

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

ANEMIAS HEMOLITICAS POR
DEFICIENCIA DE ENZIMAS DE LA
VIA GLICOLITICA EN VENEZUELA:
Estudio en humanos y perros

Trabajo de Ascenso
para Profesor Agregado
Cátedra Obstetricia
Escuela "Luis Razetti"
Facultad de Medicina
Universidad Central de Venezuela

Aixa Müller de Soyano

RESUMEN

Se presenta los estudios realizados a 2338 pacientes con anemias hemolíticas congénitas no inmunes referidas al Instituto de Oncología y Hematología durante el período 1977-1997 y el análisis del estudio clínico, hematológico, bioquímico e inmunológico realizado a los pacientes que resultaron con enzimopatía de la vía glicolítica. Se estudiaron 2 perros Basenji con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa uno homocigoto y otro heterocigoto, utilizando como controles dos perros Golden Retriever.

Se utilizaron como métodos de estudio historia clínica, hematología, electroforesis de hemoglobina, cuantificación de Hb fetal y A2, cuantificación de las enzimas de las vías glicolíticas y hexosa monofosfato, caracterización bioquímica de la enzima piruvato quinasa residual (Km, curva de termoestabilidad, electroforesis), contenido eritrocítico de cationes y de la permeabilidad de la membrana del eritrocito para los cationes, determinación de Ca eritrocítico, cuantificación de hierro sérico, ferritina, complemento, inmunoglobulinas, respuesta proliferativa de las células mononucleares a los mitógenos PHA y Con A.

Los 2338 pacientes estudiados fueron clasificados en 1511 hemoglobinopatías, 432 síndromes talasémicos, 287 deficiencias de enzimas y 108 defectos de la membrana del eritrocito. Los 287 pacientes con enzimopatías fueron clasificados en 241 deficientes en G-6-PD, 35 en piruvato quinasa, 8 en hexoquinasa y 2 en otras deficiencias enzimáticas. Los pacientes deficientes en PK presentaron un cuadro de anemia hemolítica congénita con esplenomegalia. Seis pacientes de tres familias deficientes en PK se caracterizaron además por presentar úlceras en miembros inferiores. Los valores de ferritina estuvieron aumentados en todos los pacientes deficientes en PK, de acuerdo al grado de hemólisis. No hubo deficiencias de la inmunología humoral y celular en dichos pacientes. La herencia de la PK fue en todos los casos autosómica recesiva. El estudio bioquímico de la enzima PK de los pacientes deficientes mostró que los pacientes con úlceras en miembros inferiores presentaron una variante de PK caracterizada por disminución de la afinidad para su sustrato PEP, no era alostérica, presentaba un aumento de la afinidad por su sustrato ADP y era

inestable al calor. El contenido de ATP de los eritrocitos deficientes en PK estuvo disminuido y el de calcio aumentado. Cuando estos eritrocitos deficientes en PK se incubaron con un bloqueador de la fosforilización oxidativa, se produjo una disminución marcada del K intracelular y caída del ATP. Estos hallazgos podrían ayudar a explicar parcialmente el mecanismo de hemólisis de los eritrocitos deficientes en PK, ya que estos eritrocitos deshidratados, con su membrana impregna de calcio y rígidos van a ser reconocidos y fagocitados por el sistema macrofágico del bazo. El estudio poblacional practicado en este estudio nos lleva a concluir que dicha deficiencia de PK fue traída por inmigrantes a los Andes venezolanos y de aquí se expandió a otras regiones.

Al comparar la PK de los eritrocitos del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de PK con la PK de los eritrocitos de pacientes deficientes en PK con la variante de PK encontramos que ambas enzimas son cinéticamente similares, presentando un K_m [PEP] disminuido, eran no alostéricas, un K_m [ADP] elevado y la termoestabilidad disminuida. Estas características podrían contribuir a la influencia en la severidad del proceso hemolítico de los humanos y de los perros.

Se presentan tres familias deficientes en hexoquinasa, una de las cuales se caracterizó porque su propósito también presentaba úlceras en miembros inferiores. El estudio bioquímico de la enzima Hx intraeritrocítica residual permitió caracterizar dicha enzima como una variante ya que era inestable al calor y tenía un K_m [ATP] aumentado. Son las primeras familias detectadas con deficiencia de hexoquinasa en el país.

INDICE

INTRODUCCION	6
Deficiencia de piruvato quinasa	9
Incidencia	9
Fisiopatología y metabolismo del eritrocito, deficiencia en piruvato quinasa	7
Mecanismo de hemólisis.....	9
Otras anomalías metabólicas	8
Disminución de la actividad glicolítica.....	9
Hemólisis de los pacientes con variantes de piruvato	11
Genética y herencia.....	12
Deficiencia de hexoquinasa.....	14
Deficiencia de glucosa fosfato isomerasa.....	14
Deficiencia de fosfofructoquinasa	16
Deficiencia de aldolasa.....	17
Deficiencia de triosa fosfatoisomerasa	18
Deficiencia de fosfogliceroquinasa	18
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y METODOS	20
RESULTADOS	27
Etiología de la hemólisis en 2338 pacientes con anemia hemolítica congénita	27
Clasificación de los pacientes deficientes en enzimas	28
Estudio hematológico de los pacientes deficientes en piruvato quinasa.....	30
Valores de hierro sérico, capacidad total y ferritina	33
Estudