruvato quinasa de cero.

ESTUDIOS POBLACIONALES INCIDENCIA DE LA DEFICIENCIA DE GLUCOSA-6- FOSFATO DEHIDROGENASA Y LA PIRUVATO QUINASA

En este estudio se encontró que tanto el gen mutante para la deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, como el gen mutante para lo deficiencia de piruvato quinasa están presentes en Venezuela (Tabla N° XI). Dichos genes están presentes en individuos de las poblaciones mestizas de Caracas y San Cristóbal (Estado Táchira) y en la población negroide de Tapipa (Estado Miranda). Dichos genes pueden detectarse tempranamente en sangre de cordón.

TABLA XI
DEFICIENCIA DE G-6-PD Y PQ
EN DIFERENTES POBLACIONES VENEZOLANAS

POBLACIONES	NUMERO ESTUDIADO	% DEFICIENTE G-6-PD	NUMERO ESTUDIADO	% DEFICIENTE PQ
Donantes Caracas	54	5.6	21	0
Donantes San Cristóbal	29	3.4	10	0
Habitantes de Pregonero Edo. Táchira	32	0	32	0
Habitantes Adicora Edo. Falcón	102	0	102	0
Habitante de Tapipa Edo. Miranda	169	11.83	131	0.76
Recién nacidos Caracas MCP	148	2.0	136	2.9
Recién nacidos San Cristóbal	10	0	10	-
Indígenas Yanomamas	100	0	100	0
Waraos	100	0	100	0

Los genes mutantes para las deficiencias de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa y piruvato quinasa estuvieron ausentes en los poblados indígenas venezolanos estudiados, tales como los Waraos y Yanomamas.

La incidencia de la deficiencia de G6PD varió de acuerdo a las poblaciones estudiadas, siendo mucho más alta en la población negroide de Tapipa (11.8%) que, en las poblaciones mestizas, en las cuales dicha frecuencia varió del 2-5,6%. Los individuos de Tapipa estudiados, no tuvieron antecedentes de hemolisis moderada o severa al interrogatorio.

En este trabajo se practicaron electroforesis de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa en gel de almidón a los individuos pobladores de Tapipa (Tabla No XII) y a los indígenas Waraos y Yanomamas. En la población de Tapipa se encontraron las siguientes variantes electroforéticas de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa: Normal (B+); rápidas (A+) y (A-); la (AB).

TABLA XII
VARIANTES ELECTROFORETICAS DE GLUCOSA 6 FOSFATO
DEHIDROGENASA EN 96 HABITANTES DE TAPIPA

VARIANTES	%
NORMAL (B+)	74
MEDITERRANEA (B-)	0
RAPIDA (A+)	5
RAPIDA (A-)	8,7
AB +	10.1
AB -	2.2

La mayoría de los individuos (74%) presentaron la variante de G-6-PD de movilidad electroforética normal (B+) y el 8.7% de los individuos presentaron la variante de

G6PD rápida A (-) y el 5% la variante rápida (A-). Los indígenas Waraos y Yanomamas se caracterizaron por presentar solamente lo variante normal (B+) de glucosa -6-fosfato dehidrogenasa.

La incidencia de la deficiencia de piruvato quinasa fue de 2.9% en los recién nacidos de Caracas y del 9.76% en la población de Tapipa. (Tabla N° XI).

DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA

ANEMIA HEMOLITICA CRONICA ASOCIADAS A VARIANTE DE HEXOQUINASA

I.-ANAMNESIS

Se trata de uno paciente de 24 años de edad, natural de San Casimiro, Estado Aragua, quien fue referido por anemia hemolítica de larga evolución. La paciente refería ictericia y anemia desde su infancia, no relacionadas con ingestión de drogas. La paciente tiene una hermana con diagnostico de litiasis biliar, un hermano asintomático y 2 sobrinas con historia de ictericia neonatal.

El examen físico fue normal excepto por ictericia conjuntival grado II.

II.-EXAMENES DE LABORATORIO

A) HEMATOLOGIA:

Contaje rojo: 3.54×10^6 gl. rojos/mm³

Hb: 11 gr %

Hto: 32.1 %

VCM: 87 mu.

HCM: 30.9 pg.

CHCM: 35.7 %

Reticulocitos: 6.8 % (VN: 0.1 -0.5%)

Contaje blanco y plaquetario: normales

Frotis de sangre periférica mostró:

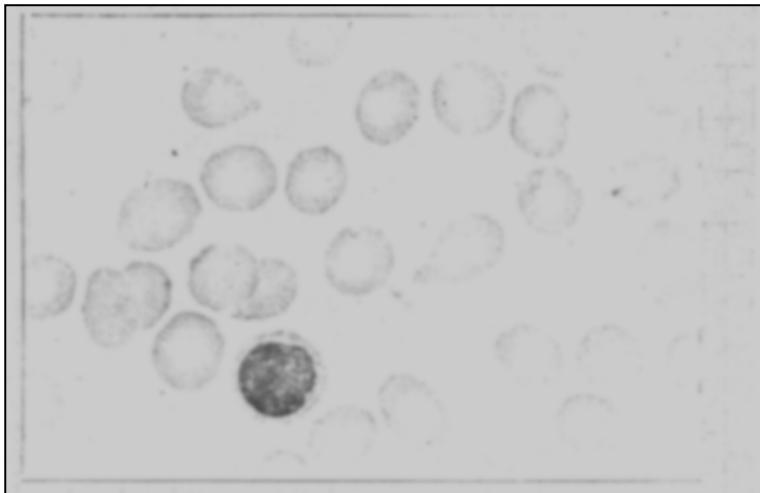
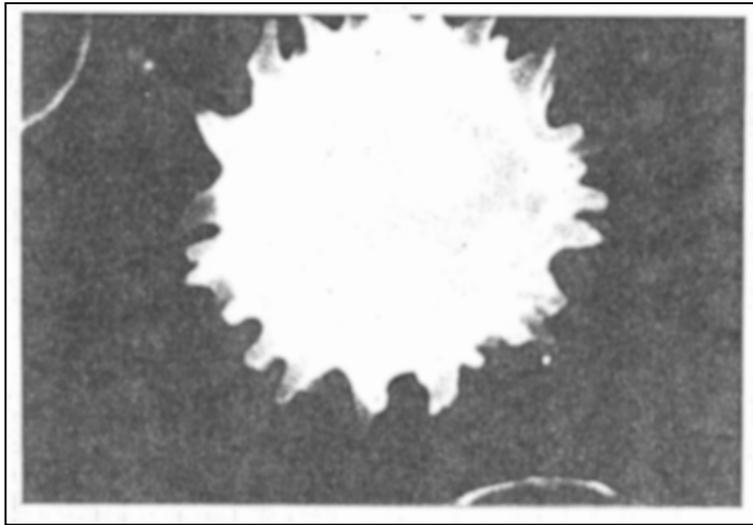
Policromasia ++

Poiquilocitosis ++

Esferocitos +

Esquistocitos ++ (Fig . N° 17)

FIGURA 17
CRENOCITO VISTO AL MICROSCOPIO DE BARRIDO



FROTIS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTE
(LL) DEFICIENTE EN HEXOQUINASA

B) QUÍMICA SANGUÍNEA:

Bilirrubina Total: 5.6 mg/dl (VN: 0.2-1.2)

Bilirrubina Directa: 1.6 mg/dl (VN: 0.2-1)

Bilirrubina Indirecta: 4 mg/dl (VN: 0.1-0.3)

Fosfatasa Alcalina: 89 u/l (VN: 30-115)

LDH: 432 u/l (VN: 100-225)

C) EXAMENES ESPECIALES:

Coombs directo e indirecto: negativos

Investigación de cuerpos de Heinz en fresco e incubados: negativos.

Curva de fragilidad globular en fresco e incubada: normal.

Prueba de Ham: negativa

Prueba de inestabilidad al calor: negativa

Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, buffer tris HCl 0.1

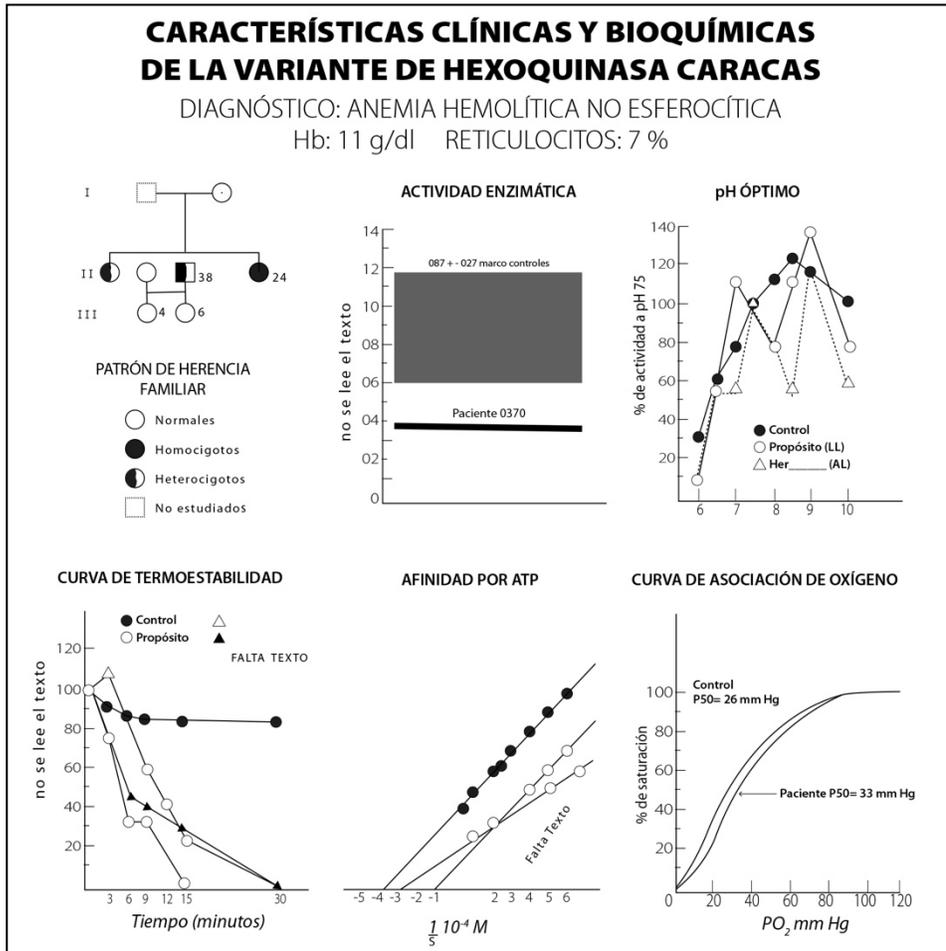
M pH 8.6: AA.

Cuantificación de hemoglobina A2 y Fetal: normales

Curva de disociación de oxígeno practicada en el Hemascan Aminco:

Ligeramente desviada a la derecha con un P50: 33 mmHg (VN: 26-27 mmHg) (Fig. N° 18).

FIGURA N° 18



D) DETERMINACIONES ENZIMATICAS

- Pruebas pantallas de Beutler para detectar deficiencias de G-6-PD, PQ, TPI, NADH metahemoglobina reductasa: normales.
- Cuantificación de las enzimas de los ciclos glicolíticos y hexosa monofosfato: todos los niveles de enzimas intraeritrocíticas fueron encontrados normales o ligeramente aumentados excepto la hexoquinasa que fue encontrada disminuida (0.370 UI/g hemoglobina en la paciente, comparados con 0.900 UI/g hemoglobina en el control, es decir, 41% de la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos normales (Tabla N° XIII).

Cuando comparamos la actividad de Hx de los eritrocitos de la paciente con la de los eritrocitos provenientes de pacientes con otros tipos de anemia hemolítica, pero con \pm el mismo grado de reticulocitosis, encontramos que en estos casos la actividad de Hx es de 2.24 UI/g hemoglobina más alta que la de los controles y aún más alta que la del propósito. (Tabla N° XIV).

- Los eritrocitos provenientes de los hermanos de la paciente presentaran niveles intraeritrocíticos de Hx disminuídas (0.487 y 0.454 UI/g Hb) mientras que sus sobrinos presentaran valares normales de Hx (1 y 0.920 UI/g Hb) (Tabla N° XV).

TABLA N° XIII
ACTIVIDADES ENZIMATICAS INTRAERITROCÍTCAS
EN PROPÓSITO LI Y CONTROL

Enzimas	Propósito ERITROCITOS UI/g Hb	Control ERITROCITOS UI/g Hb
HX	0.350	0.88
GPI	30	30.19
PFK	2.91	2.76
ALD	1.65	3.30
GAPD	158.4	124.5
PGK	248.8	219
DPGM	4.94	3.35
MPGM	10	11
ENOLASA	1.9	1.8
PK	1.15	1.99
LDH	50.9	25.2
G-6-PD	11.7	8.0
6-P-GD	5.4	5.2
GR+FAD	5	4.4
-FAD	4.6	3.6

TABLA N° XIV
NIVELES DE HEXOQUINASA (UI/g HB)
INTRAERITROCITICOS

PACIENTES	ERITROCITOS JOVENES	ERITROCITOS MADUROS	ERITROCITOS TOTALES (Maduros + Jóvenes)
PROPOSITO (LL)	0.400	0.200	0.372
HERMANO (AL)	1.260	0.334	0.487
HERMANA (ML)	0.817	0.310	0.454
CONTROL	1.500	0.900	0.870 + ó - 0.27
ANEMIA HEMOLITICA (6.4 % RETÍCULOCITOS)	-	-	2.24

TABLA N° XV
ACTIVIDAD DE HEXOQUINASA ERITROCITICA
(FAMILIA LI)

ACTIVIDAD HX (UI/ g HB)			
PACIENTE	HEMOLIZADO FRESCO	HEMOLIZADO DE 24 H (sin glucosa)	HEMOLIZADO DIALIZADO 12 horas
PROPOSITO (LL)	0.372 100 %	0.232 (62%)	0 (0%)
HERMANO (AL)	0.487	0.241	-
HERMANA (ML)	0.454	0.276	-
SOBRINA (ML)	1.00 (100 %)	-	-
SOBRINA (ML)	0.920 (100%)	-	-
CONTROL	0.922 (100%)	0.908 (93%)	0.519 (59%)

E) ACTIVIDAD DE LA HX INTRAERITROCÍTICA EN GLOBULOS ROJOS JOVENES Y MADUROS

Cuando se comparó la actividad en el propósito se encontró que la actividad de hexoquinasa estaba disminuida en ambas poblaciones celulares, siendo de 0.400 UI/g Hb en los jóvenes y 0.200 UI/g Hb en los maduros. En contraste sólo los eritrocitos maduros provenientes de los hermanos de la paciente mostraron la enzima disminuida. (Tabla N° XIV).

F) CARACTERÍSTICAS DE LA HEXOQUINASA RESIDUAL: (Fig. N° 18)

pH óptimo: el hemolizado control mostró una curva sencilla con un sólo pico y un pH óptimo de 8.5, mientras que tanto el del propósito como los de sus hermanos mostraron curvas bifásicas con un pH óptimo de 9.

TERMOESTABILIDAD. - El estudio de la estabilidad enzimática a 46 °C mostró que en 15 minutos el hemolizado del propósito perdió toda actividad mientras que el hemolizado control perdió solamente 18% de su actividad en un periodo de incubación de 30 minutos.

Los hemolizados provenientes de los hermanos del propósito mostraron curvas de termoestabilidad intermedia entre la del control y la del paciente.

ESTABILIDAD A LA DIÁLISIS: (Tabla N° XV).

El hemolizado del propósito perdió el 62% de actividad de Hx cuando fue dializado 24 horas contra una solución estabilizante que contenía EDTA y mercaptaetanol, mientras que la enzima Hx del hemolizado control se mostró estable, manteniendo toda su actividad durante las 24 horas de diálisis.

AFINIDAD DE HX POR SUS SUSTRATOS:

El Km para el ATP de lo enzima residual del propósito fue de 0.100 mM, mientras que el del control fue de 0.024 mM. La enzima residual proveniente de los hemolizados de

los hermanos del propósito presentó valores de Km para el ATP de 0.038 mM y 0.065 mM. (Fig. N° 18).

DEFICIENCIA DE NADH METAHEMOGLOBINA REDUCTASA ASOCIADA CON CIANOSIS. -

A continuación, se describe detalladamente el cuadro clínico y hematológico de una paciente con una deficiencia eritroenzimática que en lugar de producir anemia hemolítica produce cianosis, representa un caso poco frecuente dentro de la literatura universal y el primer caso reportado dentro de la literatura latinoamericano.

1.-ANAMNESIS Y EXAMEN FISICO:

Se trata de una paciente de 9 años de edad, natural de Caracas, de padres portugueses, que nació de un parto normal (II gesta), muy cianótica, que fue disminuyendo en el período neonatal hasta llegar a moderada. Actualmente la paciente refiere somnolencia, cefalea, mareos, agravamiento de la cianosis y ocasionalmente náuseas y vómitos cuando realiza ejercicios fuertes. Fue referida al Hospital de Niños de Caracas para evaluación cardiopulmonar, encontrándose dicho estudio normal. Posteriormente es referida para diagnóstico etiológico de la cianosis. En el examen físico se encontró en buenas condiciones generales con desarrollo psicomotor normal, excepto por cianosis moderada en piel y mucosa, más marcada en labios, orejas y lecho de las uñas.

2.-EXAMENES DE LABORATORIO:

A) HEMATOLOGIA:

Ligera eritrocitosis comparados con valores normales para niños de 5-10 años ()

Hb= 14.2 g% (VN: 13-13.5 g%)

Hto=44.6 % (VN: 36%)

VCM= 81 μm^3

HCM= 25.lpg

CHCM=31.9%

Contaje rojo= 5.540.000 mm³ (VN :4.000.000 mm³)

Contaje blanco: 8.200 p mm³

Contaje de plaquetas:196.000 p mm³

Reticulocitos = 0.4%

Coombs directo e indirecto= negativos

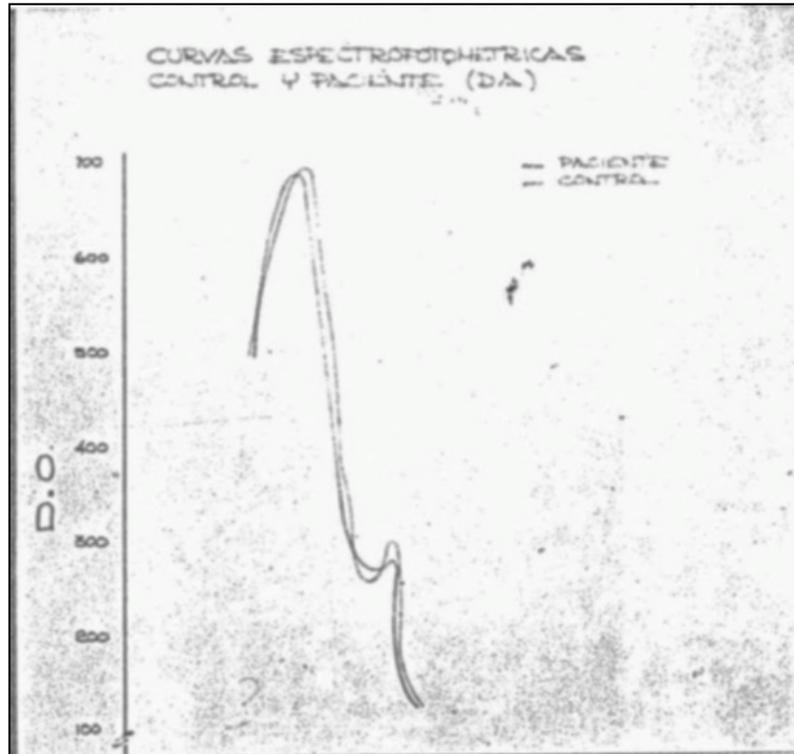
B) QUIMICA SANGUINEA (Tabla N° XVI)

Normal para su edad.

C) EXAMENES ESPECIALES

- Electroforesis de Hb y electroenfoque de Hb: Normal
- Curva de disociación de oxígeno: Normal con P50 de 28 mm Hg
- Prueba de inestabilidad al calor de Korrel y Kay: Positivo antes de los tres minutos.
- Cuantificación de meta Hb: 4.38 g % (control = 0.8 g%)
- Pruebas pantallas para detectar deficiencias de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa: Normal
- PK: normal; TPI: normal; GR: normal; NADH meta Hb reductasa: Anormal.
- Cuantificación de las enzimas de los ciclos: glicolítico Cuantificación de NADH meta Hb intraeritrocítica reductasa: disminuida, 0.50 UI/g Hb (control: 1.50 UI/g Hb). Cuantificación de la NADPH meta Hb intraeritrocítica reductasa: 0.41 UI/g Hb (VN: 0.4 + ó - 0.1 UI/g Hb).
- Se realizaron curvas espectrofotométricas de absorción de la oxihemoglobina, meta Hb con y sin cianuro. Se obtuvo con la curva de oxi Hb dos inflexiones normales a 540 y 580 nm de longitud de onda y con la curva de meta Hb una inflexión a 630 que desapareció con cianuro. (Fig N° 19)

FIGURA 19
CURVA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ABSORCIÓN DE LA
HEMOGLOBINA, DESPUES DE OXIDARLA A Fe^{+++} CON
FERRICIANURO, SE OBSERVAN DOS INFLEXIONES DE
NORMALES A 540 Y 580 MM DE LONGITUD DE ONDA TANTO EN
PACIENTES COMO EN EL CONTROL



ESTUDIO DE LA FAMILIA DS (Tabla N° XVI)

Familia compuesta: padre, 42 años; madre, 36 años; 4 hijos: 2 varones de 3 y 7 años y 2 hembras de 9 años (propósito) y 11 años respectivamente. La hematología practicada en el padre y la hermana RD, mostró ligera eritrocitosis con niveles intraeritrocíticos de NADH meta Hb reductasa disminuidos.

De acuerdo a la clínica y exámenes practicados en esta paciente y sus familiares se realizó el diagnóstico: cianosis secundaria, deficiencia de NADH; paciente, homocigótica y su padre y hermana RD, heterocigotos.

TABLA No XVI
DATOS DE LABORATORIO
FAMILIA: DA SILVA

EXAMEN	MCD Madre, 36	AD Padre, 42	RD Hermana, 11	MD Propósito	ND Hermano, 7	CD Hermano, 3	CONTROL
Contaje Blanco x 10 ³ /mm ³	7.3	7.0	5.5	8.2	10.7	7.9	-
Contaje rojo x 10 ⁶ /mm ³	5.07	6.11	5.32	5.54	4.95	4.96	-
Contaje plaquetario x 10 ³ /mm ³	199.0	231	259	196	280	270	-
Hb gm. %	14.4	16.7	14.2	14.2	13.4	13.1	-
Hto %	44.4	50.1	44.4	44.6	40.7	40.4	-
VCM u ³	88	82	84	81	83	82	-
HCM pg	28.4	27.4	26.7	25.7	27.1	26.5	-
CHCM %	32.4	33.4	32.0	31.9	32.9	32.5	-
Segm.	71	52	35	76	69	52	-
Linfo	22	45	53	21	25	43	-
Mono	6	1	6	2	5	0	-
Eos	1	1	5	1	1	2	-
Bas	0	1	1	0	0	2	-
Reticulocitos %	2.7	2.6	0.5	0.2	0.6	0.6	2
Proteínas totales (4.3-8.5 g %)	5.6	7.6	8.3	8.5	7.4	7.8	-
Ca (9.6 - 10.2 mg %)	7.2	9.4	10.9	10.5	8.6	10.6	-
P (3.7 - 4.1 mg %)	3	3.6	4.2	4.6	4.6	5.6	-
Colesterol (111-127 mg %)	100	164	151	119	100	130	-
Glucosa (93-107 mg %)	89	84	79	78	62	79	-
Ac. Úrico (4.8 - 5.6 mg %)	4.8	6.2	4.5	4.4	3.8	3.4	-
Bilirrubina total (.3 - 1.5 mg%)	0.3	0.5	0.3	0.6	0.3	0.4	-
Fosfatasa Alcalina (91-111 U/L)	110	96	298	306	139	245	-
LDH (173-209 U/L)	168	186	229	226	141	271	-
SGPT (28-34 U/L)	10	30	7	7	20	10	-
SGOT (25-37 U/L)	10	70	32	33	24	53	-
Nitrógeno Úreico (19-21 mg %)	10	12	14	12	15	12	-
Creotina (1-1.6 mg%)	0.6	0.8	0.6	0.4	0.4	0.4	-
Coombs Directo e Indirecto	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-
Porcentaje de meta Hb	1.2	1.92	1.62	4.38	0.01	2.46	0.5
Porcentaje de sulfo Hb	0	0	0				0
Pruebas Pantalla: G6PD	N	N	N	N	N	N	N
TPI	N	N	N	N	N	N	N
PK	N	N	N	N	N	N	N
GR	N	N	N	N	N	N	N
NADH meta Hb reductasa	N	Ligera anormal	N	Franca anormal	N	N	N
NADH meta Hb reductasa U/gHb	0.91	0.71	0.87	0.35	0.80	1.0	1.5
Curva de disociación de oxígeno	N	N	N	N	N	N	N
P50 mmHg	28	26	25.5	28	28	27	26.28
Electroforesis Hb pH 8.6	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
Electroforesis de Hb	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
Cuantificación Hb A2							
Cuantificación Hb Fetal	0.02	0.03	0.02	0.64	0.02	0.86	2
Cuerpos de Heinz	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
P. de inestabilidad	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Curva espectrofotométrica:							
1. De la Hb	N	N	N	N	N	N	N
2. De la meta Hb	N	N	N	N	N	N	N

ANEMIAS HEMOLITICAS CONGENITAS POR DEFECTOS DE MEMBRANA ESFEROCITOSIS CONGENITA

Se hizo el diagnóstico de esferocitosis congénita en diez pacientes (Tabla N° VI). Dichos pacientes consultaron por anemia e ictericia discreta exacerbada durante

períodos de infección. Las edades de los pacientes al momento del diagnóstico variaban de un mes a 40 años. 5 de dichos pacientes tenían antecedentes de ictericia neonatal.

A continuación, se describe detalladamente el cuadro clínico y los estudios realizados entre pacientes con esferocitosis por presentar cuadro clínico atípico de esferocitosis. La paciente AAB de un mes de edad, nació de un parto normal y a las 24 horas presentó ictericia sin incompatibilidad a grupo ABO RH (con Coombs negativo), la cual requirió fototerapia por 5 días. Sus valores hematológicos en sangre periférica al mes de nacida fueron Hb = 5.8 g% (VN= 12.7 g%), Hto = 20% (VN: 40), reticulocitos:1.3% (VN= 0.4-2%), con conteaje blanca dentro de límites normales. El frotis mostró marcada policromatofilia, macrocitosis, algunos dianocitos y muy escasas esferocitos. (Fig. N° 20). El perfil químico fue normal con hiperbilirrubinemia de 1.5 mg% (VN= 0.4-1.2 mg%) a expensas de la bilirrubina indirecta: 1.3 mg% (VN 0.2 mg%) Curva de fragilidad globular en fresco e incubada desviadas a la izquierda (Fig N° 21). Todo el estudio realizado para detectar hemoglobinopatías y enzimopatías fue normal

FIGURA 20
FROTIS DE SANGRE DE LA PACIENTE CON ANEMIA HEMOLÍTICA
CONGÉNITA POR ESFEROCITOSIS

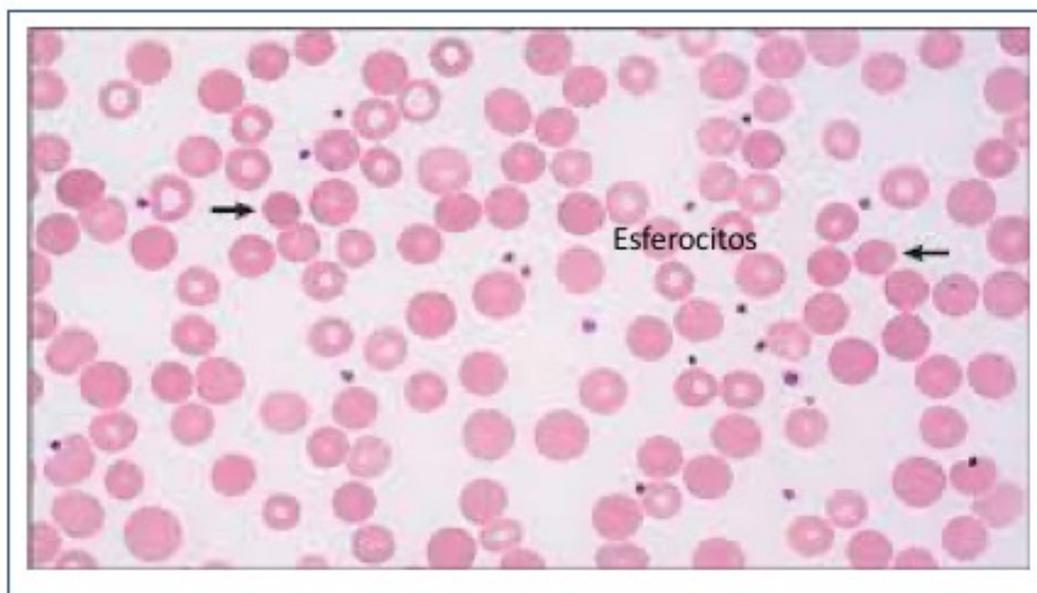
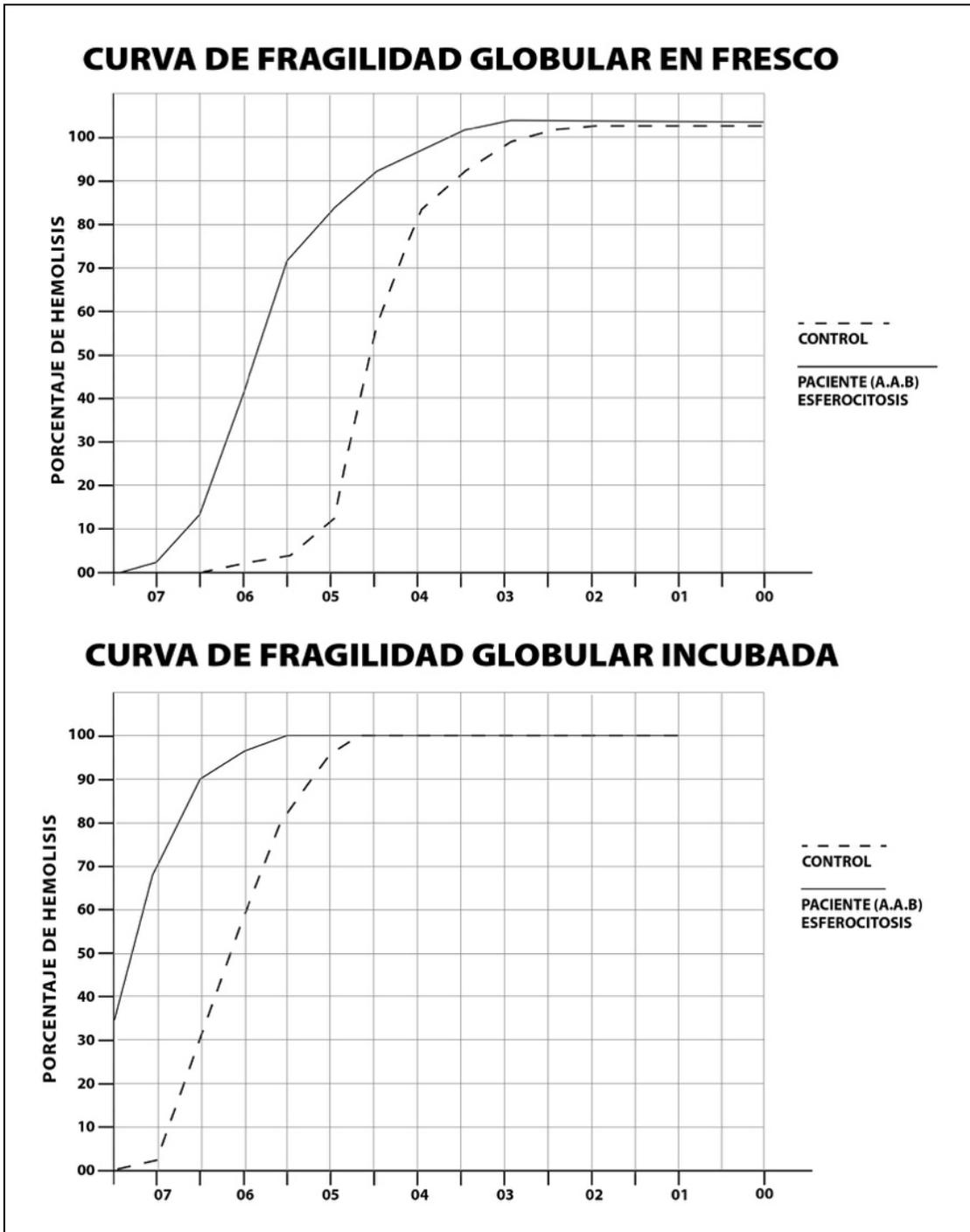


FIGURA 21



El aspirado de médula ósea mostró discreta hiperplasia mieloide con buena maduración. Serie eritroide presente a expensas de precursores (Stem Cells) con arresto

de la maduración de la serie roja y algunas formas diseritropoyéticas (Fig.Nº 22). Serie linfoide no destacable. Megacariocitos presentes. La paciente recibió dos concentrados globulares por anemia severa con intervalos de dos semanas. En la tercera oportunidad que su hematocrito cayó o 20%, se decidió administrar prednisona 2 mg/kg/d vía oral, por un mes, logrando que la Hb subiera o 10 g % y el hematocrito subiera o 34% y los reticulocitos a 8%. Actualmente, al año y medio de edad, la paciente presenta las siguientes cifras hematológicas: Hb 10.2 g%; Hto.36%, VCM= 80 u³, HCM= 24.8 pq, reticulocitos 10.2%;: (Tabla Nº XVII) Contaje blanco: 10.200/mm³ contaje plaquetas: 400.000/mm³; bilirrubina total: 1.5 mg% BD= 0.2 mg%; BI= 1.3 mg%; Fe sérico= 140 mcg. El frotis de sangre periférica muestra abundantes esferocitos (Fig. Nº 22).

FIGURA 22
FROTIS DE ASPIRADO DE LA MÉDULA ÓSEA DE LA PACIENTE CON ANEMIA HEMOLÍTICA CONGÉNITA SECUNDARIA A ESFEROCITOSIS AL MICROSCOPIO DE LUZ SE OBSERVA HIPERPLASIA ERITROIDE Y SANGRE CON ESFEROCITOS VISTOS AL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO

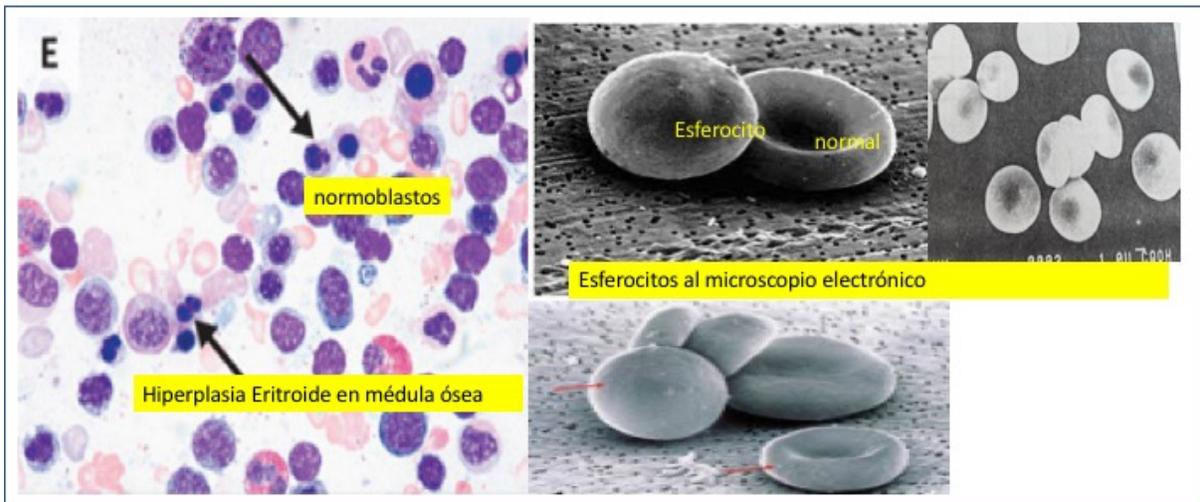


TABLA N° XVII
VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS
EN PACIENTES CON ESFEROCITOSIS

PACIENTE	EDAD	HB g%	Hto. %	Retic. %	BT mg%	BI mg%	Fe mcg%
1-AAB (XXX)	1m*	5.8	20	1.3	1.6	1.40	131
	3m*	10.1 (15.0)	31 ()	8.0 ()	1.98 (1-2)	1.59	140 ()
4-FR	3m*	10.1 (12.5-13)	30.1 (36)	14.2 (1-2)	(1-2)	- -	91 ()
2-MLM	6m	10 ()	29 ()	2.6 ()	1.22 (1-2)	1.0 -	226 ()
3-FTU	7m	8.2 ()	27 ()	15.6 ()	2.20 (1-2)	1.9 -	96 ()
5-J.A.	3 ^{a**}	5	19	70			
6-C-M	15a	13.8	39.3	2	1.4	1.0	100
7-ML	28a	9.7	27	6.4		-	
8-AT	29a	12.7	40.3	5.2	0.56	-	143
9-LA	30a	118	38	1.8	1.0	0.2	120
10-RM	40a	11	36	6.6	1.8	1.6	

Lo anemia severa de esta paciente con un grado de reticulocitosis mucho más bajo que el que corresponde al grado de anemia con hipoplasia selectiva de lo serie roja en médula ósea, presencia de esferocitos en sangre periférica, curva fragilidad globular desviada a la izquierda y aumento de la bilirrubina a expensas de la bilirrubina indirecta orientaron el diagnóstico hacia hipoplasia de serie roja secundaria a crisis hemolítica por esferocitosis congénita

El estudio hematológico realizado en ambos padres de la paciente mostró que ambos presentaban valores hematológicos y bioquímicos normales en sangre periférica con curvas de fragilidad globular en fresco e incubadas normales.

El otro paciente FU., con esferocitosis fue lactante de 7 meses quien nació de un parto normal sin historia de consanguinidad, y a los 49 días de nacido fue hospitalizado por presentar palidez cutáneomucosa, que se reportó casi desde su nacimiento. Se le encontró lo hemoglobina 4 g%, se transfunde con concentrado globular y egresa con cifras de Hb= 9.2 g% y Hto 28%. Dos meses después reingresa por anemia severa, Hb: 5g% y síndrome febril, requiriendo nueva transfusión y antibioticoterapia. El paciente es referido por descenso progresivo de los valores hematológicos con reticulocitosis y esplenomegalia que ameritaba transfusiones de concentrados globulares cada 6 semanas aproximadamente.

Examen físico: lactante con desarrollo pondoestatural normal, palidez marcada de piel y mucosas y esplenomegalia a 4 cm. RCI.

Los *exámenes de laboratorio* mostraron: conteo rojo: 2.800.000/mm; Hto 26.9%; VCM = 96 μ^3 ; HCM = 29.2pg; CHCM = 30.4%; conteo blanco: 16.2 X 10³; conteo de plaquetas = 301 X 10³/mm; reticulocitos 12%; Frotis: anisocitosis +++, poiquilocitosis ++; policromatofilia ++; esferocitos ++; microcitos + 5% normoblastos (Fig. N° 23); Coombs directo e indirecto= negativos; Fe= 96 mcg%; capacidad total de fijación del hierro= 679 mcg%; bilirrubina total 2.2 mg%; bilirrubina indirecta 2mg%; fosfatasas alcalinas: 254 u/l; 344 u/l; perfil químico: normal (Tabla N° XVIII); curva de fragilidad globular en fresco ligeramente desviada a la izquierda' (Fig. N° 24) y la incubada: con gran acentuación de la desviación a la izquierda. Aspirado médula ósea: mostró médula ósea normocelular hiperplasia serie eritroide con cambios megaloblásticos de diseritropoyesis, hemosiderina aumentada, con abundantes sideroblastos y siderocitos (Fig. N° 25).

FIGURA 23
FROTIS DE SANGRE DEL PACIENTE CON ANEMIA
HEMOLÍTICA CONGÉNITA SECUNDARIA A ESFEROCITOSIS
CON PRESENCIA DE ESFEROCITO



FIGURA 24

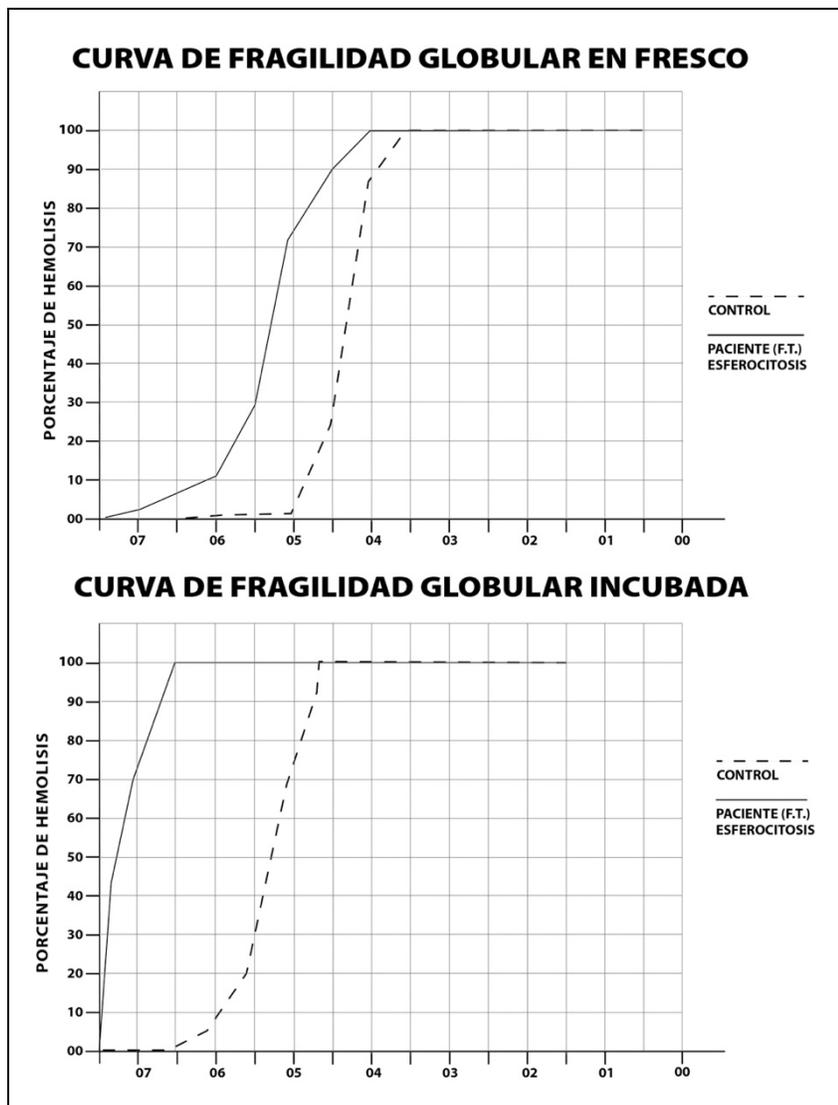
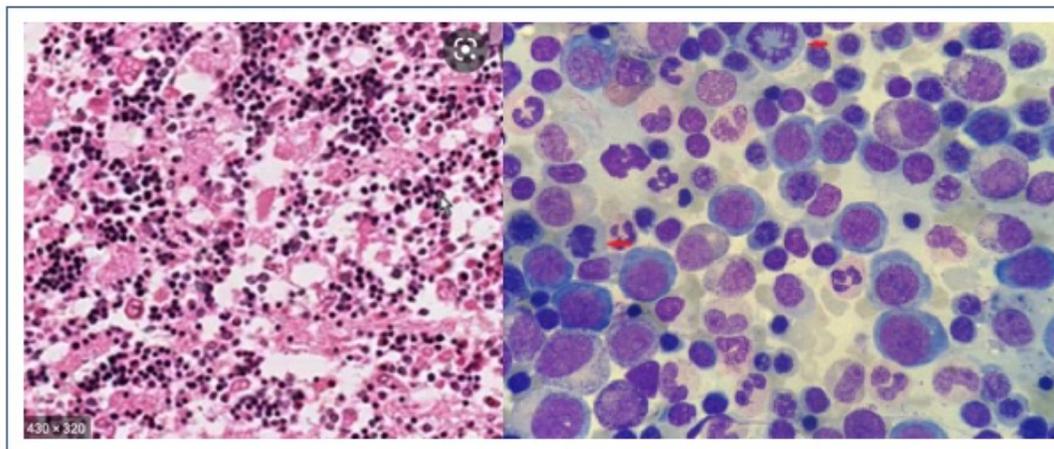


FIGURA 25
FROTIS DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTE CON ANEMIA HEMOLÍTICA
CONGÉNITA POR ESFERIOCITOSIS CON HIPERPLASIA ERITRIDE
AL MICROSCOPIO DE LUZ (40X Y 100X)



El perfil para detectar hemoglobinopatías y enzimopatías fue normal. De acuerdo a la clínica y exámenes de laboratorio realizados se hizo el diagnóstico de esferocitosis congénita con presentación atípica. El paciente JA de 3 años de edad fue referido por anemia severa de 2 meses de evolución. Al examen físico se encontró un preescolar con desarrollo pondo estatural normal, palidez marcada de piel y mucosas, ictericia conjuntival discreta y bazo palpable a 4 cm del reborde costal izquierdo. La hematología practicada reveló Hb= 5.g % Hto = 19% con una reticulocitosis muy marcado del 70%. El frotis de sangre periférica mostró macrocitos policromatofilos +++++, presencia de abundantes esferocitos, esquistocitos ++, macrocitosis ++. (Fig. N° 26). El perfil químico fue normal excepto por hiperbilirrubinemia a expensas de la bilirrubina indirecta. La curva de fragilidad globular en fresco e incubada mostró una desviación a la izquierda (Fig. N° 27). El Coombs directo fue positivo con antisuero amplio espectro y anti IgG. El estudio familiar mostró que la madre también presentaba la esferocitosis (Fig. N° 28). El perfil para detectar hemoglobinopatías y eritroenzimopatías fue normal en el paciente y sus padres.

De acuerdo a los hallazgos se hizo el diagnóstico de anemia debida a esferocitosis congénita combinada con anemia hemolítica autoinmune en un niño de 3 años, una entidad sumamente infrecuente.

FIGURA N° 26
FROTIS DE SANGRE DE PACIENTE CON ESFEROCITOSIS CONGENITA
CON ESFEROCITOS Y ESFEROCITO AL MICROSCOPIO
ELECTRÓNICO DE BARRIDO

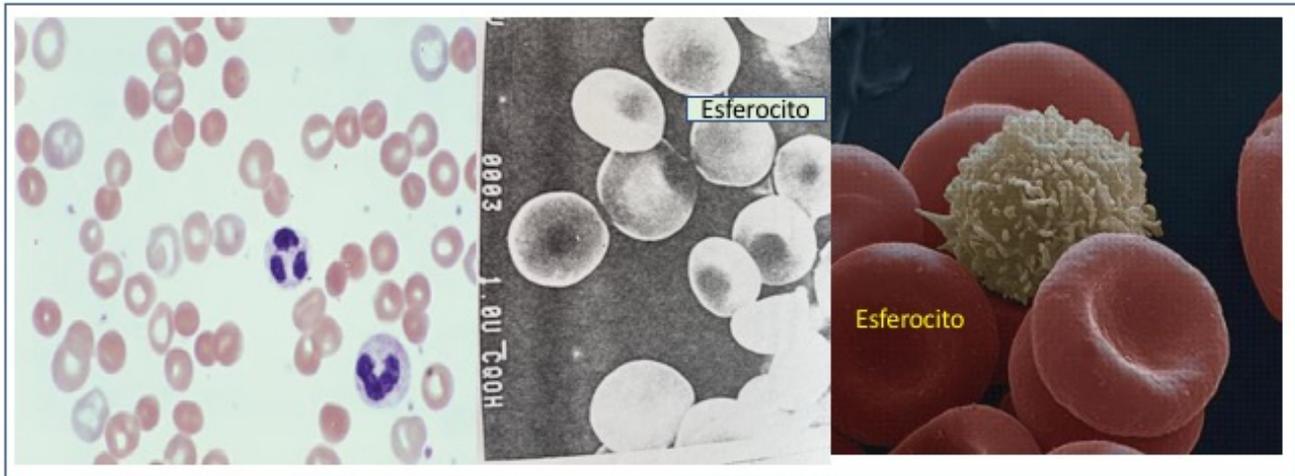


FIGURA N° 27

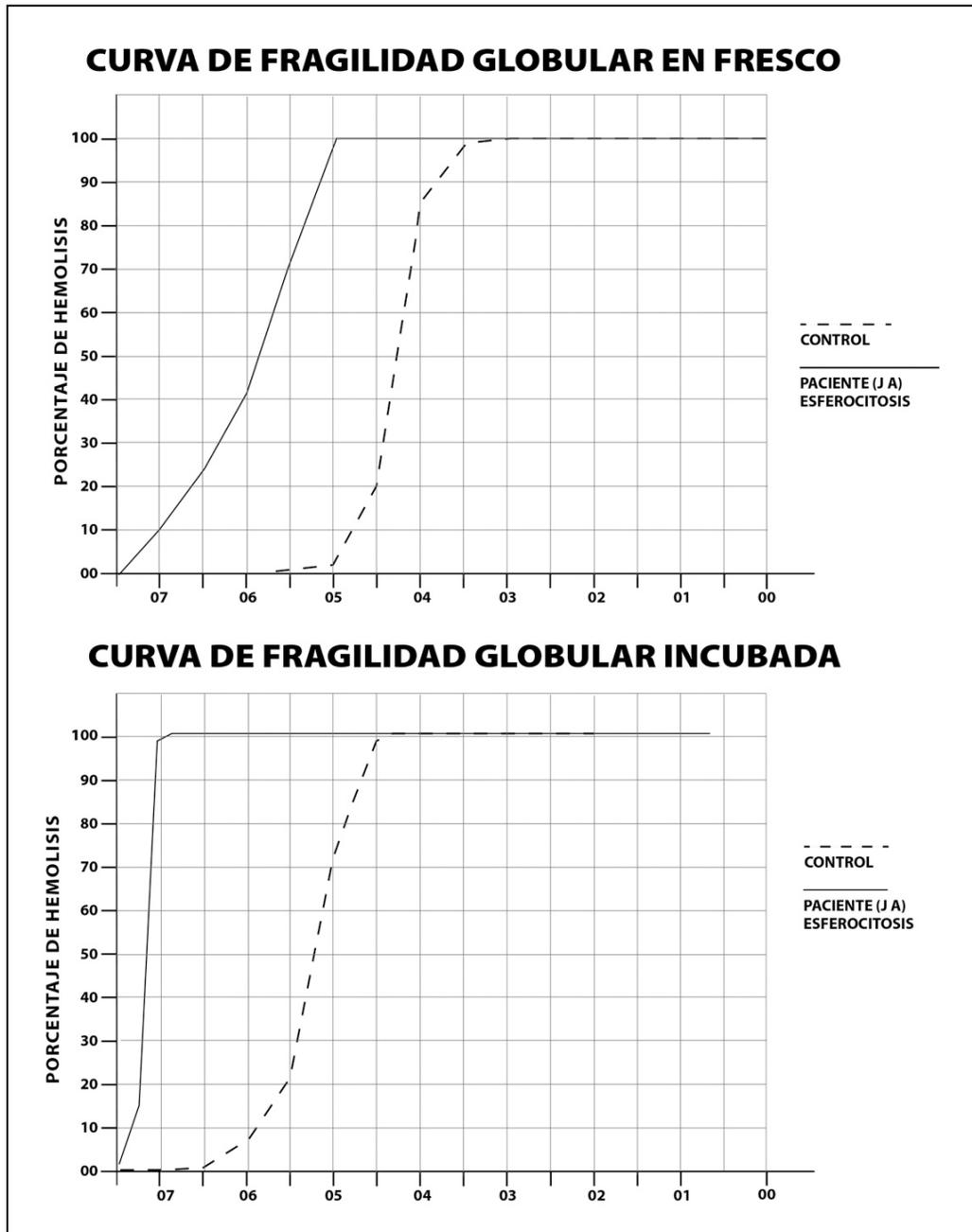
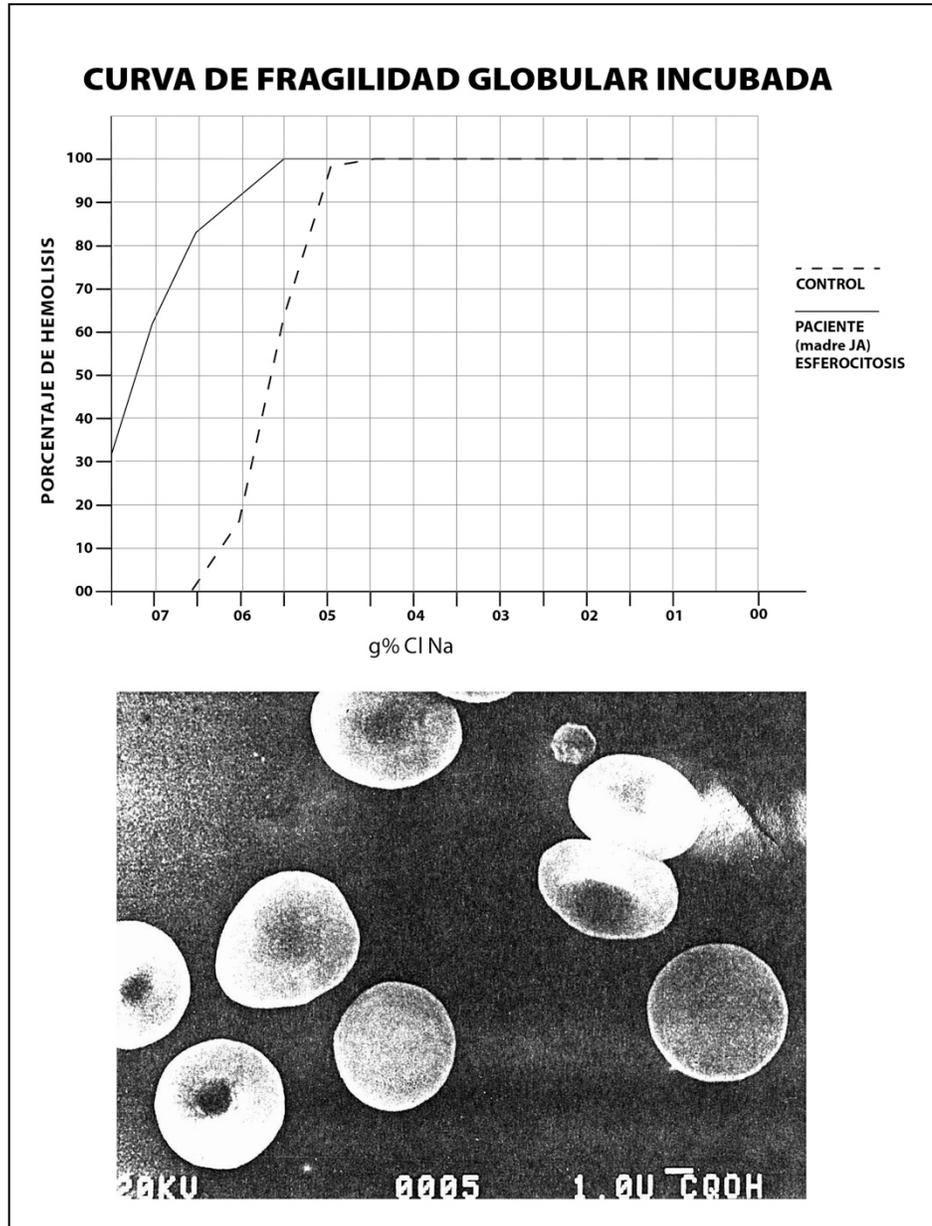


FIGURA N° 28



**ERITROCITOS ESFEROCÍTICOS DE LA MADRE DEL PACIENTE J.A.
VISTOS AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO**

ANEMIA HEMOLÍTICA CONGÉNITA, SECUNDARIA A OVALOCITOSIS

Un paciente de 28 años de edad, consultó por anemia discreta de Hb = 10.4 g% Hto. 32% reticulocitos: 0.4 % con contajes blancos y plaquetarios normales. (Tabla N° XVIII). Tratada con hierro, ácido fólico y vitamina B₁₂ intermitentemente por años, sin lograr elevar la Hb a más de 11.5 g% y el Hto. a más de 38 1%. El frotis de sangre periférica mostró 22% de ovalocitos (Fig. N° 29), y la curva de fragilidad globular incubada estuvo desviada a la izquierda. (Fig. N° 30). El perfil químico fue normal fuera de crisis hemolítica y mostró un aumento de las cifras de bilirrubina, fosfatasas alcalinas y LDH durante crisis (Tabla N° XVIII).

TABLA N° XVIII
VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL PACIENTE CON ANEMIA HEMOLÍTICA SECUNDARIA A OVALOCITOSIS

	Hb g%	Hto. %	Retic. %	Bt. mg%	F.A. U/lt	LDH U/lt
12/2/80	10.4	32	0.4	0.4	49	160
3/6/80	11.5	38	1.0	3.8	130	372
Valores Normales	12-14	39-43	0.4-12	0.2-12	30-115	100-225

FIGURA N° 29

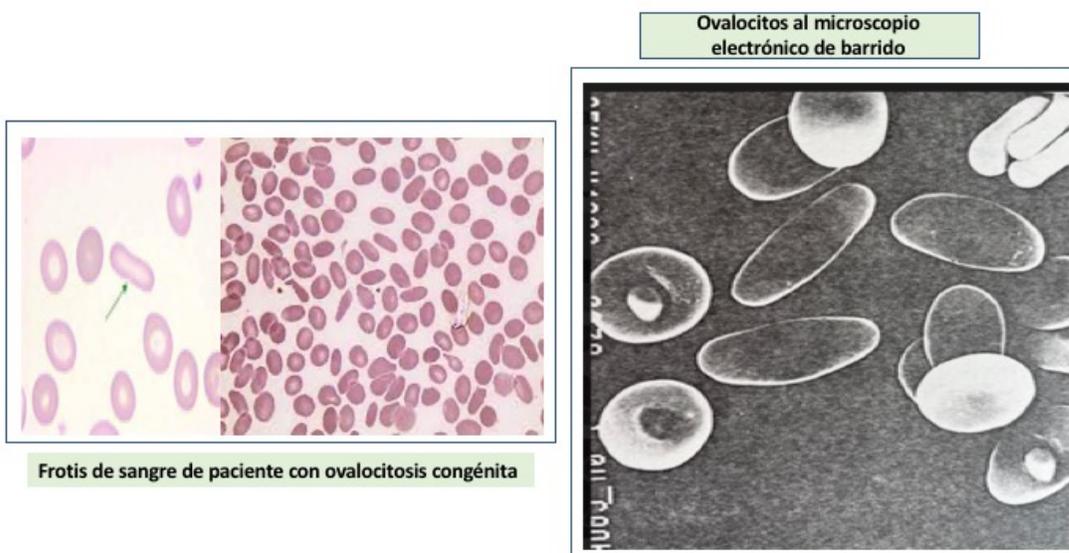
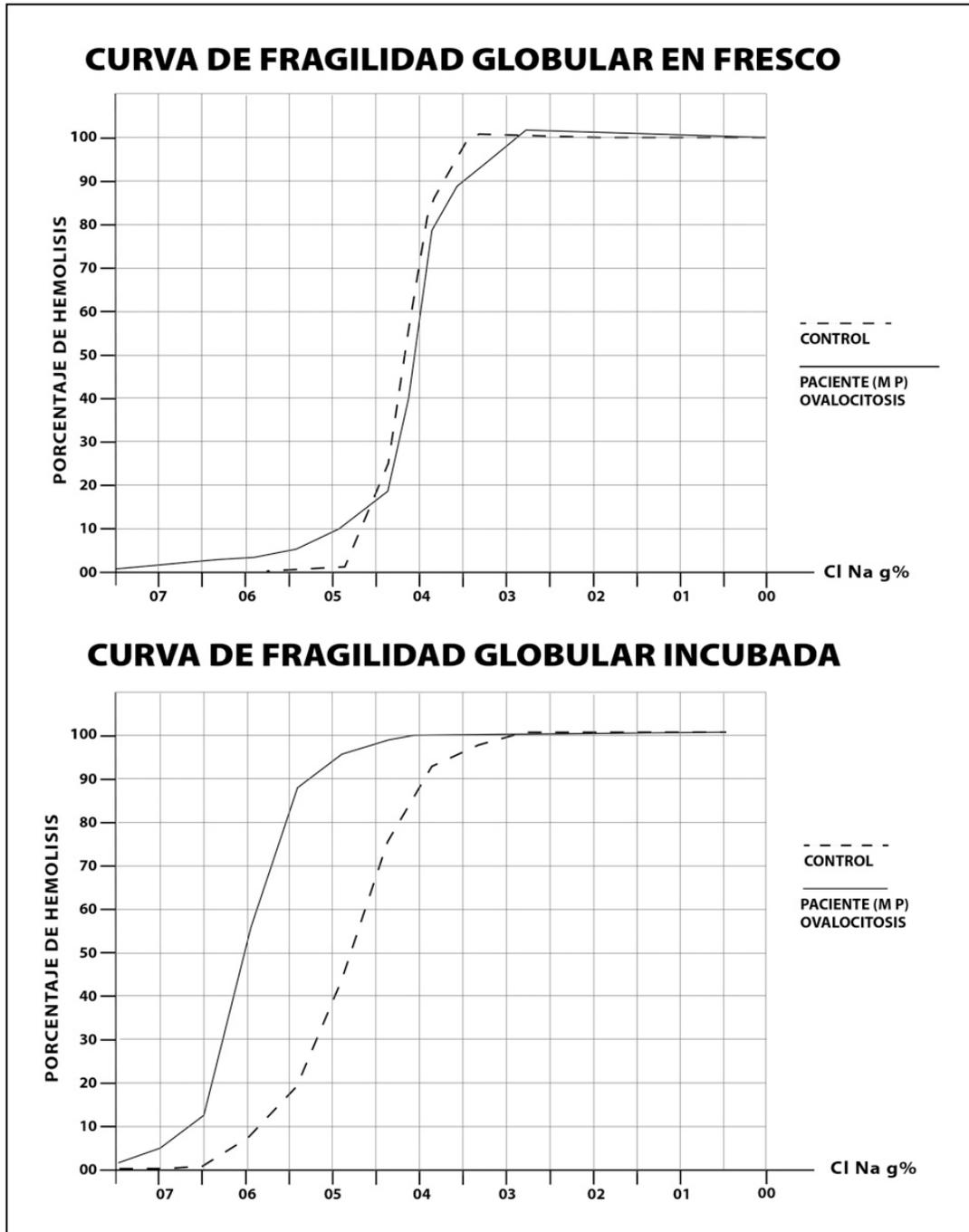


FIGURA N° 30



El perfil para detectar eritoenzimopatías y hemoglobinopatías no reveló ninguna de estas enfermedades. La madre de la paciente presentó los siguientes valores hematológicos y bioquímicos en sangre periférica Hb: 12 g %; Hto = 41 .9%; Fe = 115

mcg%; VCM = $9\mu^3$; HCM = 27.7 pg; CHCM = 30.6 %. El frotis de sangre periférica reveló 10.4 % de ovalocitos con curva de fragilidad globular incubada desviada a la izquierda. Los perfiles para detectar hemoglobinopatías y enzimopatías fueron normales. De acuerdo a los hallazgos se hizo el diagnóstico de anemia hemolítica congénita por ovalocitosis.

ANEMIA HEMOLÍTICA CONGÉNITA SECUNDARIA A ESTOMACITOSIS

Una paciente de 38 años de edad, consultó por anemia de Hb 8 g%, Hto. 29% reticulocitosis de 5.4%, el frotis mostró estomatocitosis +++, hipocromía ++, microcitosis +++, ovalocitos +, escasas células en lágrima, policromatofilia +, macrocitosis + (Fig. N° 31-a). El perfil químico mostró Fe 21 mcg%, capacidad total de fijación del Fe = 503 mcg%, bilirrubina total 0.4 mg%, prueba Coombs negativa. Los otros parámetros químicos, al igual que los perfiles para detectar hemoglobinopatías y enzimopatías fueron normales. (La curva de fragilidad globular incubada desviada a la izquierda. Figura N° 31-b).

Se hizo el diagnóstico de anemia hemolítica congénita por estomatocitosis asociada o anemia ferropénica.

FIGURA 31-A
ESTOMATOCITOS VISTOS AL MICROSCOPIO
ELECTRONICO DE BARRIDO

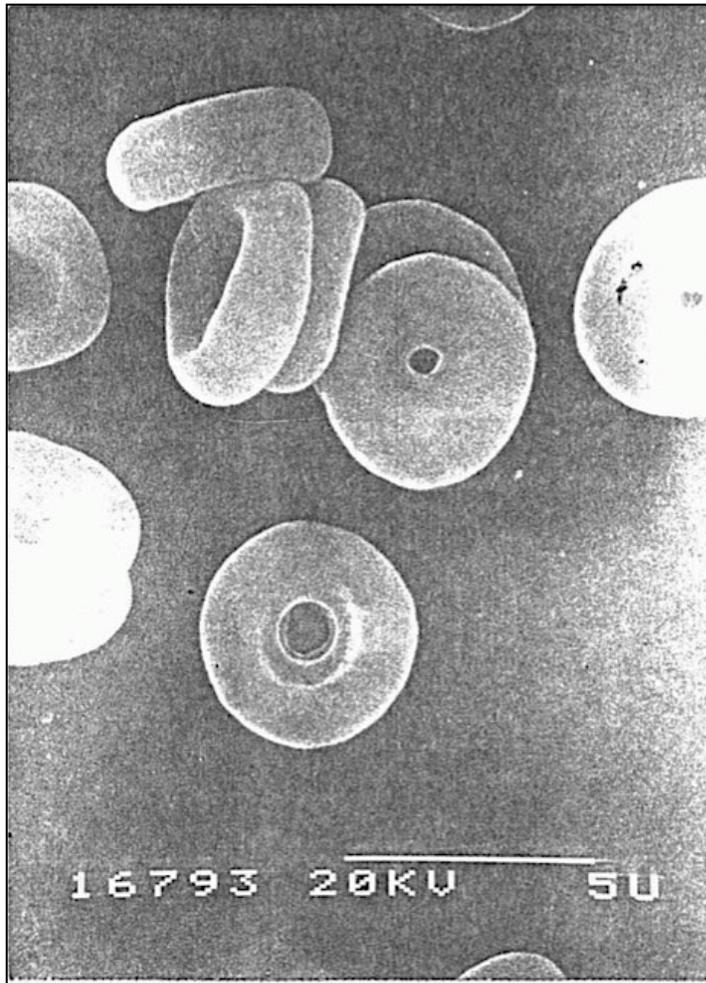
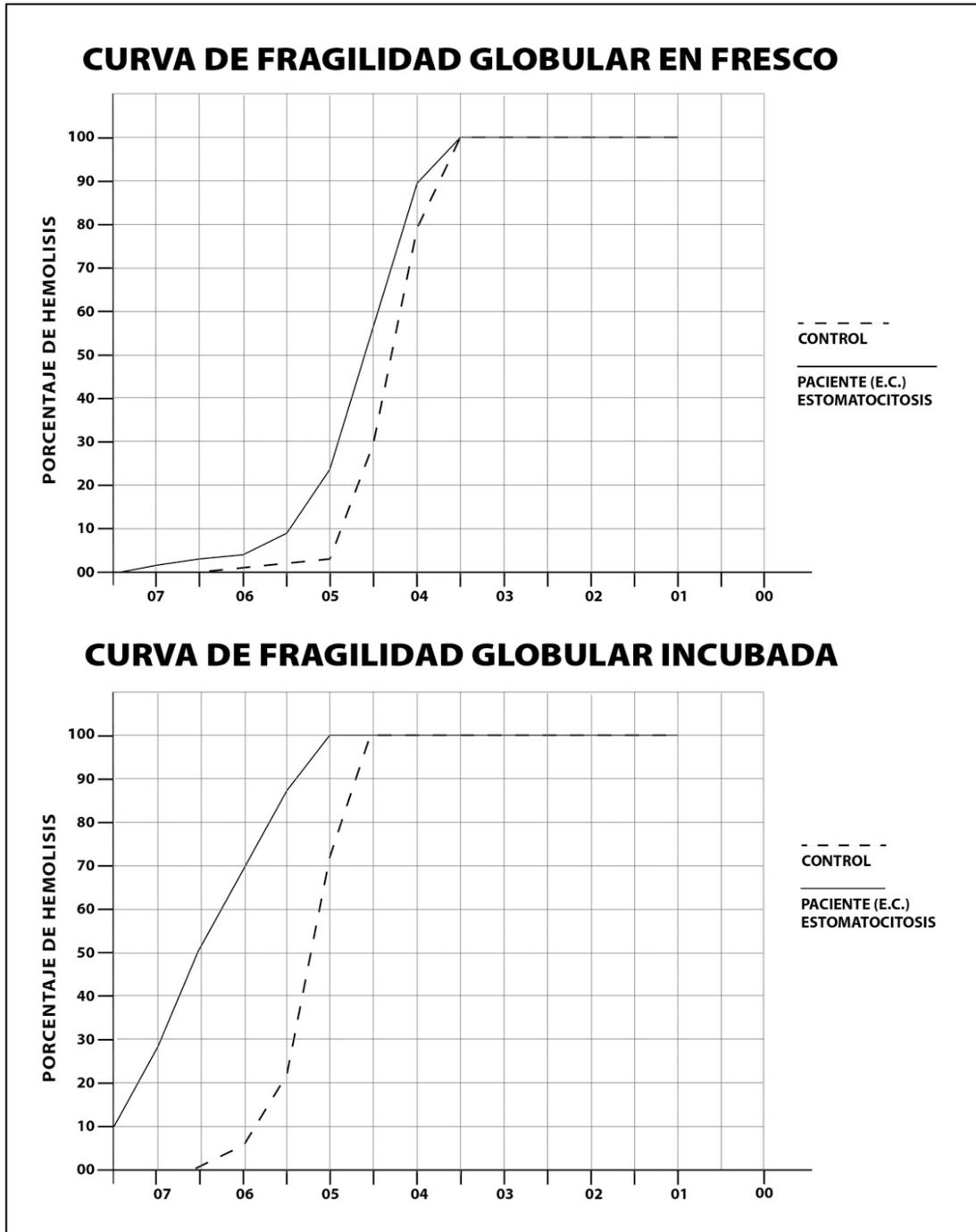


FIGURA No 31-B



ANEMIAS HEMOLÍTICAS PRODUCIDAS POR DEFECTO EN LA ESTRUCTURA DE LAS CADENAS DE GLOBINA

DREPANOCITOSIS:

Se estudiaron 40 pacientes, los cuales consultaron por anemia hemolítica congénita acompañada de crisis dolorosas en articulaciones. Los valores hematológicos y bioquímicos de dichos pacientes mostraron una anemia severa con valores promedios de Hb de 8.3g% (5.4-11.2g%) y de hematocrito del 30% (-28.4 - 40.4%) con CHCM = $31.5 \pm 1.4\%$, y reticulocitosis del 15% -30%.

Las cifras de Hb y Hto dependieron de si el paciente había sido transfundido recientemente.

El perfil químico mostró hiperbilirrubinemia hasta de un 7-8 mg%, con predominio de la indirecta, en todos los casos. El frotis de sangre periférica en líneas generales se caracterizó por la presencia de drepanocitos irreversibles con moderada aniso y poiquilocitosis, presencia de dianocitos y normoblastos ocasionales (Fig. N° 32).

FIGURA N° 32
FROTIS DE SANGRE DE PACIENTE CON DREPANOCITOSIS
HOMOCIGOTA VISTOS AL MICROSCOPIO DE LUZ Y AL
ELECTRÓNICO DE BARRIDO



La prueba de solubilidad de la hemoglobina y la investigación de drepanocitos fueron positivas en todos los casos (Fig. N° 33). La prueba de inestabilidad de la hemoglobina fue negativa durante 10 minutos y tardíamente se positivizó. La curva de disociación de oxígeno de la Hb se caracterizó por estar marcadamente desviada a lo derecha con un P50 de 43 ± 9 mm Hg (Fig. N° 34), mientras que las muestras de sangre proveniente de donantes de sangre que se corrieron paralelamente mostraron un P50 de 25,5 - 27,5 mmHg. Los niveles de 2,3 difosfoglicerato de los pacientes drepanocíticos fueron de: 6.3 micromoles/ml de eritrocitos (4.3-10.5 micromoles/ml), siendo los valores controles de 2,3, difosfoglicerato de 4-5 micromoles/ml de eritrocitos. La electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa mostró una banda principal lenta de hemoglobina S con bandas menores catódicas de hemoglobina fetal, hemoglobina A2 y anhidrasa carbónica que corrieron por detrás de la banda de hemoglobina S (Fig. N° 35).

FIGURA No 33
LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD DE LA HEMOGLOBINA. TUBO DE LA
IZQUIERDA HB SS INSOLUBLE. TUBO DE LA DERECHA HB AA
SOLUBLE, TRANSPARENTE



FIGURA No 34

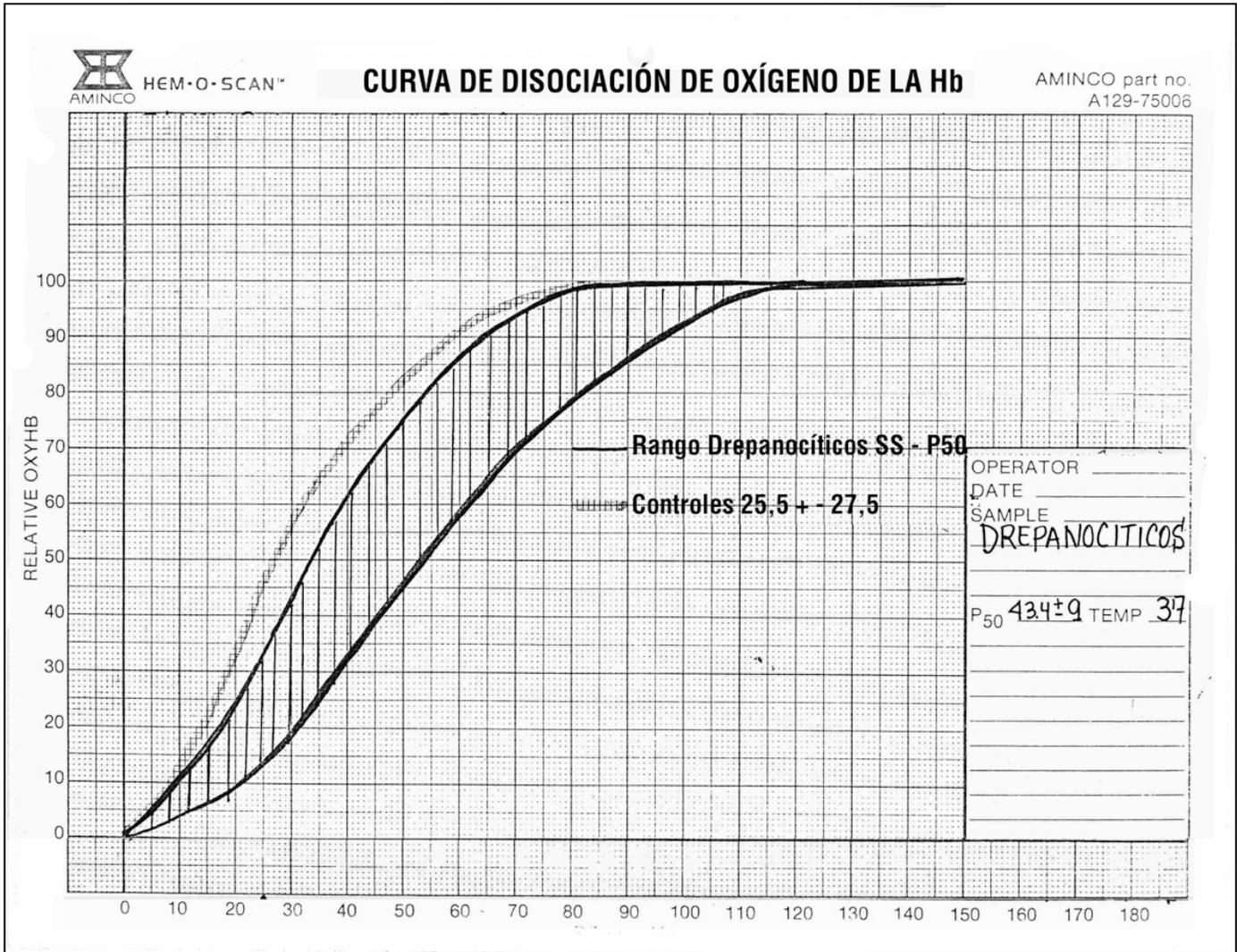
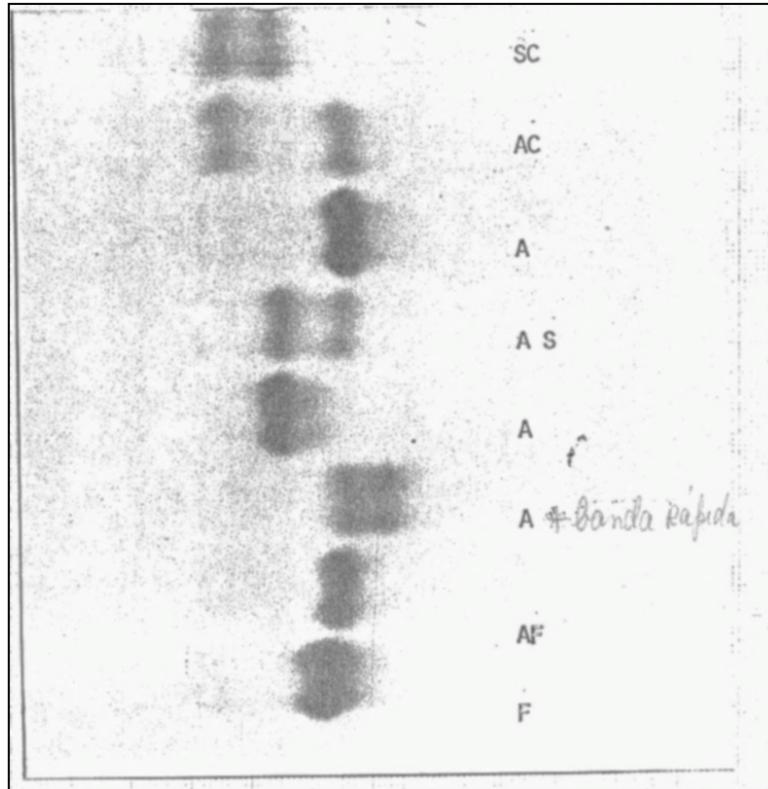
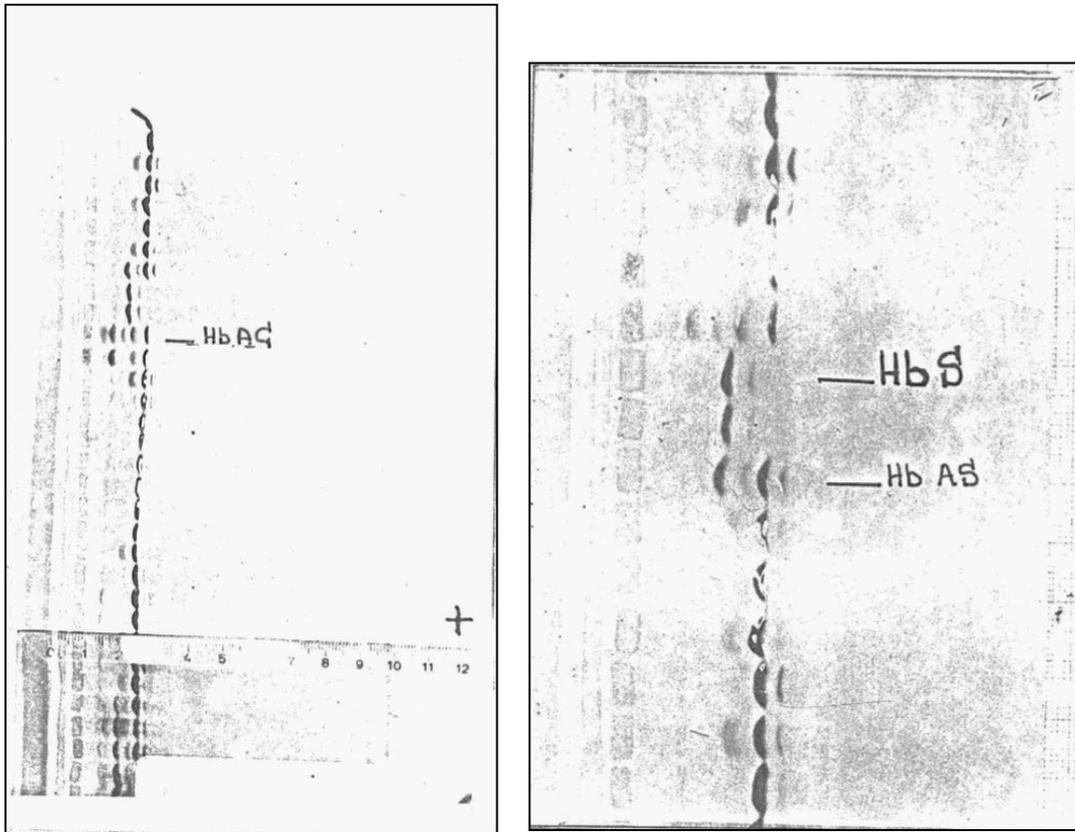


FIGURA No 35
ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA A ph 8.6



En el electroenfoque de Hb en gel de poliacrilamida observamos una banda principal de HbS con bandas menores catódicas de meta Hb (inmediatamente por detrás de la HbS) y dos bandas menores anódicas de meta Hb intermedia (inmediatamente por delante de la HbS), de Hb Fetal I (2ª. Banda por delante de la Hbs) y de Hb A3) 4ª bandapor delante de la HbS) (Fig. N° 36).

FIGURA N° 36
ELECTROENFOQUE DE Hb MOSTRANDO
LAS HEMOBLOBONAS Hb S, HbAS, Hb AC

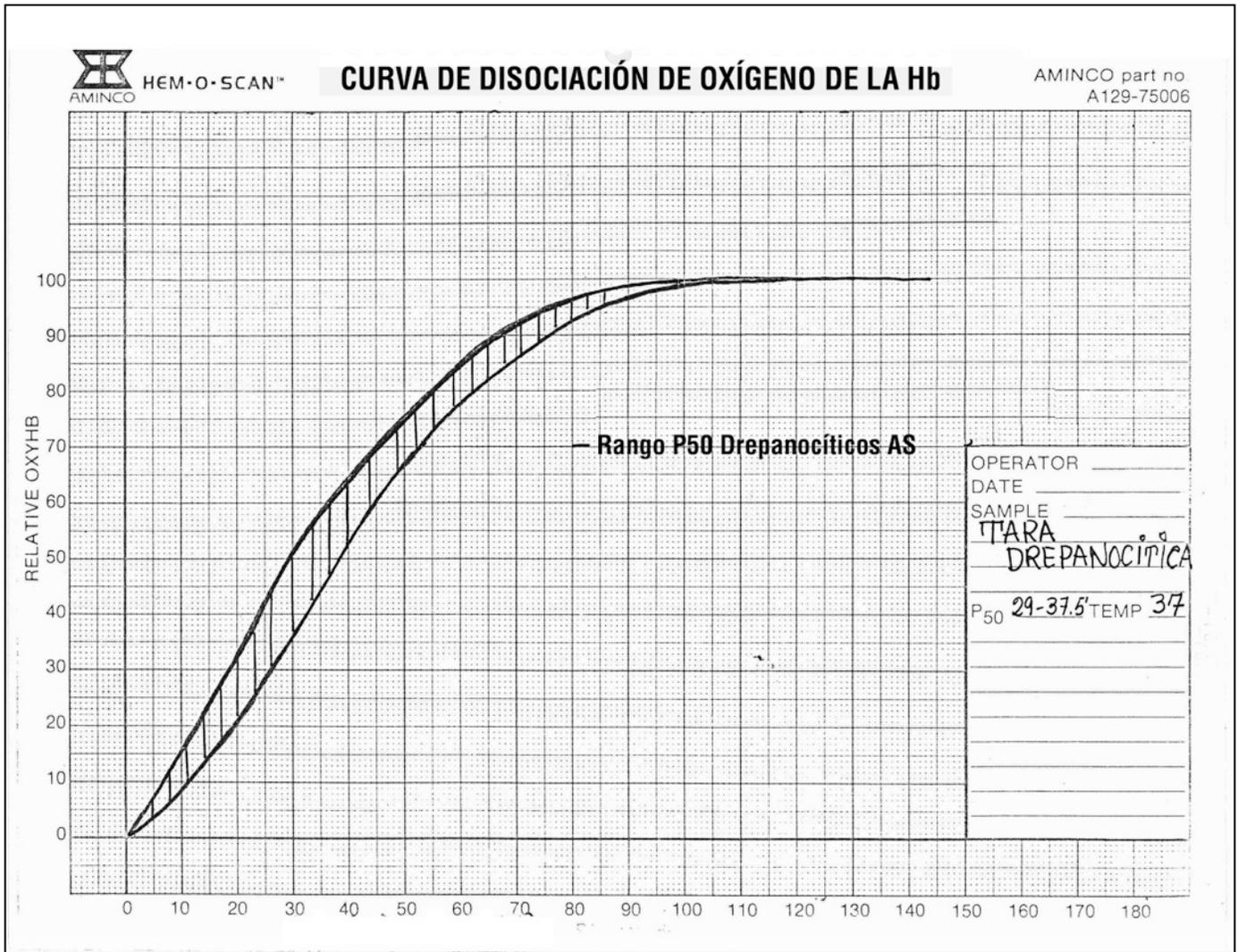


Las bandas de Hb Fetal I y Hb A1C se visualizaron muy tenues y solo inmediatamente después de corrido el gel. La banda de Hb A3 se observó solo en muestras conservadas varios días a 4° C. Las bandas de meta Hb desaparecieron al añadir KCN al hemolizado. La cuantificación de Hb A2 por la técnica de elución de las tiras de acetado de celulosa nos dio valores entre 0.82 – 2.16%, los cuales cayeron en el rango de nuestros valores normales. La cuantificación de los niveles intraeritrocíticos de Hb fetal mostró valores normales por debajo de 1% excepto en 4 pacientes, en los cuales se encontraron mayores de 1 g% ($5.58 \pm 3.6\%$).

Entre los familiares de los pacientes con drepanocitosis homocigótica se detectaron 41 pacientes con drepanocitosis heterocigótica (taras drepanocíticas), los cuales se

caracterizaron por estar asintomáticos clínicamente y por presentar valores hematológicos en sangre periférica normales con pruebas de solubilidad de la hemoglobina y la investigación de drepanocitos positivos. La curva de disociación de oxígeno de la Hb estuvo moderadamente desviada a la derecha con valores de P50 de: 29-37.5 mm Hg (Fig. N° 37)

FIGURA No 37



La electroforesis de Hb en acetato de celulosa a pH 8,6 mostró 5 bandos que migraron en dirección anódica de la siguiente manera: 1º) Banda de anhidrasa carbónica. 2º) Banda de Hb A2 3º) Banda de Hb S 4º) Banda de Hb F y 5º) Banda de Hb A1, siendo las principales las bandas de Hb A1 y S (Fig. N° 32)

El electroenfoque de estas hemoglobinas AS mostraron 8 bandas que migraron en dirección anódica de la siguiente forma: Hb A2, meta Hb, Hb S, bandas intermedias de meta Hb, Hb F, Hb A1 y Hb A1C y Hb A3, siendo las principales la Hb A1 y Hb S en cantidades proporcionales (Fig. N° 36).

Igualmente se detectaron 5 pacientes con hemoglobinopatías heterocigotas AC, los cuales clínicamente eran asintomáticos. Las pruebas de investigación de drepanocitos, de solubilidad e inestabilidad de la Hb negativas. La Electroforesis de Hb en acetato de celulosa a pH 8.6 mostró las siguientes bandas que migraron del cátodo al ánodo: 1) Banda de anhidrasa carbónica 2) Banda de Hb C, 3) Banda de Hb F 4) Banda de Hb A1, siendo las bandas principales las Hbs. A1 y C. En electroenfoque en gel de poliacrilamida observamos 8 bandos 1). HbC 2). Hb A2, 3). meta Hb, 4) Bandas intermedias de meta Hb, 5) Hb F I, 6), Hb A 1, 7).Hb A1 C, 8) Hb A3, sucediendo lo mismo que con los electroenfoques anteriores las bandas menores débiles se visualizan muy tenuemente y se difunden a los pocos minutos de terminado el electroenfoque.(Figs. Nos. 35 y 36).

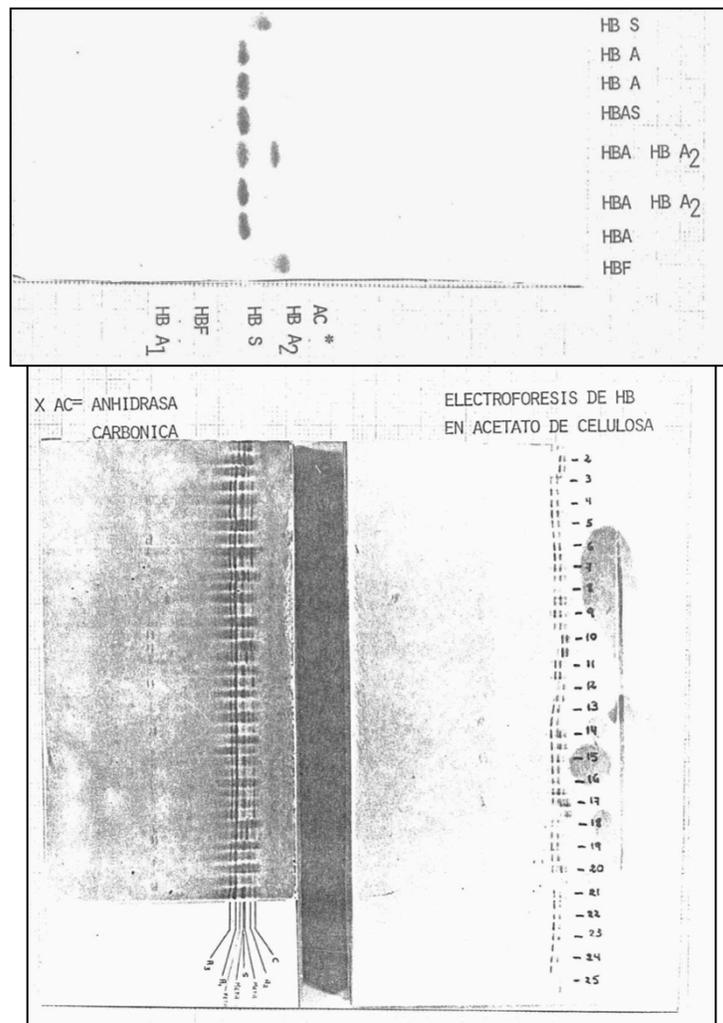
TALASEMIA MENOR

Se detectaron 26 pacientes con talasemia menor, los cuales clínicamente eran asintomáticos, pero presentaban anemia discreta con cifras de Hb de 9.4 -13,7 g% y de Hto 32-44.8% con índices globulares disminuidos VCM = 61-68 micros HCM =17.1-20.3 pg, CHCM = 28.4-30.6% Retic: 1-4.4%.

Los frotis de estos pacientes se caracterizaron por microcitosis 1+ o 2+ con hipocromía de 1+ o 2+, dianocitosis 1 o 2+. Las anomalías morfológicas de la serie roja, no estaban

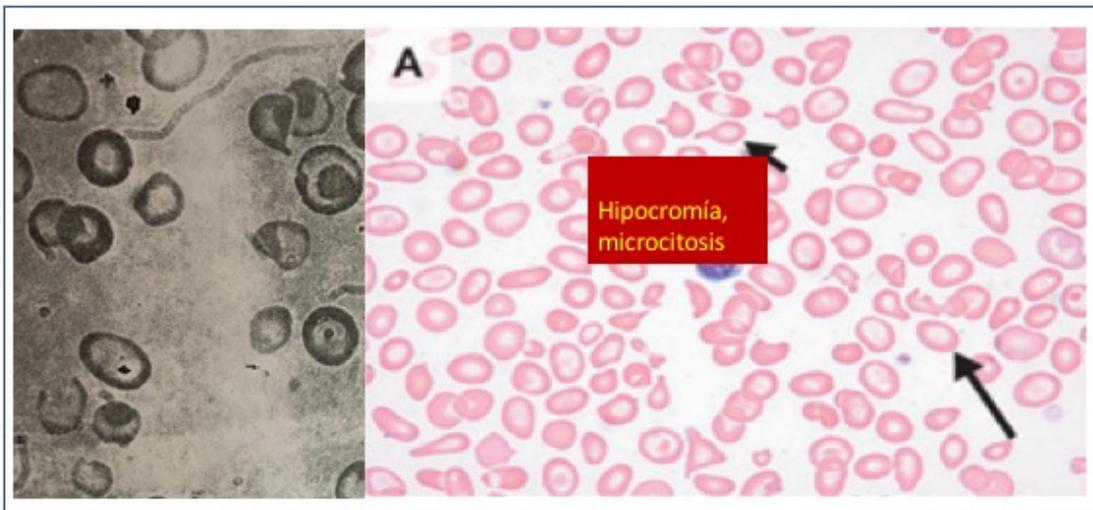
en relación con el grado de anemia, ya que de acuerdo o lo visualizado en el frotis de sangre periférica esperaríamos encontrar un nivel de Hb más bajo. La curva de fragilidad globular se encontró normal. El perfil para detectar hemoglobinopatías fue normal o excepción que en electroforesis y electroenfoque se observó la Hb A₂ elevada y al cuantificarla encontramos valores de Hb A₂: 5,02 + 0.84% (VN = 2,0 ± 0.08%) con valores normales Hb F (Fig. N° 38).

FIGURA No 38
ELECTROENFOQUE DE DIFERENTES
VARIANTES DE HEMOGLOBINA



Además, se hizo el diagnóstico en un caso de talasemia intermedia en un paciente masculino de 14 años de edad, natural de Portugal, el cual clínicamente presentaba anemia moderada, con antecedentes de transfusiones frecuentes preesplenectomía. Los exámenes de laboratorio practicados al paciente mostraron Hb = 7,7g%, Hto.= 33,3%, conteo rojo = $4,01 \times 10^6 \text{ mm}^3$, VCM = 83 micras³, HCM = 19,1 pg., CHCM = 23,1%, conteo blanco = $17,9 \times 10^3/\text{mm}^3$, conteo de plaqueta $448 \times 10,3/\text{mm}^3$, conteo de reticulocitos: 4%, curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina ligeramente desviada a la derecha con un P50 = 33 mmHg. Electroforesis de hemoglobina = AA. Cuantificación de hemoglobina A2 aumentado = 7.14%, Cuantificación de hemoglobina fetal aumentada = 8%, Cuerpos de Heinz positivo. El frotis de sangre periférica mostraba poiquilocitosis 3+, anisocitosis 3+, hipocromía 3+, esferocitos 1+, dianocitosis 1+, esquistocitos 1+, acantocitos 1+, crenocitos 1+, cuerpos de Howell Jolly, y policromatofilia presentes, microcitos +, (Fig N° 39).

FIGURA N° 39
FROTIS DE SANGRE DE PACIENTE CON TALASEMIA INTERMEDIA ,
SE OBSERVA POIQUILOCITOSIS, HIPOCROMÍA, MICROCITOSIS,
DIANOCITOSIS



El estudio de laboratorio de la madre y el padre de este paciente reveló que ambos eran portadores de la tara talasémica (Tabla N° XIX)

TABLA N° XIX
VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA FAMILIA LDO.

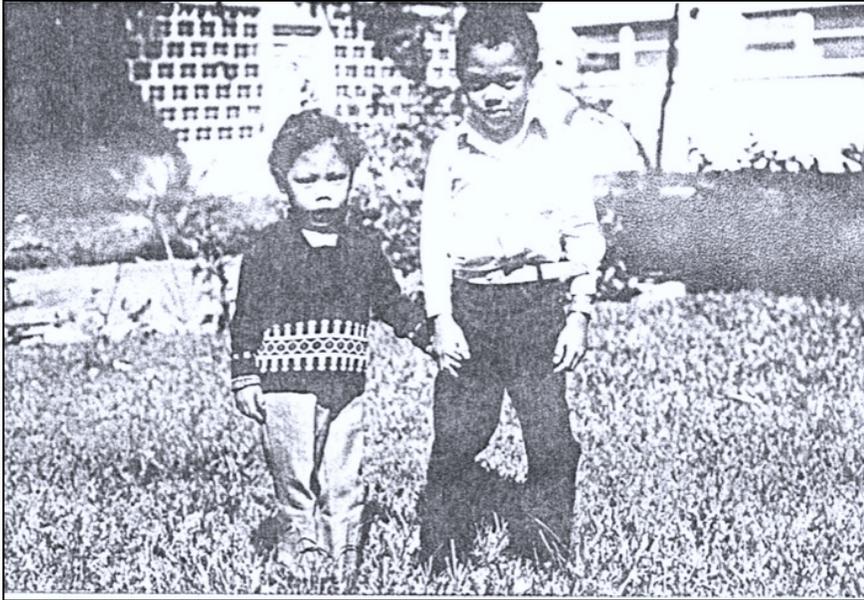
	PACIENTE	PADRE	MADRE
Contaje rojo x 10 ³ /mm ³	4.01	7.22	4.97
Hb g%	7.7	13.8	11.1
Hto. %	33.3	46.4	38.5
Contaje de reticulocitos	2.4	2	2
Contaje de Gl. Blancos x 10 ³ /mm ³	17.9	6.6	7.6
Contaje de plaquetas x 10 ³ /mm ³	448	226	210
VCM micras ³	83	64	78
HCM pg	19.1	19.1	22.3
CHCM %	23.1	29.7	28.9
Fe (40-110) mcg%	-	119	110
Proteínas totales (4.3-8.5 g%)	-	6.7	6.8
Calcio (9.6- 10.2 mg%)	-	9.8	9.7
P (3.7-4.1 mg%)	-	3.4	3.6
Acido úrico (4.8-5.6 mg%)	-	4.2	3.9
Bilirrubina total (0.3-1.2 mg%)	-	0.5	0.6
Fosfatasa Alcalina (91-III U/l)	-	74	40
LDH (173-209 U/l)	-	152	128
SGOT (25-370 U/l)	-	27	18
BUN (19-21 MG%)	-	16	7
Creatinina (1-1-6 mg%)	-	1.8	0.7
Electroforesis Hb	AA	AA	AA
Cuantificación Hb A2= (2.19-3.13)	7.14	5.29	3.61
Cuantificación Hb F= (0.57 ± 043%)	8	0.2	0.2

DELTA BETA TALASEMIA

Un lactante de 2 años de edad, natural de la Guaira, Distrito Federal, de raza mestiza fue referido por anemia e ictericia permanente desde los 6 meses de edad. El paciente es el producto de una II gesta y un parto eutócico, con antecedentes de ictericia neonatal (que requirió fototerapia), diarrea frecuente, síndrome febril intermitente, agravamiento de la ictericia y presencia de coluria secundaria a síndromes gripales. Al examen físico se encontró un lactante con retraso pondo-estatural, facies mongoloide, prominencia de los huesos: frontal, parietales, malares y maxilar superior con exposición de los dientes, tinte icteríco en conjuntivas, microadenopatías cervicales, protrusión de abdomen con apariencia de hepatomegalia a 5 cm del reborde costal derecho y esplenomegalia a 7 cm del reborde costal izquierdo (Fig. N° 40).

FIGURA 40

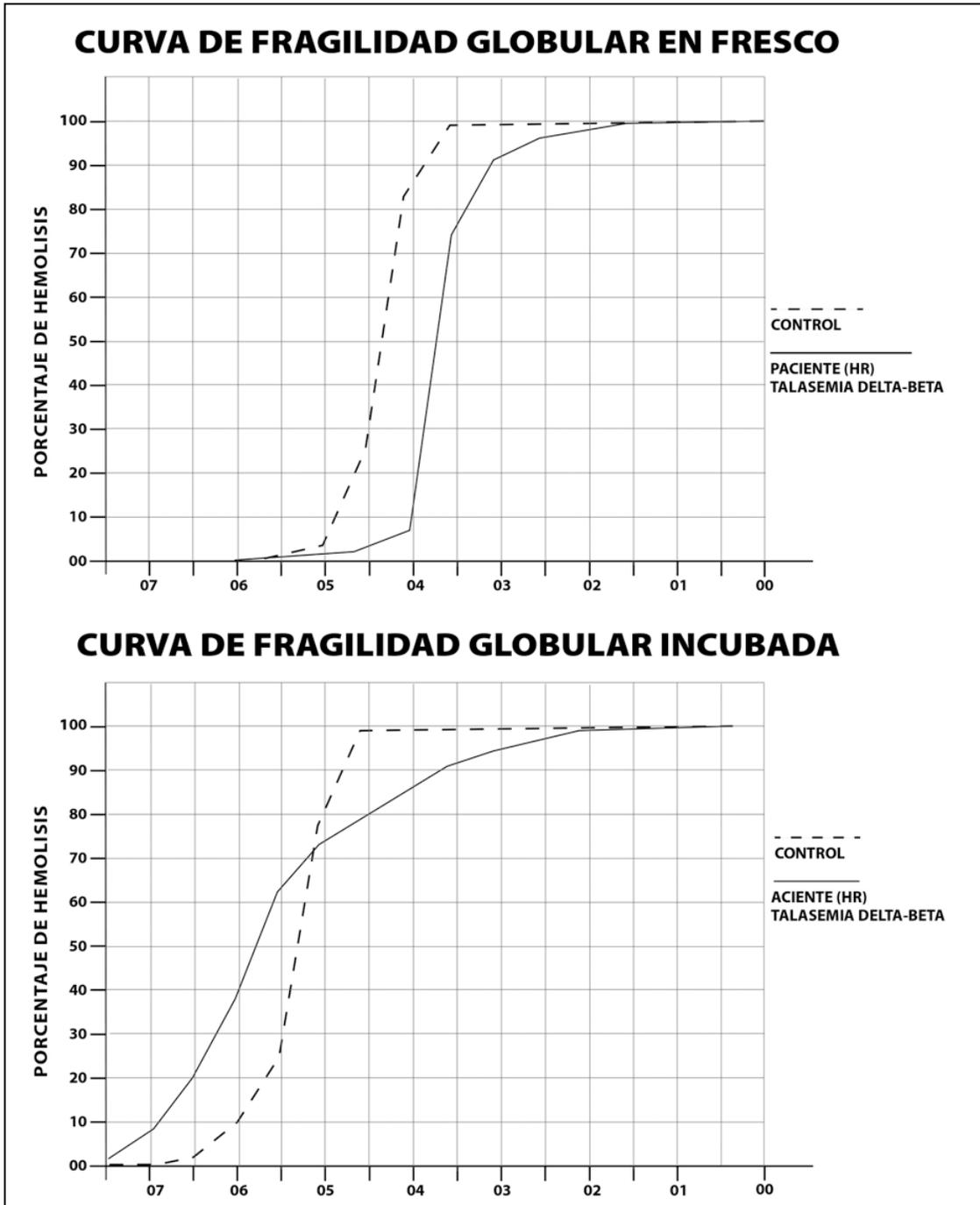
PACIENTE CON DELTA-BETA TALASEMIA. SE OBSERVO PROMINENCIA DE HUESOS FRONTALES, Y MAXILAR SUPERIOR CON NARIZ EN SILLA DE MONTAR



PACIENTE (IZQ). MUESTRA DISMINUCIÓN DEL DESARROLLO PONDOESTATURAL. NIÑO A LA DERECHA ES HERMANO DE 6 AÑOS DE EDAD

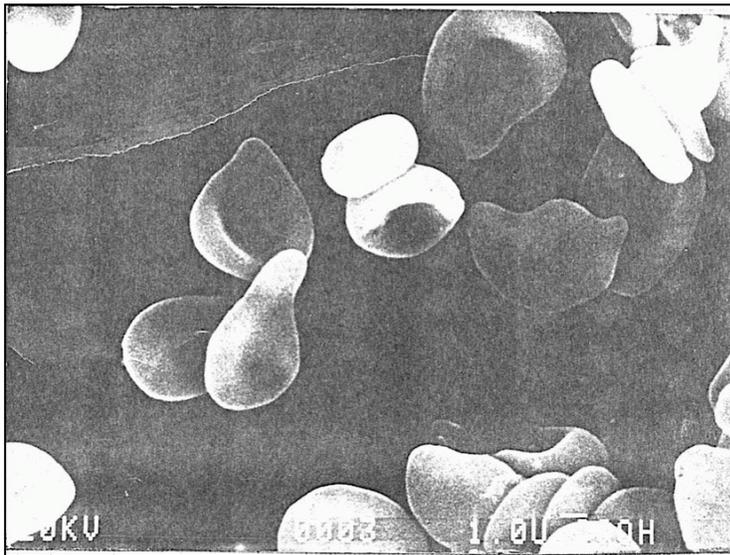
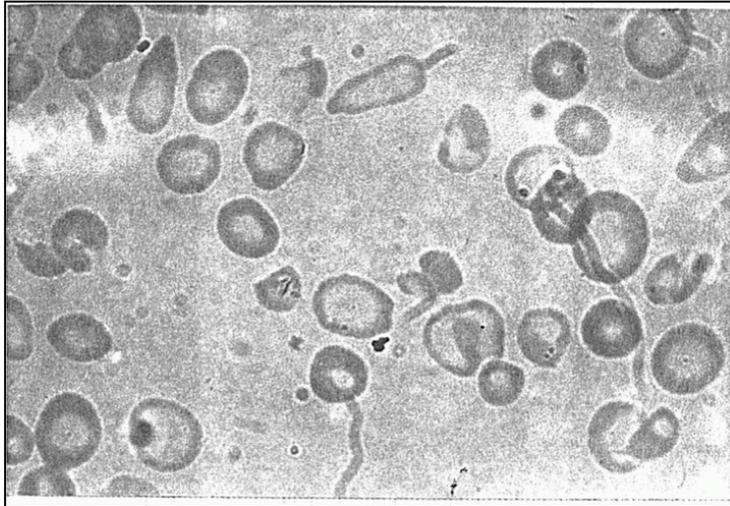
La hematología practicada mostró Contaje rojo: $3570000/\text{mm}^3$, Hb= 6,8 g%, Hto= 27.3%, VCM= 77 micras³, HCM= 19,1 pg., CHCM= 25%, Contaje blanco= 13200/ mm^3 , Fórmula: 28 neutrófilos, 1 banda, 62 linfocitos, 4 monocitos, 4 eosinófilos, 1 metamielocito. Contaje de plaquetas: $146.000/\text{mm}^3$, Contaje de reticulocitos: 15,2%. Curva de fragilidad globular desviada a la Derecha (Fig. No 41-A)

FIGURA N° 41 -A



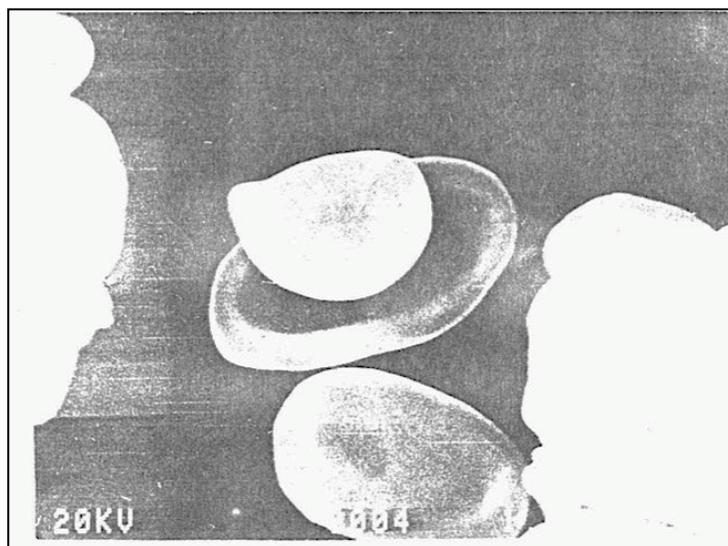
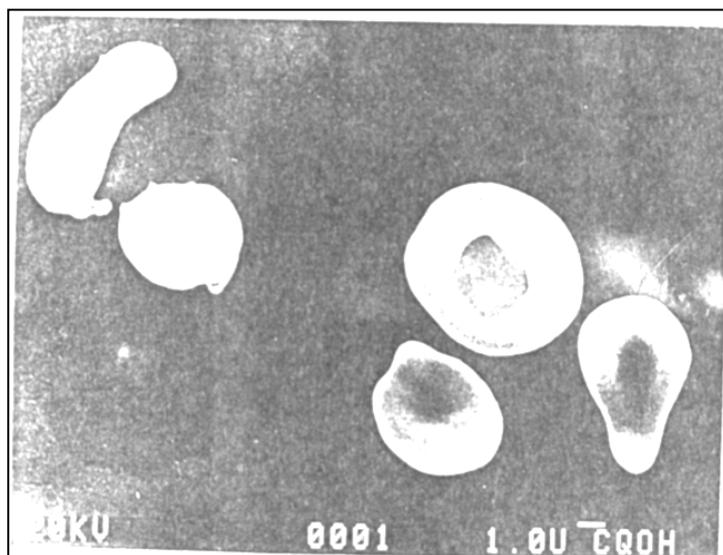
El frotis de sangre periférico mostro: hipocromía 3+. Anisocitosis 3 +, poiquilocitosis 3+, policromasia 2+, dianocitosis 2+, esquistocitos +, células en lagrima 1 +, Normoblastos 60 % (Fig. N° 41- A y B)

FIGURA 41 -B
FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA DEL PACIENTE CON DELTA-BETA
TALASEMIA, SE OBSERVA MARCADA HIPOCROMÍA,
POQUILOCITOSIS, MICROCITOSIS



ERITROCITOS DEL PACIENTE CON DELTA-
BETA TALASEMIA VISTO AL MICROSCOPIO
ELECTRÓNICO DE BARRIDO, SE OBSERVA
MARCADA POIQUILOCITOSIS

**ERITROCITOS DEL PACIENTE CON DELTA-BETA TALASEMIA
SE OBSERVA MARCADA POIQUILOCITOSOS**



Perfil Químico:

Fe = 134 mcg% (40-110 mcg%)

Capacidad total de fijación = 371 mcg% (300-400 mcg%)

Proteínas totales = 5.4 g% (6-8.5g%)

Colesterol 182 mg% (140-270 mg%)

Bilirrubina Total: 9.94 mg% (0.2-1.2mg%)

Bilirrubina Directa: 0.49 (hasta 0.25)

Urea = 14mg% (10-26 mg%)

Creatinina = 0.7mg% (0.7-1.4 mg%)

SGOT= 51 U/lit (7-40 U/lit)

SGPT 22 U/lit (7-40 U/lit)

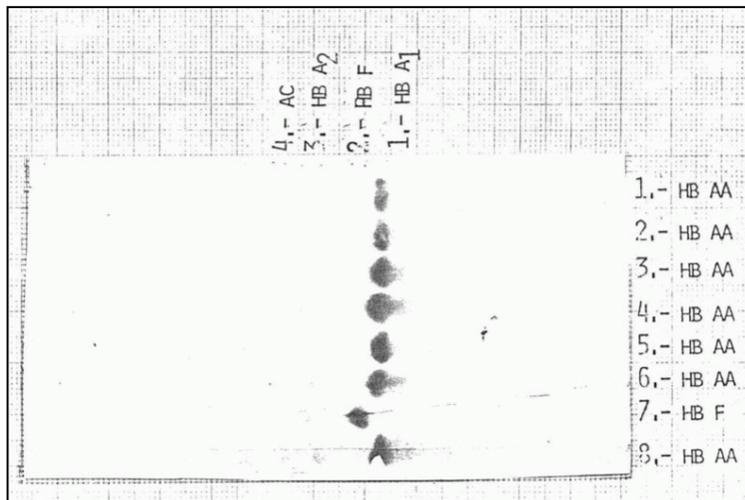
Fosfatasas alcalinas = 104 U/lit (30-115 U/lit)

Calcio = 8.3 mg% (8.5-10.5 mg%)

Hemosiderinuria: positiva (1+)

Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa a pH 8.6 mostró en dirección anódica: una banda menor de anhidrasa carbónica, una 2a. banda de hemoglobina A₂ y una banda principal muy fuerte de hemoglobina fetal (Fig. N° 42). El electroenfoque de hemoglobina mostró las mismas bandas excepto que la hemoglobina fetal estaba presente en dos bandas FI y F II. La curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina estuvo desviada a la izquierda con un P50 de 22 mmHg (Fig. N° 43).

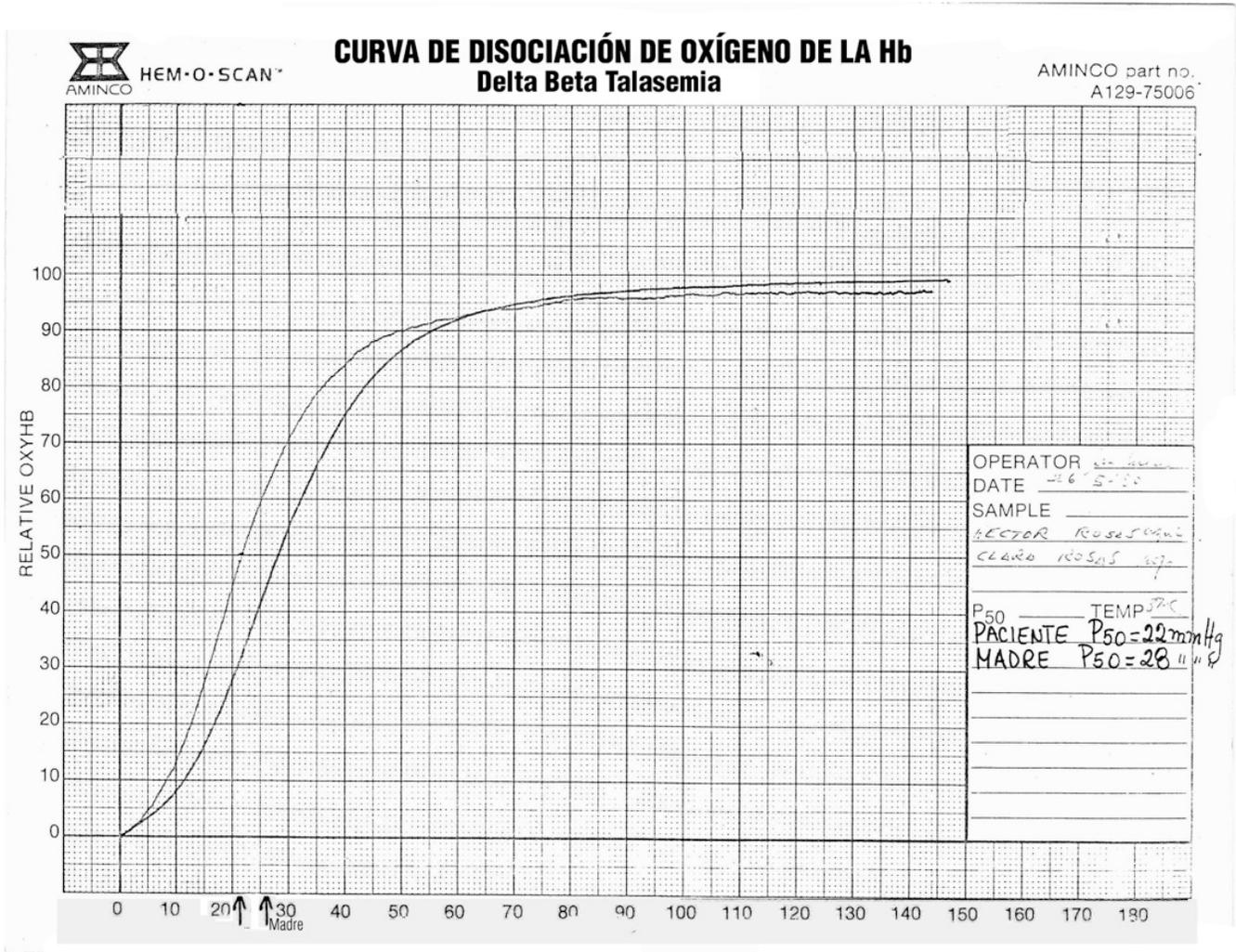
FIGURA N° 42



ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA A PH 8.6, SE OBSERVA QUE EL PUESTO N° 7 MICRAS DE HB DEL PACIENTE CON DELTA BETA TALASEMIA, SE OBSERVA EN DIRECCIÓN ANODICA, LAS SIGUIENTES BANDAS:

1. Anhidrasa carbónica
2. Hb A₂
3. Hb F
4. HbA₁

FIGURA No 43



La síntesis de cadenas de globina reveló solamente presencia de cadenas alfa y delta.

(Fig. No 44).

FIGURA N° 44
SINTESIS CADENAS DE GLOBINA TALASEMIA ALFA Y BETA



PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFIA EN CARBOXIMETILCELULOSA DE LA HEMOGLOBINA DEL PACIENTE CON DELTA-BETA TALASEMIA. SE OBSERVAN 3 PICOS DE IZQUIERDA A DERECHA: 1) UN PICO ALTO DE MATERIAL NO LIGADO 2) UN PICO DE CADENA ALFA Y 3) UN PICO DE CADENA BETA

La radiografía de cráneo mostró hiperplasia de la médula ósea de los huesos frontales dando la apariencia de cráneo en cepillo (Fig. N° 45). Igualmente se observó prominencia del hueso maxilar superior.

FIGURA N° 45
RADIOGRAFIA DE CRÁNEO DE PACIENTE CON DELTA BETA TALASEMIA MOSTRANDO CRÁNEO EN CEPILLO Y PROMINENCIA DE HUESO MAXILAR SUPERIOR



La madre y el hermano de este paciente también fueron estudiados, encontrándose que la madre era portadora de la tasa talasémica (Tabla N° XX).

TABLA N° XX
DATOS DE LABORATORIO. FAMILIA LAGUNA

EXAMEN	OL (Madre)	FL (Proposito)	JL (Hermano)	DL (Tia)	JAL (Primo)	IAL (Prima)
Contaje Blanco x 10 ³ /mm ³	7.8	7.1	7.3	4.9	8.5	10.1
Contaje Rojo x 10 ⁶ /mm ³	4.42	3.99	3.81	4.3	-	-
Contaje plaquetario x 10 ³ /mm ³	300	320	250	300	350	128
Hb g%	12.3	11	11.6	12.5	13.4	41
Hematocritos %	42.5	40.5	38.5	41	42	81
VCMU ³	94	101	75	90	80	31
HCM pq	28	28	30.4	29	30	33
CHCM %	29	27	30.1	30.5	32	66
Segm	66	51	46	55	62	26
Linfo.	27	35	30	38	32	3
Monocitos	6.0	8	10	5	3	4
Eosinófilos	1	4	13	2	3	0
Basófilos	0	1	1	0	0	0
Reticulocitos	0.6	10.6	1.3	0.8	0.6	0.8
Frotis	Normal	Normal	Hipocromía	Normal	Normal	Normal
Proteínas totales (6-8.5 mg %)	6.7	7.4	3.2	7.9	-	-
Ca /8.5-10 mg %)	8.5	9.4	9.1	9.1	-	-
P (2.5-4.5 mg %)	3.0	4.0	4	3.2	-	-
Colesterol (140-270 mg %)	139	110	78	212	-	-
Glucosa (72-128 mg %)	75	80	90	92	-	-
Acido úrico 2.2-9 mg %)	4.4	3.2	1.7	4.2	-	-
Bilirrubina Total (0.2-1.2 mg %)	0.9	4.4	0.2	1.2	-	-
Bilirrubina indirecta (-0.2 mg %)	0.3	3.8	0.1	0.2	-	-
Fosfatasa alcalina (30-115 u/l)	40	140	200	115	-	-
LDH (100-225 u/l)	100	300	250	200	-	-
SGPT (7-40 u/l)	20	35	30	7	-	-
SGOT (7-40 u/l)	23	29	24	26	-	-
Nitrógeno Ureico (10-26 mg %)	9	9	3	10	-	-
Creatinina Sérica (0.7-1.4 mg %)	0.7	0.5	0.3	0.9	-	-
Hemosiderinuria	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Combs Directo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Combs Indirectos	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Porcentaje Meta Hb						
Porcentaje Sulfo Hb						
Pruebas Pantallas; G6PD	N	N	N	N	N	N
TPI Triosfosfatoisomerasa	N	N	N	N	N	N
GR Glutiónreductasa	N	N	N	N	N	N
PK Piruvato quinasa	N	N	N	N	N	N
NADH Meta Hb reductasa	N	N	N	N	N	N
Curva de fragilidad globular en fresco e incubado	N	N	N	N	N	N
Cuantificación enzimas ciclo Glicolítico	N	N	N	N	N	N
Hexosa monofosfato	N	N	N	N	N	N
Glutation	N	N	N	N	N	N
Curva de disociación de oxígeno	N	N	N	N	N	N
P50 mmHg	26	27	29	26	26	26
Electroforesis Hb pH 8.6	AA	anormal	AA	AA	AA	AA
Electroenfoque de Hb	AA	anormal	AA	AA	AA	AA
Cuantificación Hb A2	2.77	1.77	2.26	2.23	2	2.2
Cuantificación Hb Fetal	0.60	0.25	0.2	0.5	0.3	0.4
Cuerpos de Heinz	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Prueba de Inestabilidad al calor	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
Curva espectrofotométrica de la:						
Oxi-Hb	N	N	N	N	N	N
Meta Hb	N	N	N	N	N	N

HEMOGLOBINAS INESTABLES

ANEMIA HEMOLÍTICA CONGÉNITA ASOCIADA A UNA VARIANTE INESTABLE DE HEMOGLOBINA

1.- Anamnesis

Se trata de un paciente masculino de 12 años de edad, natural de Velera Edo. Trujillo, quien, a los 2 años de edad, a raíz de haber presentado una amigdalitis desarrolló ictericia con coluria. El paciente mejoró con tratamiento médico pero la ictericia ha persistido a través de los años, agravándose con infecciones gripales.

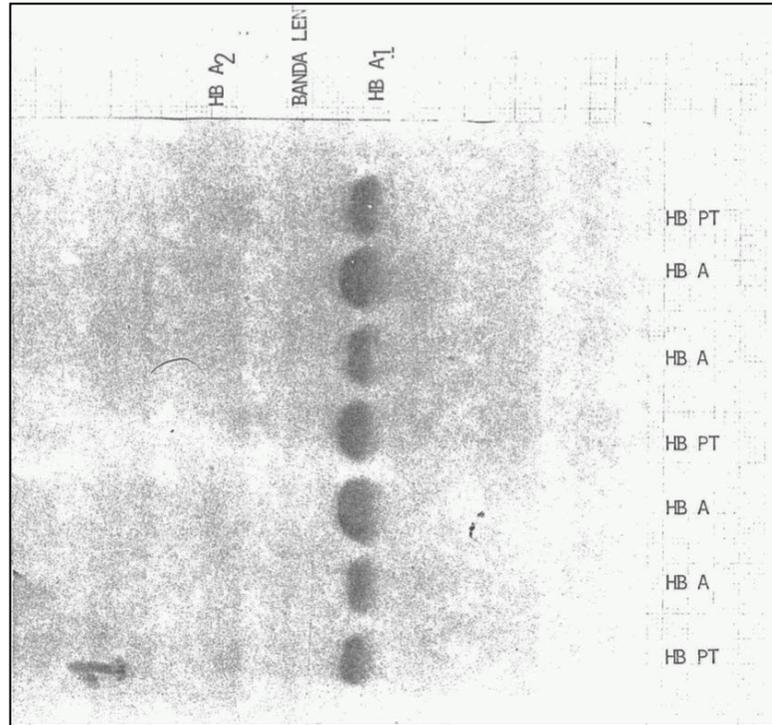
La familia está compuesta del padre de 34 años de edad, la madre de 34 años de edad y 2 hijos: el propósito un hermano de 7 años de edad. No hay antecedentes familiares de ictericia.

Al examen físico se encontró un escolar de raza mestiza con un desarrollo pondo estatural y psíquico normal. Ictericia leve de piel y mucosas, acompañadas de esplenomegalia (4 cm. RCI).

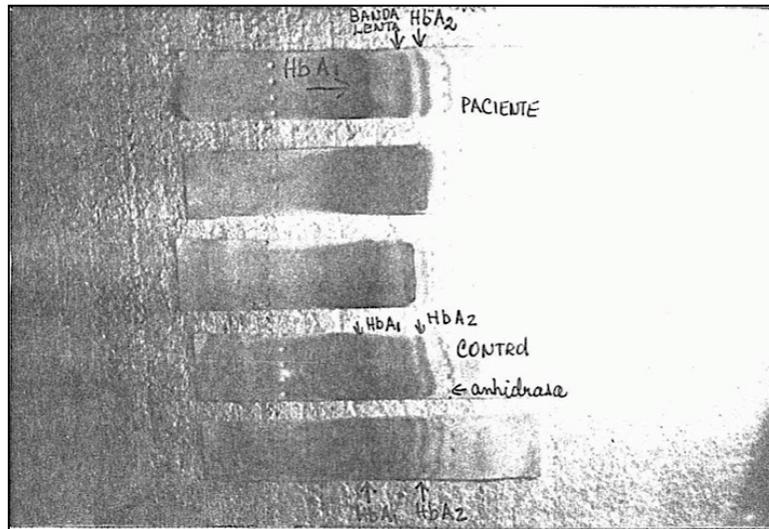
2.- Estudios de Laboratorio (Tabla N° XXIII).

Lo hematología mostró una anemia leve con reticulocitosis moderada del 10.6%. El perfil químico mostró hiperbilirrubina de 4.4 mg% a expensas de la indirecta con aumento de fosfatasas alcalinas y deshidrogenasa láctica. La electroforesis de Hb corrida en buffer tris HCl a pH 8.6 reveló una banda débil lenta, por detrás de la Hb A correspondían a las Hb lentas más comunes tales como Hb A₂, S, C, etc. (Fig. N° 46). Dicha banda también fue visualizada por el método de electroenfoco.

FIGURA N° 46



ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA A PH 8.6 MOSTRANDO MIGRACIÓN DE LA HEMOGLOBINA NORMAL A (PUESTOS NUMEROS 2,3,5, Y 6) Y DE LA HEMOGLOBINA DEL PACIENTE (HB PT) EN PUESTO 1,4,7.



La prueba de inestabilidad de la hemoglobina fue fuertemente positiva, antes de los 3 minutos. Cuerpos de Heinz negativos. El perfil para detectar eritroenzimopatías fue normal. Los mismos estudios practicados al propósito se les practicaron a sus familiares: madre, hermano, tía, 2 sobrinas. Todos los familiares eran normales hematológicamente y no se encontró la hemoglobina inestable que presentó el propósito.

VARIANTE INESTABLE RAPIDA DE HEMOGLOBINA

Entre los donantes de sangre que se usaron como controles se encontró un donante que poseía una variante rápida de hemoglobina. Se trataba de un paciente masculino de 50 años, natural de Caracas, asintomático cuyos exámenes de laboratorio mostraron Hb = 13.5 g% ; Hto = 44%, Contaje rojo = $5.4 \times 10^6 / \text{mm}^3$, Contaje blanco = $6 \times 10^3 / \text{mm}^3$ Contaje plaquetario = $300 \times 10^3 / \text{mm}^3$; Fe = 148 mcg %, proteínas totales: 7.8 g%, calcio = 10.6 mg%, P = 3.6 mg%, glucosa = 95 mg%, ácido úrico = 7.5 mg%, bilirrubina total 0.6 mg%, fosfatasas alcalinas: 156 U/lt, LDH e 160 U/lt, SGPT = 23 U/lt, SGOT = 28 U/lt, Urea = 15 mg%, creatinina 1.1 mg%. Frotis de sangre periférica normal. Curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina normal, P50 = 25 mmHg (Fig. N° 47), electroforesis de hemoglobina a pH 8.6 mostró en dirección anódica dos bandas menores catódicas de anhidrasa carbónica y hemoglobina A 2 y dos bandas principales anódicas, la hemoglobina A y la hemoglobina rápida (Fig. N° 48)

FIGURA No 47

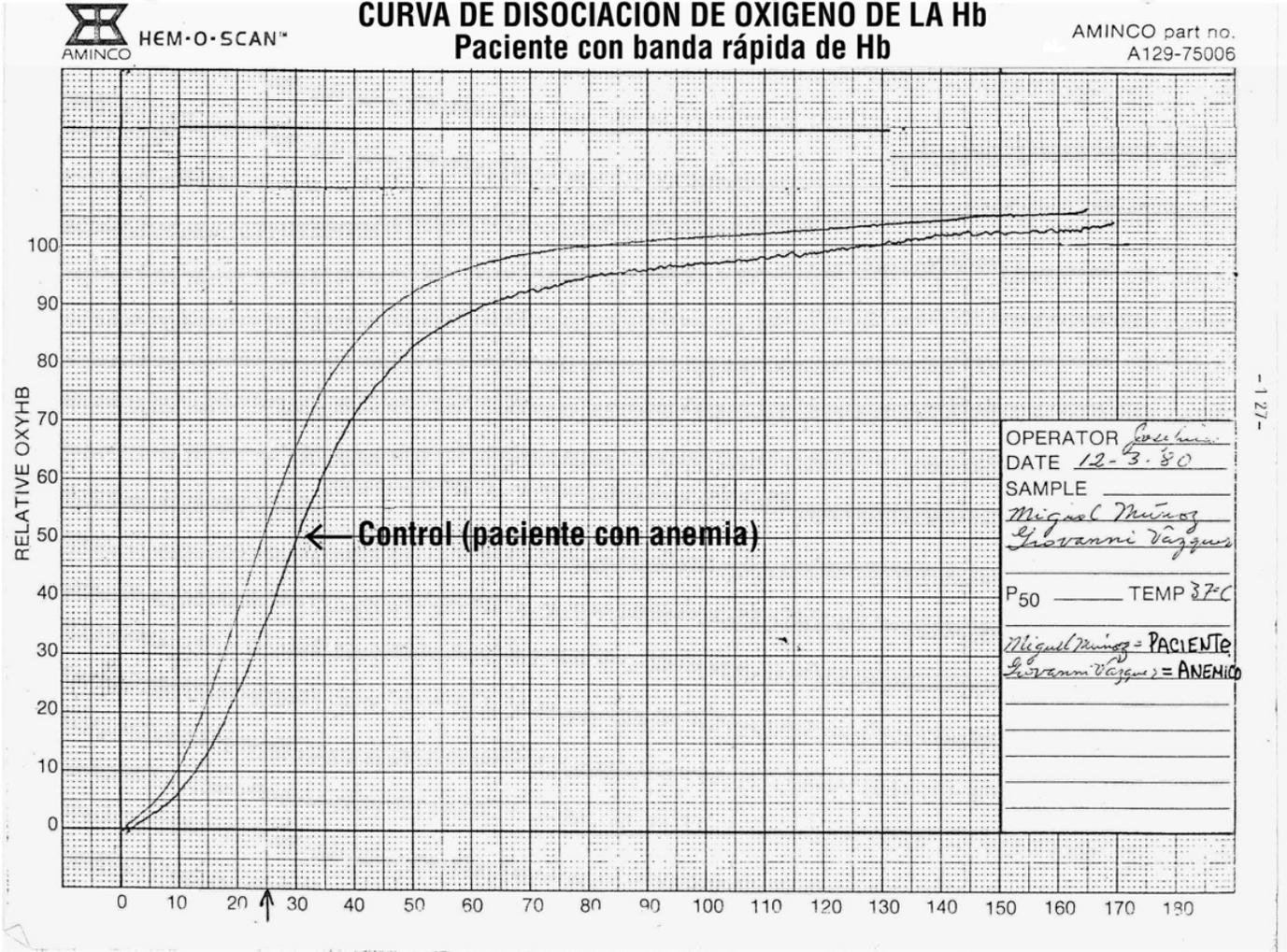
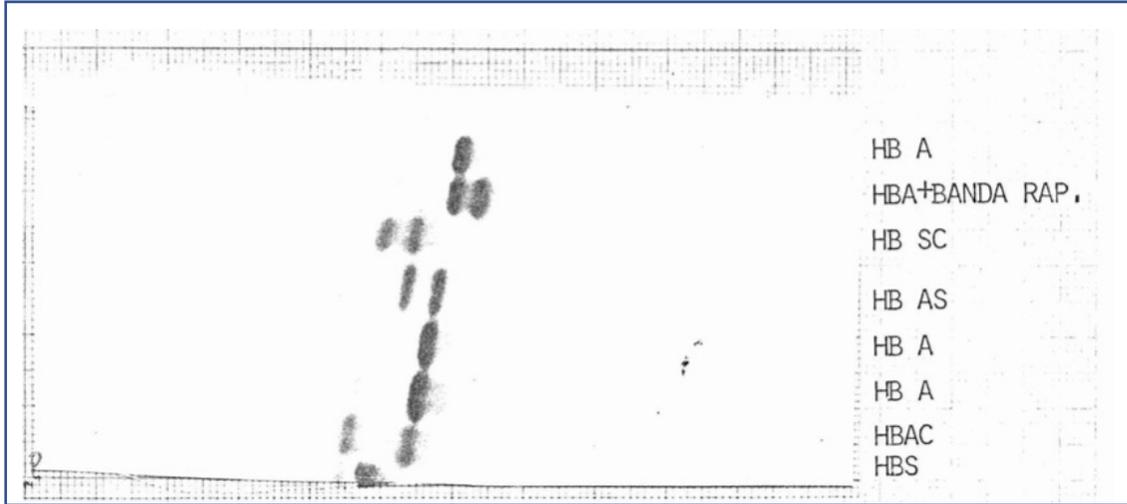
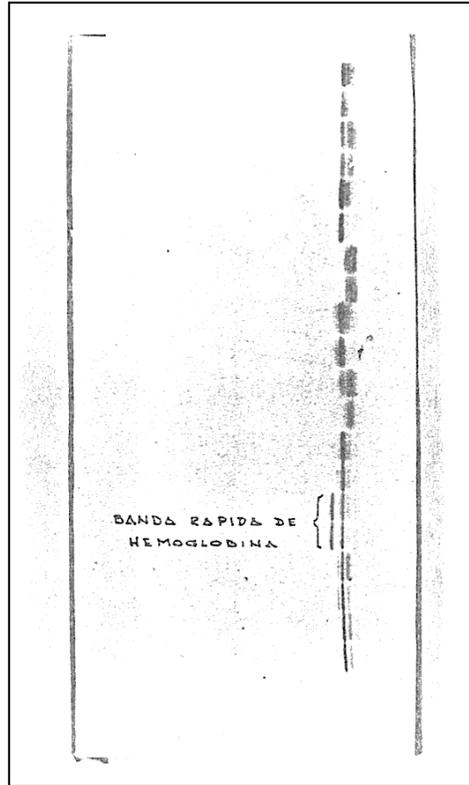


FIGURA N° 48
ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINA EN ACETATO DE CELULOSA
MOSTRANDO EN EL 2 LUGAR A LA HEMOGLOBINA RÁPIDA DEL
PACIENTE MM EN DIRECCIÓN ANÓDICA SE APRECIAN LAS
SIGUIENTES BANDAS 1) ANHIDRASA CARBÓNICA 2) HB A2 3) HB A₁ 4)
BANDA RÁPIDA DE HB, POR DELANTE DE LA HB A₁



El electroenfoque de hemoglobina también mostró esas dos bandas principales (Fig. N° 49). Las cuantificaciones de las bandas de hemoglobina detectadas mostraron los siguientes valores: Hb A = 58.13%; rápida; 58.13%, Hb A₂ : 2.06%; Hb Fetal: 0.05%. El perfil para detectar eritroenzimopatías fue normal.

FIGURA N° 49
ELECTROENFOQUE DE HEMOGLOBINA.
SE MUESTRA LA BANDA RÁPIDA DEL PACIENTE MM



**CIANOSIS PRODUCIDA POR UNA HEMOGLOBINA INESTABLE CON
BAJA A FINIDAD DE OXÍGENO**

1 ANAMNESIS Y EXÁMEN FÍSICO.

Un lactante de 8 meses de edad fue referido por presentar cianosis y disnea. La madre refirió que el niño nació de un parto normal y presentaba un crecimiento y desarrollo normal, cuando a raíz de habersele diagnosticado una infección urinaria, empezó a presentar cianosis. Dicha infección fue tratada con sulfas lo cual agravó la cianosis y condujo a una insuficiencia respiratoria aguda. Se descartó enfermedad cardiopulmonar. No hay antecedentes familiares de cianosis.

2. EXAMENES DE LABORATORIO

a) Hematología:

Contaje rojo: 5.280.000 x mm ³	(VN: 4.6 x 10 ⁶ x mm ³)
Hb: 15.9 g%	(VN: 12.1 g%)
Hto: 48%	(VN: 35.8)
Contaje Blanco: 6.700 x mm ³	(VN:
Contaje Plaquetario: 370 x 10 ³	(VN:
Reticulocitos: 1%	(VN: 1-2%)
VCM: 92.3 u ³	(VN: 77 u ³)
HCM: 30.5 pg	(VN: 26 pg)
CHCM: 33.1 %	(VN: 34%)

b) Química Sanguínea

Urea, creatinina, glicemia, colesterol, transaminasas, dehidrogenasa láctica, electroforesis de proteínas normales. La hematología y perfil químico de los padres fueron normales.

c) Exámenes especiales

- Investigación de Cuerpos de Heinz:
 - en fresco: Negativos.
 - incubados 48 h: positivo solamente en el paciente
- Prueba de Carrel y Kay para detectar hemoglobinas inestables: francamente positiva a lo 3 minutos (solamente en el paciente).
- Determinación de metahemoglobina:

Paciente: 2.6 g% (10%)

Padre: 0.5 g% (0.3 %)

M Madre: 0.8 g% (0.6 %)

C Control: 0.8 g % (0.5%)
- Determinación de Sulfohemoglobina: negativos.

5. Estudio espectroscópicos de oxihemoglobina de los hemolizados del paciente y sus padres: Normales.
6. Pruebas pantallas de Beutler para detectar deficiencias de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa , piruvato quinasa, glutatión reductasa, NADH meta Hb reductasa, triosa fosfato isomerasa: normales.
7. Determinación cuantitativa de NADH y NADPH meta Hb reductasas: Normales
8. Curva de disociación de oxígeno:
Propósito: desviada a la izquierda con un P 50 = 40 mm Hg (VN: 24 - 25 mm Hg.) (Fig. No 50).
Padre: Normal P 50 = 27 mm Hg (Normal = 26-27 mm Hg).
Madre: Normal P 50 = 27 mm Hg (Normal = 26-27 mm Hg).
El paciente y sus padres: mostró las bandas normales a 500 y 600 mm de longitud de onda desapareciendo esta última con cianuro de potasio.
9. Electroforesis de Hb en acetato de celulosa a pH 8.6; en agar citrato a pH 6; en agar fosfato a pH 7.1; en agar tris EDTA - borato a pH 7.1: Normales.
10. Electroenfoque en gel de poliacrilamida mostró una banda que migró más rápida que la Hb A1 normal con un punto isoeléctrico de aproximadamente 7.24 medido con electrodos de superficie. Dicha banda fue separada por electroenfoque preparativo y actualmente se encuentra en el proceso de análisis de AA. (Fig. N° 51).

FIGURA N° 50

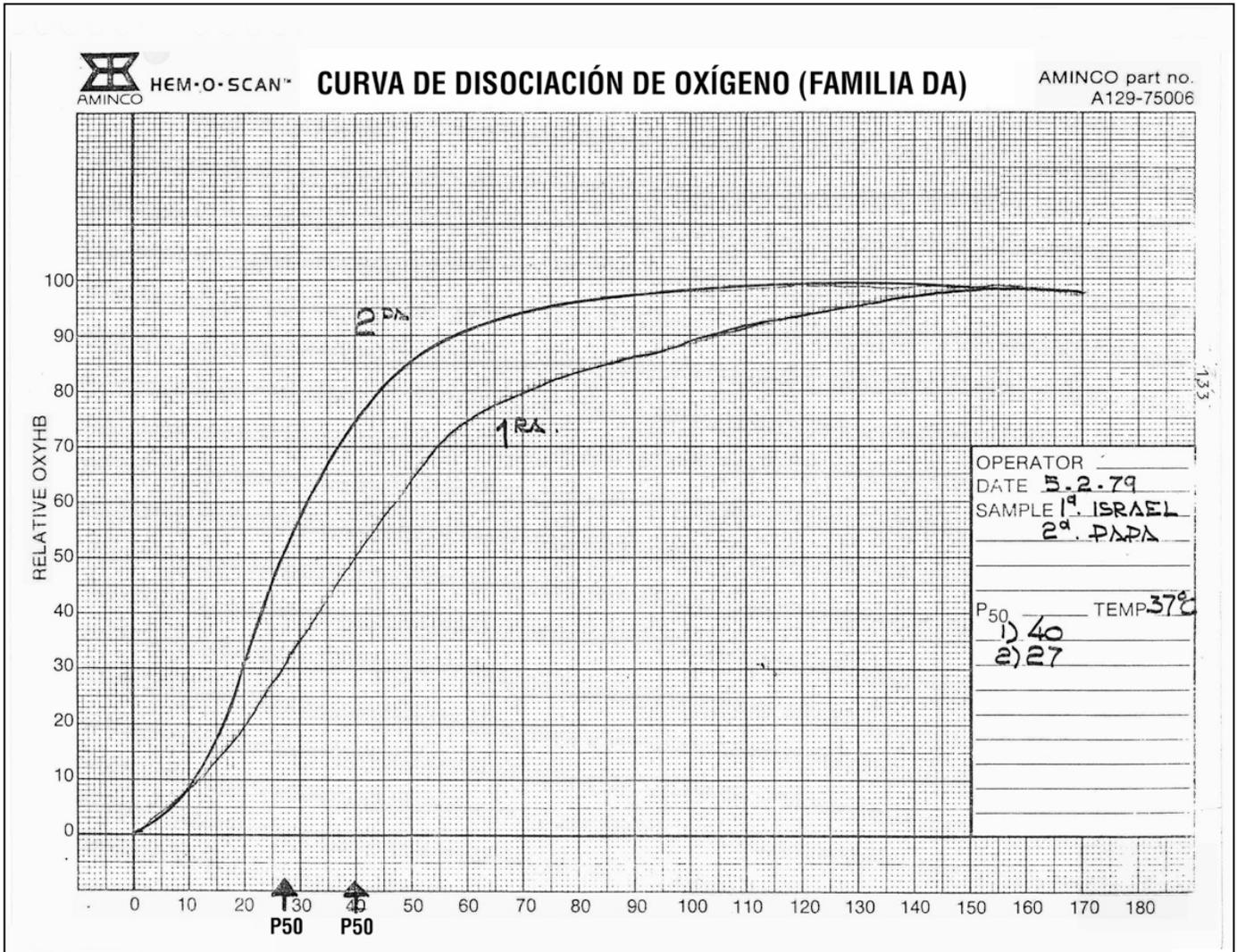
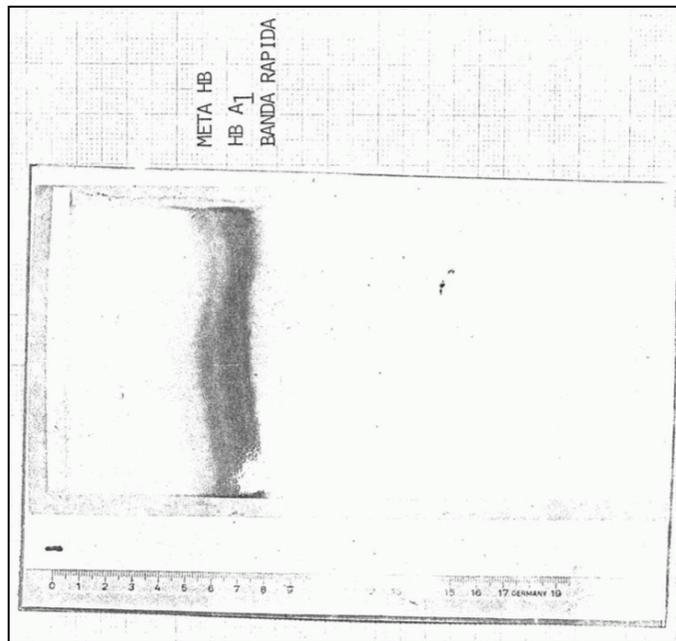


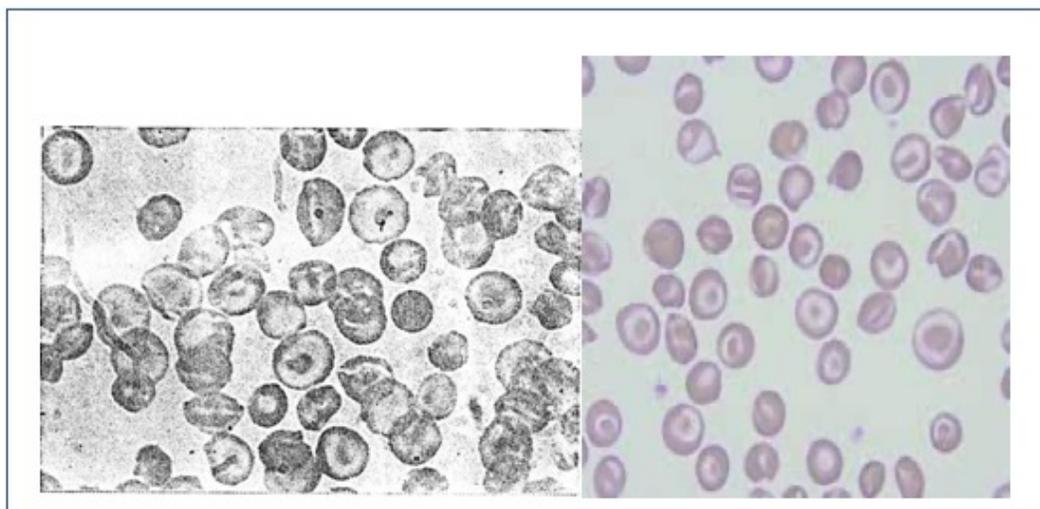
FIGURA N° 51
ELECTROENFOQUE PREPARATIVO DE HB. SE APRECIA BANDA
RÁPIDA DEL PACIENTE CON CIANOSIS PRODUCIDA POR UNA
HEMOGLOBINA INESTABLE CON BAJA AFINIDAD DE OXÍGENO



HEMOGLOBINAS SC

Se detectaron 7 pacientes con hemoglobinopatías SC, los cuales consultaron por anemia discreta con crisis de dolor discreto a severo en articulaciones e infecciones a repetición en uno de los pacientes. Se encontró polo esplénico palpable en todos los casos. Los Exámenes de laboratorio practicados revelaron Hb = 10 - 10.8 g%; Hto. 32-33 %; conteo rojo $4,51 \times 10^6$ - $5,34 \times 10^6$ / mm³; reticulocitos 3.8 - 14% , VCM 73- 85 micras³, HCM = 24 - 26 pg; CHCM = 30.8 - 32.9%; el frotis de sangre periférica mostró: anisocitosis 2 - 3 +, hipocromía 2- 3+ , poiquilocitosis 2 -3+, dianocitosis 2+; presencia de drepanocitos irreversibles 2+ (Fig. N° 52) .

FIGURA N° 52
FROTIS DE SANGRE DE PACIENTE CON HEMOGLOBINOPATÍA SC
MOSTRANDO MARCADA DIANOCITOSIS CON HIPOCROMÍA Y
ANISOCITOSIS



Perfil químico normal fuera de crisis hemolíticas y alterado durante crisis hemolítica, con hiperbilirrubinemia a expensas de la indirecta y aumento de fosfatasa alcalina, LDH y transaminasas. El perfil para detectar eritroenzimopatías fue normal.

La electroforesis de Hb de dichos pacientes mostró 4 bandas que migraron del cátodo al ánodo: 1) Anhidrasa Carbónica, 2) HbC.-, 3) Hb S y 4) Hb F siendo las principales las Hb S y C en cantidades proporcionales. (Fig N° 35).

En electroenfoque de la Hb observamos 9 bandas de Hb, las cuales migraron del cátodo al ánodo en la siguiente forma:

1) Banda Hb C, 2) Banda de Hb A₂, 3) Banda de meta Hb, 4) Banda de Hb S % 5) Bandas intermedias de meta Hb 6) Hb F, 7) Banda de Hb A₁ 8) Banda de Hb A₁ C, 9) Banda Hb A₃ (Fig N° 36). La cuantificación de Hb A₂ fue normal y la Hb F por inmunodifusión estuvo ligeramente aumentada (3 ± 0.6 grs.). La curva de disociación de oxígeno desviada a la derecha con cifras de P 50 aumentada (35- 47 mm Hg) Los

niveles de 2,3 DPG estuvieron en los límites superiores del rango normal $5 + 0.25$ (VN= 4 - 5 uM/ ml).

HEMOGLOBINA HS CON PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL

Se trata de una paciente de 21 años natural de Maracay (Estado Aragua) quien consultó por anemia discreta y antecedentes de una crisis de dolor moderado en grandes articulaciones e ictericia. El examen físico practicado a esta paciente fue normal.

Los exámenes de laboratorios practicado mostraron Hb=10.5 g%, Hto.= 31%; reticulocitos 8.4-11.7 %. El frotis de sangre periférica mostró: anisocitosis 2+, hipocromasia 2+, policromasia 2 +, poiquilocitosis 2+, presencia de drepanocitos irreversibles 2 +. Curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina ligeramente desviada a la derecha con un P 50: 31 mm Hg. La prueba de elución ácido de la hemoglobina mostró presencia de hemoglobina fetal homogéneamente distribuida dentro de los glóbulos rojos. La electroforesis de hemoglobina mostró en dirección anódica las siguientes bandas: anhidrasa carbónica, Hb A₂, Hb F y Hb A₁, siendo las bandas principales las de las hemoglobinas fetal y A₁. La cuantificación de esas bandas de hemoglobina mostró valores de: Hb A₂ = 2.3 g %, Hb F = 50%, Hb A₁= 47.7%. El perfil químico fue normal, al igual que el perfil para detectar eritroenzimopatías.

DISCUSION

Con el avance tecnológico de las últimas décadas se ha podido dilucidar la etiopatogenia de muchas anemias hemolíticas que por muchos años habían permanecido sin diagnóstico. Surgieron como causas las hemoglobinopatías, los síndromes talasémicos y los defectos de membrana.

En las dos últimas décadas se ha reconocido además la relación clara entre enfermedad hemolítica y la deficiencia de ciertas enzimas eritrocitarias, lo cual ha incrementado mucho más nuestro conocimiento sobre la patogénesis de la enfermedad hemolítica y ciertos aspectos básicos del metabolismo del eritrocito. Así misma ya se conocen mejor un grupo de enfermedades que afectan la médula ósea e impiden la producción adecuada de la serie eritroide y por tanto el envío de eritrocitos a la sangre periférica como son la anemia de Blackfan-Diamond, el síndrome de Fanconi, hipoplasias y aplasias de la médula ósea, anemias diseritropoyéticas, etc.

De 190 pacientes estudiados por sospecha de anemia hemolítica se encontró, que el 23% de ellos, presentaban deficiencias eritroenzimáticas, siendo la deficiencia de glucosa -6-fosfato - dehidrogenasa, la deficiencia enzimática, que con más frecuencia se encontró como causa directa de la anemia hemolítica. Así mismo cuando se realizaran los estudios poblacionales para detectar la incidencia de la deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, se encontró que esta variaba de acuerdo al grupo étnico estudiado, encontrándose ausente en las indígenas venezolanos y presente en las poblaciones negroides y mestizas, con una incidencia más elevada en las poblaciones negroides (11.8%).

Estos hallazgos están de acuerdo con lo reportado en la literatura que la deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa constituye la primera causa de deficiencia eritroenzimática asociada a anemia hemolítica y su incidencia varia de acuerdo a la población estudiada (5)

En Venezuela, muy pocos autores se han dedicado al estudio de las deficiencias eritroenzimáticas, siendo Boada (10), quien en 1963 reporta el primer estudio sobre la deficiencia de G-6-PD en nuestro país, encontrando en la población de Barquisimeto un 6% de deficientes en G-6-PD. Posteriormente se encontró un 2% de deficientes de dicha enzima en donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Caracas y su ausencia en indios Paraujanos y Makiritares (11). Estos hallazgos y los que se están reportando en este estudio nos indican que la ausencia del gen mutante para la deficiencia de la G-6-PD en nuestros indígenas se debe a que dichos poblados han permanecido aislados por mucho tiempo y sus habitantes no se han mezclado con individuos de raza caucasoide o negroide. La presencia del gen mutante para dicha deficiencia en nuestras poblaciones mestizas se debe a la mezcla de nuestra raza indígenas autóctonas con individuos de raza negroide o caucasoide. En Tapipa (Edo. Miranda) se encontró una frecuencia del 11.8%; similar a la reportada para otras poblaciones afroamericanas (11). Esto nos indica que Tapipa es una población de origen africano y en este estudio se confirma dicho origen al detectar, la presencia de la variante de G-6-PD (A), de migración electroforética rápida en el 13,7% de los habitantes de Tapipa. Es conocida que esta variante es típica de poblaciones negroides (6). La frecuencia de la deficiencia de la G-6-PD en Tapipa, permanece igual que en las poblaciones afroamericanas, porque Tapipa permanecía como un pueblo aislado, lo que impidió el mestizaje (59). Entre los pacientes estudiados con anemia hemolítica, que resultaron deficientes en G-6-PD, se detectó la presencia de la variante mediterránea de G-6-PD (B-), típica, por el contrario de poblaciones caucasoides. Así que en este estudio se confirma la presencia del gen mutante para la G-6-PD con las variedades electroforéticas rápida "A" y normal "B" ambas variantes habían sido detectadas previamente en la población mestiza de Barquisimeto (10).

Entre los 27 pacientes que resultaron deficientes en G-6-PD se encontró que la primera causa de consulta fue ictericia neonatal y la segunda causa fue crisis hemolítica severa post ingestión de drogas. Solamente 3 pacientes tuvieron antecedentes de crisis hemolítica post gestión de habas o infecciones.

La ictericia neonatal se encuentra presente en el 4% -14% de los niños con deficiencia de G-6-PD. Ha sido reportada en recién nacidos chinos, tailandeses, israelitas etc. (60).

En Venezuela se ha reportado una incidencia de ictericia neonatal secundaria a G-6-PD del 6%; mientras que la ictericia secundaria a incompatibilidad del grupo Rh y del Sistema ABO fue del 3% en la población de Barquisimeto. (10) *

Estos datos nos sugieren que estos recién nacidos deben tener ascendencia mediterránea u oriental, ya que la variante de G-6-PD mediterránea y la china, han sido detectadas solamente en casos de ictericia neonatal (13). Los recién nacidos negroides deficientes en G-6-PD no presentan una incidencia de ictericia aumentada (13). También podríamos asumir de acuerdo a los hallazgos de este estudio y lo reportado por Boada Boada, que nuestros recién nacidos con mezcla negroides si presentan una incidencia de ictericia secundaria a deficiencia de G-6-PD aumentada, lo cual no está de acuerdo con lo tradicionalmente reportado en la literatura. El favismo tuvo una frecuencia muy baja en nuestros pacientes a diferencia de los reportados para poblaciones caucásicas europeas (61). Esto puede explicarse porque la mayoría de nuestros pacientes son mestizos, portadores del gen negroide y por lo tanto de la variante de G-6-PD "A" y cuyos portadores no presentan crisis hemolíticas severas inducidas por la ingestión de habas o inhalación de dicho polen (6).

Nuestros pacientes deficientes en G-6-PD se caracterizaron por presentar el examen físico y los exámenes de laboratorio alterados solamente durante los períodos de crisis hemolíticas, lo cual indica que dichos pacientes presentaban las variantes de G-6-PD de las clases 2 y 3, (Tabla N° VIII a). Solamente un paciente presenta anemia hemolítica crónica con polo esplénico palpable. Este cuadro clínico es poco frecuente entre las pacientes deficientes en G-6-PD y cuando se presenta se trata de una variante de G-6-PD clase 1, las cuales se caracterizan por ser muy inestables y presentar alteraciones cinéticas, tales como un Km alto para los sustratos NADP y G-6-P. (13).

Se estudiaron 3 propósitos femeninas, una de ellas presentó una crisis hemolítica muy severa con coluria, inducida por la administración repetitiva de ampollas de Acido Fenildimetilpirazolona-metilano-metansulfónico. Esta droga (6) es un agente inductor de hemólisis en pacientes deficientes en G-6-PD. En este caso la hemólisis podría explicarse por la combinación de un exceso de la droga oxidante y niveles intraeritrocíticos disminuidos de G-6-PD. El estudio de los niveles intraeritrocíticos de G-6-PD en los propósitos masculinos mostró que 10 de ellos presentaban niveles muy bajos de G-6-PD, por debajo del 10% (Tabla N° VIII-b), que algunos de ellos presentaron crisis de anemia hemolítica muy severa, donde la hemoglobina cayó a niveles de 4 g%, requiriendo la administración de concentrados globulares. Estos hallazgos implican que la variante de G-6-PD que presentan estos pacientes es la variante mediterránea, que se encuentra en individuos sardos, judíos sefarditas, árabes y de otras poblaciones del mediterráneo, que cuando este tipo de variante está presente en cantidades disminuidas, las crisis hemolíticas inducidas por drogas ó infecciones son muy severas. Esto fue confirmado al encontrar la variante mediterránea en electroforesis, en algunos de estos pacientes deficientes.

A pesar que la incidencia de la deficiencia de G-6-PD se encontró más elevada en la población negroide de Tapipa, no se registraron antecedentes de hemólisis. Esta está de acuerdo con la observación clínica que la hemólisis en individuos negroides deficientes en G-6-PD es autolimitada, afectando solamente los eritrocitos maduros, donde la enzima ha caído por debajo del umbral crítico.

El patrón de la herencia de la G-6-PD a través del cromosoma X se cumplió en todos los casos, ya que todos los padres presentaron niveles intraeritrocíticos normales de G-6-PD y casi todas las madres niveles intermedios de G-6-PD, reflejando su estado de heterogocidad. Los hijos varones (propósitos), presentaron niveles muy bajos compatibles con el estado de homocidad para la deficiencia. Hubo una madre que excepcionalmente presentó niveles muy bajos de G-6-PD intraeritrocíticos del 32% compatibles con el estado de homocidad y otra madre presentó niveles normales de

G-6-PD introeritrocíticos. Esta divergencia en lo transmisión genético de G-6-PD radica en el principio de la inactividad del cromosoma X, el cual 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 y otras células genes derivados del padre.

Así lo proporción final de series eritroides variará desde los extremos de eritrocitos maternalmente derivados y por consiguiente con niveles muy bajos de G-6-PD, por inactivación del cromosoma X y los eritrocitos paternalmente derivados del cromosoma X activo con niveles normales de G-6-PD (13).

Con respecto o lo deficiencia de piruvato quinasa en este estudio se reporta la tercera familia venezolano oriundo de los Andes Venezolanos con anemia hemolítica crónico asociado a úlceras en miembros inferiores.

La primera familia venezolana con anemia hemolítica secundaria a deficiencia de piruvato quinasa fue reportado por Acquatella, Müller y Franceschi (62) en 1971. Se trataba de un preescolar de 4 años de edad, natural de Caracas, con antecedentes de exosanguinotransfusión por ictericia neonatal y con cuadro de anemia hemolítico crónica con esplenomegalia, exacerbado por infecciones (otitis). Los padres de este paciente eran primos. En el año 76, Müller y colaboradores reportan la primera familia venezolana nativa de Pregonero (Edo. Táchira) con anemia hemolítico crónico secundario o deficiencia de piruvato quinasa y asociado a úlceras en miembros inferiores. El estudio cinético de lo enzima mostró se trataba de una nueva variante de piruvato quinasa. Dicha familia esteba compuesto del padre, la madre (los cuales eran primos) y 10 hijos.

El propósito era un varón de 18 años, que sufría de anemia hemolítica crónico, esplenomegalia, y úlceras en miembros inferiores. El 50% de los hijos resultaron

heterocigotos para la deficiencia, el 25% homocigotos y el 25% normales. El estudio cinético de la enzima PQ mostró una enzima inestable resistente a la activación por fructosa 1.6 difosfato (63).

La segunda familia venezolana con anemia hemolítica secundaria o deficiencia de piruvato quinasa y asociada o úlceras en miembros inferiores, fue reportada por Curiel y Col (64).

El hallazgo de la tercera familia venezolana, también nativo de los Andes venezolanos y con anemia hemolítica crónica, con esplenomegalia y antecedentes de úlceras en miembros inferiores y con deficiencia de piruvato quinasa, es de una gran importancia, ya que posiblemente se trate de la misma variante venezolana de piruvato quinasa, que se encontró en la primera familia venezolana con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa reportada por Müller y colaboradores. Se podría asumir que dicha variante de piruvato quinasa ha sido transmitida a través de los matrimonios consanguíneos en dicha región, ya que, durante el transcurso de los estudios practicados a la familia reportada por Müller y Col, se analizaron los registros de matrimonios civiles y eclesiásticos de Pregonero (Edo. Táchira) encontrándose que dichos habitantes con mucha frecuencia contraían matrimonio con primos hermanos y muchos individuos presentaban el mismo apellido por 4 generaciones.

En este trabajo se encontró que el gen mutante para la deficiencia está presente en las poblaciones de Caracas y San Cristóbal. La incidencia de dicha deficiencia fue del 2.9% en los recién nacidos de la Maternidad Concepción Palacios de Caracas.

Esta cifra elevada, en relación a la incidencia de la deficiencia de piruvato quinasa que ha sido calculada por Blume y colaboradores de 5 casos en 100.000 nacimientos, basado, en la incidencia de la deficiencia reportada en varios países, principalmente en Estados Unidos (14). Es posible que la incidencia de este gen mutante sea más elevada para la población venezolana, pero se requeriría analizar un mayor número de

individuos, para confirmar esta hipótesis. El gen para la deficiencia de piruvato quinasa estuvo ausente en los poblados indígenas estudiados, lo cual implica que presencia en Venezuela es el resultado de la mezcla racial con inmigrantes de diferentes orígenes étnicos.

Con respecto a la deficiencia de hexoquinasa en este trabajo se reporta el primer caso en Venezuela y Latinoamérica de anemia hemolítica de hexoquinasa, cuya enzima presenta propiedades cinéticas diferentes a las 6 variantes de exoquinasa previamente reportadas (Tabla N° XXI).

TABLA XXI
VARIANTES DE HEXOQUINASA

AUTOR	ACTIVIDAD	CINETICA	TERMOESTABILIDAD	ELECTROFORESIS	COMENTARIOS
Horth-1965	Disminuída	Anormal	-	-	Panmielopatía, alteraciones cromosómicas
Goebel-1965o	Disminuída	Anormal	-	-	Malformaciones congénitas
Valentine-1969	Disminuída	Normal	-	-	AH Severa
Helleman-1969 Rijksen-1978	Disminuída	Normal	-	Anormal	AH Moderada
Ksitt-1969	Disminuída	Anormal	Inestable	Normal	AH Moderada
Mecheles- 1970	Disminuída	Anormal	Estable	Normal	AH Severa
Board-1978	Disminuída	Normal	Inestable	Normal	AH Moderada
Beutler-1978	Disminuída	Normal	Estable	Normal	AH Moderada
Esta Variante-1980	Disminuída	Anormal	Inestable	-	AH Moderada

Como un fenómeno primario hereditario, la deficiencia de hexoquinasa fue descrita por Valentine y Col en 1967 y desde entonces, solo unos 10 casos provenientes de 7 familias diferentes, han sido reportados en individuos de ascendencia europea (21). La familia con deficiencia de hexoquinasa que se está reportando en este estudio es nativa del Estado Aragua y desconoce ascendentes cercanos europeos. Aunque los padres de esta paciente no fueron estudiados, esta deficiencia es heredada en forma autosómica, codominante, porque la hermana y el hermano de la paciente presentaron valores disminuidos intraeritrocíticos de hexoquinasa que permitieron clasificarlos como heterocigotos (con ausencia de sintomatología). El propósito de esta familia sufre de una anemia hemolítica moderada con valores intraeritrocíticos de hexoquinasa

disminuida solo en un 60%. Tratándose de un propósito homocigoto esperaríamos encontrar una deficiencia de hexoquinasa intraeritrocítica aún más marcada. Esto ha sido reportado previamente y explicado como que la hexoquinasa es una enzima, cuya actividad decae a medida que los eritrocitos envejecen, lo cual hace que el diagnóstico de deficiencia de hexoquinasa, no siempre sea fácil, porque la deficiencia enzimática puede ser enmascarada por la presencia de reticulocitos (20). La curva de disociación de oxígeno estuvo desviada a la derecha. La caracterización de la hexoquinasa de los eritrocitos mostró una enzima muy inestable al calor y a la diálisis en ausencia de glucosa. Ha sido sugerido que debido a la importancia de la Hx dentro del ciclo glicolítico (que es la única fuente de ATP que posee el glóbulo rojo maduro), es de esperarse que mutaciones que dan origen a variantes inestables o variantes con actividad disminuida pueden restringir severamente la capacidad metabólica del eritrocito. (21).

En relación a las propiedades cinéticas de la enzima residual del propósito encontramos que la afinidad por su sustrato ATP estuvo disminuida mientras que la afinidad por glucosa fue normal. De las variantes reportadas tenemos que 4 de ellas, también han presentado la afinidad por ATP disminuida, pero en 3 de esos casos, la afinidad por el sustrato glucosa, también ha sido encontrada disminuida paralelamente (21).

Con respecto a la deficiencia de la enzima glutathion reductasa, se detectó, un caso con antecedentes de crisis hemolítica secundaria a ingestión de habas, pero actualmente se cree que esta deficiencia no produce consecuencias clínicas, al igual que la deficiencia de glutathion peroxidasa (21).

Con respecto a la deficiencia de NADH, metahemoglobina reductasa, en este estudio se reporta la primera familia con este tipo de deficiencia que se detectó en Venezuela.

El propósito de esta familia es lugar de sufrir de hemólisis sufre de cianosis (no cardiopulmonar) con una eritrocitosis compensatoria.

La deficiencia de NADH metahemoglobina reductasa o NADH diaforasa congénita es un desorden relativamente raro caracterizado por cianosis con un grado variable de metahemoglobina y policitemia compensatoria (64). Se han descrito 2 cuadros clínicos: 1) Metahemoglobinemia I, bien tolerada clínicamente 2) Metahemoglobinemia II asociada a encefalopatía progresiva (65). El propósito de esta familia presenta el tipo I, ya que clínicamente es completamente normal; y no presenta el retardo mental descrito en los pacientes, que presenta metahemoglobinemia II. La mayoría de los pacientes descritos previamente han sido de origen europeo (66), aunque también se han reportado en Cuba, Chile, Puerto Rico, India, China etc. La paciente en estudio es venezolana, pero de padres portugueses.

Con respecto a las anemias hemolíticas secundarias a defectos de membrana se reportan 10 casos de esferocitosis (3 de ellos con presentación clínica muy atípica e infrecuente), 1 caso de ovalocitosis y 1 caso de estomatocitosis.

La mayoría de los pacientes con anemia hemolítica congénita secundaria a esferocitosis estudiados se caracterizaron en líneas generales por presentar el cuadro clínico típico que ha sido descrito en esferocitosis: de hemólisis moderada, con reticulocitosis, hiperbilirrubinemia y esplenomegalia, y, un proceso hemolítico bien compensado, con anemia discreta o sin ella (26). Se detectaron 2 casos muy severos de esferocitosis congénita en dos lactantes. El primero era un lactante de 1 mes de edad, con antecedentes de ictericia, que requirió fototerapia por 5 días. Presentaba anemia severa con Hb = 5.8 g% con conteo de reticulocitos normales, frotis de sangre periférica con esferocitos muy escasos.

El estudio del aspirado de la médula ósea evidenció un arresto de maduración de la serie eritroide y la curva de fragilidad globular fue anormal, compatible con esferocitosis. Se realizó el diagnóstico de una hipoplasia selectiva de serie roja secundaria a un proceso hemolítico severo. El otro lactante también presentaba anemia severa casi desde su nacimiento Hb= 4 g% con reticulocitosis e hiperbilirrubinemia,

que ameritó transfusiones de concentrado globulares cada 4 semanas aproximadamente. Aunque el 50% de las esferocitosis congénitas se caracterizan por presentar historia de hemólisis e hiperbilirrubinemia neonatal, el diagnóstico no se realiza sino mucho más tarde (67). Los dos casos de esferocitosis en lactantes que estamos reportando es este estudio se caracterizaron por presentar un proceso hemolítico muy severo con esplenomegalia, que condujo a uno de ellos a una hipoplasia selectiva de la serie roja, quizás secundaria a déficit de folatos, como ha sido descrito en otro tipo de anemias hemolíticas (2). Aunque la hemólisis severa del período neonatal en casos de esferocitosis es infrecuente, esta ha sido reportada con presencia de Kernicterus (68). En el primer caso no sospechamos el diagnóstico de esferocitosis de entrada, por la carencia de esferocitosis marcada en sangre periférica. Esto se debe a que los eritrocitos esferocitos afectados severamente son removidos rápidamente por el bazo y no circulan (17).

En este caso tampoco se demostró historia familiar de esferocitosis pero ha sido encontrada previamente que el 25% de los pacientes con esferocitosis carecen de ella.

El otro paciente con esferocitosis congénita y presentación atípica, también presentó una anemia hemolítica severa con Hp de 5 g% y reticulocitosis muy marcada del 70%. El paciente había estado asintomático hasta los 3 años de edad cuando a raíz de un proceso infeccioso desarrolló una crisis hemolítica muy severa. En este paciente se encontró una esferocitosis heredada a través de la madre, pero había sobreañadido un proceso hemolítico autoinmune, idiopático, ya que el Coombs era positivo (anti Ig G) y las pruebas especiales para detectar procesos autoinmunes secundarios, eran negativas tales como: células LE, anticuerpos antinucleares, anticuerpo anti DNA, VDRL etc.

Las anemias hemolíticas autoinmunes idiopáticas son mucho más frecuentes en adultos (69). En niños se han descrito 2 variedades aguda y crónica (70). Los pacientes con anemias inmuno-hemolíticas agudas generalmente sufren un polo episodio de hemólisis

que dura unos pocos días o varias semanas, mientras que los pacientes con enfermedad crónica presentan hemólisis persistente ó intermitente por más de tres meses y requieren terapias agresivas como esplenectomía y agentes inmunosupresores (70). Nuestro paciente aparentemente ha tenido sólo un episodio agudo que respondió a tratamiento con esteroides, pero todavía es muy precoz para saber si presentará nuevas crisis. Revisando la literatura de los casos de anemia hemolítica autoinmune, no encontramos la esferocitosis como enfermedad sub-yacente.

Con respecto a los casos reportados de anemia hemolítica secundarias a ovalocitosis y estomatocitosis, estos poseían una anemia hemolítica crónica discreta a moderada, que es característica de estos defectos de membrana (26).

En relación a las anemias hemolíticas producidas por defecto en la producción de las cadenas de globina estudiadas, solamente discutiremos las anemias producidas por hemoglobinas anormales infrecuentes tales como las hemoglobinas inestables y la delta beta talasémia ya que los hallazgos reportados en la sección de resultados de este trabajo sobre las hemoglobinas anormales más frecuentes tales como drepanocitosis, combinaciones de hemoglobinas anormales: SA, SC etc., talasémia menor, no difieren de lo publicado por otros autores en Venezuela (71). En relación a la anemia hemolítica congénita asociada a una variante inestable de hemoglobina encontrada en un paciente de 12 años de edad, natural de Trujillo. Este tipo de anemia se conoce en la literatura como anemia hemolítica congénito por cuerpos de Heinz y la severidad clínica del desorden varia ampliamente (72). En 1952 Cathie describió un niño de 10 meses de edad con anemia hemolítica congénita, esplenomegalia y pigmenturia con aparición de cuerpos de Heinz grandes en sangre periférica postesplenectomía y prueba de inestabilidad de la hemoglobina al calor fuertemente positiva. Después que apareció este reporte, se han encontrado 12 variantes diferentes de hemoglobinas inestables, asociadas a anemias hemolíticas congénitas (72). Los individuos afectados son heterocigotos y debido a la baja frecuencia del gen anormal para las hemoglobinas inestables, la homocidad es muy rara y en la mayoría de los casos incompatible con

la vida. El patrón de herencia de este tipo de anemias es autosómico dominante, aunque una minoría de casos parecen haberse originado de mutaciones espontáneas, no estando afectados ambos padres (46). En nuestro paciente no encontramos dicha hemoglobina presente en la madre del paciente ni antecedentes de anemia e ictericia en el padre del mismo. El propósito en estudio sufre de una anemia hemolítica crónica exacerbada por períodos de infección con ausencia de cuerpos de Heinz en fresco preesplenectomía, lo cual está de acuerdo con otros pacientes reportados que sufren el mismo tipo de patología. Asimismo, se detectó una banda lenta de hemoglobina, que representaba alrededor del 10% de la hemoglobina total. Se ha reportado que las hemoglobinas inestables constituyen sólo del 10-30% de este caso tiene la importancia de demostrar que este tipo de defecto, aunque infrecuente, también está presente en nuestro país y debe considerarse entre las etiologías, de las anemias hemolíticas congénitas la hemoglobina total porque el bazo remueve selectivamente los cuerpos de Heinz, que contienen la hemoglobina inestable agregada y precipitada.

Se reporta un caso de hemoglobina anormal rápida en un individuo de 50 años completamente asintomático. La mayoría de las variantes de hemoglobinas humanas no están asociadas a manifestaciones clínicas detectables, pero son de importancia académica (46) y han ayudado al mejor conocimiento de la estructura de las anormales.

En este estudio también se reporta un lactante con una variante inestable de hemoglobina con curva de disociación de oxígeno disminuida que en lugar de producir hemólisis produce cianosis. El paciente comenzó a presentar cianosis después de los 6 meses de edad, lo cual significa, que la mutación de la cadena de globina ha debido de ocurrir en la cadena Beta, ya que después de los 6 meses de edad cambia la hemoglobina fetal (2_2 y 2) por la hemoglobina del adulto Hb A (2_2 B $_2$). Si la mutación hubiese ocurrido en las cadenas alfa, la cianosis ha debido aparecer después del nacimiento (46). El estudio de la hemoglobina de este paciente reveló se trataba de una variante inestable de hemoglobina, que se originó de una mutación espontánea, ya que los padres del misma no la presentaban. Las características de dicha variante fueron

que clínicamente producía cianosis agravada por ingestión de drogas oxidantes, metahemoglobina aumentada, cuerpos de Heinz, una banda de hemoglobina rápida, que constituía el 10% de la hemoglobina total, que se detectaba sólo en el electroenfoque, con afinidad al oxígeno disminuida. Han sido reportadas dos variantes de hemoglobina con curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina disminuida que producen cianosis: la hemoglobina Kansas y la Beth Israel, pero ambas variantes de hemoglobina son estables.

Este constituiría el primer reporte de una variante inestable con curva de disociación de oxígeno disminuida que en lugar de producir hemólisis produce cianosis.

Se describió un caso de anemia hemolítica secundaria a delta-beta talasemia, se trataba de un lactante de 2 años de edad, de raza mestiza con anemia hemolítica severa Hb = 6.8 g%. anomalías morfológicas de la serie roja que incluían hipocromía, anisocitosis, poiquilocitosis, policromasia, dianocitosis, normoblastos; cambios óseos a los rayos X típicos de talasemia. La composición de su hemoglobina incluyó Hb F en un 96,8 % y Hb A₂ = 3.2 %. La presencia de hemoglobina A₂ orienta hacia el diagnóstico de delta beta talasemia con genotipo delta beta / talasemia Beta cero. Revisando la literatura encontramos que este tipo de pacientes heterocigotas para delta-beta y talasemia Beta con altos niveles de A₂ ha sido descrita en 12 pacientes griegos, 1 paciente chino, 1 paciente italiano y en un negroide, con manifestaciones clínicas menos severas que las observadas en talasemia mayor Beta (73). Todos los casos descritos (excepto el del paciente negroide) han mostrado palidez, anemia, hepatoesplenomegalia y cambios óseos de talasemia en rayos X con requerimientos transfusionales poco frecuentes. El paciente negroide era asintomático. El caso que se está reportando es de raza mestiza con ascendientes negroides africanos y constituirá el caso N° 17 reportado en la literatura y aportará nuevos datos clínicos de comportamiento de este tipo de talasemias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harris John W. and Kellermeyer Robert W: The Red Cell, 1970 Chapter 6: Harvard University Press, Cambridge MASS.
2. Harris John W. and Kellermeyer Robert W. The Red Cell, 1970 Chapter 9: Red Cell Destruction and The Hemolytic Disorders, Harvard University Press, Cambridge, U.S.A.
3. Lux SE, John K. M: isolation and partial characterization of a high molecular weight red cell membrane protein complex normally removed by the spleen. *Bood* 50: 625 641, 1977
4. Valentine W.N: THE STRATT0N LECTURE Hemolytic anemia and inborn Errors of metabolism: *Blood* 5: 549-559, 1979.
5. Beutler E: Red Cell enzyme defects as no diseases and as diseases: *Blood* 54: 1, 1979.
6. Beutler E: Abnormalities of the Hexamono Phosphate Shunt, *Seminars in Hematology* 8: 311, 1971.
7. Tizianello A. et al: Sites of destruction of red cells in G6PD defirient caucasians and in phenylhydrazine treated patiente. *Scand J. Haemato* (5; 116, 1968)
8. Beutler, 1975 Red Cell Metabolism: a Manual of Biochemical Methods 2nd Editio Grune E. STRATT0N; Ney York.
9. Who Scientific Group: Standardization of procedures for the study of glucose 6 phosphate dehydrogenase. WHO Techn Rep Ser 366, Geneva, 1967.
10. Boada J. Estudio Preliminar sobre la glucosa 6 fosfato de hidrogenasa: V Congreso de la Asociación Latinoamerica de Ciencias Fisiológica, Caracas, Venezuela, 1963
11. Acquatella G: Deficiencia de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa en diferentes grupos raciales de Venezuela: *Acta Médica Venezolana* 4: 269 - 281, 1967.
12. Yoshida et al: Human glucosa 6 phosphate dehydrogenase variants *Bull WHO*: 45: 243, 1971.
13. Beutler E: Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency Chapter in *Hemolytic Anemia in Disorders of Red Cell metabolism* New York, Plenum 1978.
14. Tanaka K.R. Paglia DE: Pyruvate Kinasa deficiency *Seminars in Hematology* 8: 367, 1971
15. Nathan D.G, OSKI F.A., Sidel V. W. and Diamond L.K. 1965, Extreme Hemolysis and Red Cell Distortion in Erythrocyte Pyruvate Kinasa Deficiency II, measurements of

- erythrocyte glucose consumption, potassium flux and adenosine triphosphate stability. *NEJM* 272: 11 - 23, 1965.
16. Bernard J.F. Afifi F and Boivin P, Na and K Cation levels and exchange across the membrane of the erythrocyte II Results obtained in the erythrocyte of 20 patients with congenital hemolytic anemia *Pathol Biol (Paris)* 22: 51-60, 1974.
 17. Bowrnan HS, Oski F.A: Splenic macrophage interaction with red cell in pyruvate kinase deficiency and hereditary spherocytosis. *Vox sang* 19; 168-175, 1970.
 18. Mohandas N, Phillips W.M. and Bessis M: Red Blood Cell Deformability and Hemolytic anemias. *Seminars in Hematology* 16 : 2: 95 - 114, 1979
 19. Beutler, E.: Pyruvate Kinase Deficiency Chapter 3 in *Hemolytic anemia in Disorders of Red Cell Metabolism* New York Plenum 1978.
 20. Valentine W N, Oski FA, Paglia DE, B aughan M.A., Sehneider AS and Naiman J.L: Hereditary hemolytic anemia with hexokinase deficiency, role of hexokinase in erythrocyte aging, *NEJM* 276: 1 -11, 1967.
 21. Beutler E. Hemolytic anemia due to other enzyme deficiencies: Chapter 4 in "Hereditary hemolytic anemia in Disorders of Red Cell metabolism", New York Plenum 1978.
 22. Delivoria Papadopoulies M, OSKI FA and GOTTLIER A.J.: Oxygen-Hemoglobin dissociation curves: Effect of inherited enzyme defects of the Red Cell. *Science*. 165: 601-602, 1969.
 23. Beutler E Dyrnent PG and Matsumoto F: Hereditary Nonspherocytic Hemolytic Anemia and Hexokinase Deficiency *51: 5 935 - 940*, 1978.
 24. Lehmann H. Huntsrnan RG: Why are red cell the shape they are? The evolution of the human Red Cell in "Mac Farlane RG, Robb - Smith AHT (eds)": *Function of the Blood*. New York Academic, P: 73 - 148, 1961.
 25. Lux Samuel: Spectrin - actin membrane skeleton of normal and abnormal red blood cell: *Seminars in Hematology*: 16: 21-52, 1979.
 26. Shohet Sand Lux Samuel: *The Red Blood Cell membrane and mechanisms of Hemolysis: Hematology of Infancy and childhood*, Philadelphia, W.B. Saunders, Co. 1971
 27. Cooper RA, JANDL JH: The role of membrane lipids in the survival of red cells in hereditary spherocytosis *J. Clin Invest* 48: 736-741, 1969.
 28. Shohet S and Lux S: *The Red Blood Cell membrane and mechanisms of Hemolysis* Chapter 6 in *Hematology of Infancy and child hood* by W.B. Saunders Co. 1974.

29. Gredink, R.A. Helleman, P. W et al: Hereditary elliptocytosis and hyper haemolysis a comparative study of 6 families with 145 patients: *Acta Med Scand*: 179: 715, 1 966
30. Zarkows ky HS, OSKI F A, Shaafi R et al: Congenital Hemolytic anemia with high sodium low potassium red cells I Studies of membrane permeability *NEJM*: 278: 573-581, 1968.
31. Nathan DG Shohet SB: Erythrocyte ion transport defects and hemolytic anemia: Hydrocytosis and desiccytosis *Semin Hematol* 7: 381 - 408,1970.
32. Bunn Forget - Ranney: Hemoglobinopathies, in major Problems in Internal Medicine Chapter 4 Saunders Co., 1977.
33. Ser jeant Graham R: Sickle cell anemia The Clinical Features of sickle cell Disease, american Elsevier Publishing, New York, 1974.
34. Bunn Forget Ranney: Hemoglobinopathies in major Problems in Internal Medicine, Chapter 5: Unstable Hemoglobins Variants, Saunders Co., 1977.
35. Bunn Forget Ranney: Hemoglobinopathies in major Problems in Internal Medicine Chapter 6: Hemoglobinophaty due to abnormal Oxygen binding, Saunders, Co.,1977.
36. Weatherall et al: The pattern, of disorders haemoglobin synthesis in homozygous and heterozygous B. Thalassaemia *Br J. Haemato* 16: 251, 1969.
37. Kan, Y. W, Schwartz E: and Nathan, D.G: Globin chain synthesis in the alfa thalassemia. Syndromes *J Clin Invest* 47: 2515-2522, 1969.
38. Nathan, D.G: Thalassemia *N.E.J.M*: 2 86: 586, 1972
39. Nathan, D.G. and Gunn, R.B: Thalassemia the consequences of unbalanced hemoglobin synthesis *am J. med.* 41: 815, 1966.
40. Cooley TB, hee P: Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone change: *Trans am pediatr Soc.* 37: :29, 1915.
41. Hunt JA, Lehmann H: Haemoglobin "Bats" a foctal haemoglobin without alfa chain *Nature* 184: 872, 1959.
42. Necheles TH et al: Hemoglobin H disease *Blood* 28: 501,1966
43. Daland G.A and caslle WB: a simple method for demonstration of sickling of the red blood cells: The use of reducing agents *J Lab Clin Med.* 33 188 2, 1948.
44. Schneider RC, Haggard E, Gustavson, LP: Brumhall Band Jones RT: Genetic Haemoglobin abnormalities about 9000 black and 7000 White newborn Haemoglobin Dickenson (a gamma 97 his arg) a new variant *Brit J. Haemat* 28: 515, 1974

45. Simple Electrophoretic system for Presumptive Identification of abnormal Hemoglobins by the International Committee for Standardization in Hematology *Blood* 52: 1058-1064, 1978.
46. Lehnann, H.R.C, Huntsrnans, 1968 man ' S Haemoglobins, W. B Saunders Co.
47. Bernini L R: Rapid Deterrnination of Hemoglobin A₂ by DEAE cellulose chromatography *Biochem genet* 2: 305, 1969.
48. Betke et al: Estirnation of small Percentage of foetal haemoglobin *Nature*: 184: 1877, 1959.
49. Carrel, R.W. and Kay R A: a simple method for the detection of un stable Haemoglobins: *Brit J. Haemat* 23-45, 1972.
50. at water, J, and Erslev, A.J: Fetal hemoglobin differential staining Edited by W. J Williams, E Beutler, A.J. Erslev and R W sundles. In *Hematology*, 2nd Ed New York Me Crow Hill Book Co, 1977.
51. Basset P, Benzard Y, Garel MC and Rosa J. Isoelectric focussing of human hemoglobin its application to Screening, to the Characterization of 70 variants and to the Study of modified fractions of normal hemoglobins *Blood*: 51: 971-979, 1978.
52. Jenkins DE, Jr: Diagnostic test for PNH *Series Haematol* 5 (3): 24, 1972.
53. Basch, RS: Hemoglobin synthesis in short - term cultures of human fetal hemato poietic tissues. *Blood* 39: 530-541, 1974.
54. Evelyn K.A and Malloy H.T: microdeterminations of Oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfohemoglobin in a single sample of blood. *J. Biol chem* 1 26: 655, 1938.
55. Keitt: 2,3 diphosphoglycerate assay *J. Lab Ckin med* 27: 470, 1971.
56. Beutler, E.; Mathai C and Smith J.: Biochemical Variants of G-6-PD giving rise to congenital non Spherocytic hemolytic disease; *Blood* 31: 131-146.
57. Dacie, J. *The hemolytic anemias*, 2d ed. Pp. 37-42. Grune Stratton, New York 1960.
58. Erslev allan: Ery thropoietin assay: en *Hematology* by Williams, Beutler, Erslev, Rundles Mc Graw Hill Book Co. a Blakington Publication 1972.
59. Curiel D, Velasquez G, Papa, Samoza R, Linares F, Smith P, Rios H, Acquatella G: Anemia Hemolítica y Ulceras en las piernas por deficiencia de piruvatoquinasa. *Sangre* 22 (1) 64 - 70, 1976.
60. Jaffe E.R. and Hsieh As: DPNH methemogobin reductase deficiency and hereditary methemoglobin. *Semin Hematol* 8: 417 - 437 (1971).

61. Vives J.L.: Pujales A, vela E, Corretger JM, aleroux and Kaplan: Congenital methemoglobin reductasa deficiency associated with mental retardation en a spanísh girl: Acta Haematologica. 59 (6) 321-378 (1978).
62. Mac Kinney AA: Hereditary Spherocytosis arch Intern med 116: 257 -265, 1965.
63. Betke K: Ycterus Neonatorum Gravis manifestation Einer Hereditaren Spherocytoi Kinderreilk 78: 213- 1954.
64. Silverstein MN, Gomez MR, Elveback LR, Remine WH arid Linman JW: Idiopatic adquire hemolytic anemia: Survival en 117 cases are Ynter med, 1 29: 85, 1972
65. Buchanan G, Boxer L, Nathan D: The acute and transient nature of idiopatic immune hemolytic anemia in Childhood: J. of Ped: 88: 780-783.
66. Arends: Estado actual del estudio de las hemoglobinas anormales en Venezuela Sangre 8: 1 - 14, 1963.
67. Scott J. L., Haut A, Cart Wroght Congenital hemolytic disease associated with red cell enclusion bodeis abnormal pigment. metabolism and electrophoretic hernoglobin abnormality Bood 16: 1 239, 1960.
68. Kinney TR and Friedman S, MD: Varieties of Beta Thalasemia in Hemoglobinopathies in Children by PSG Publishing Co, Inc. 1980.
69. Stamatoyannpouhis G, Fessas Ph Papannopoulou: F. Thalasemia am J, med. 47: 197-208, 1969.
70. Oskian Naiman: Hematologic Probems in the Neuborn by Saunders Co, 1972.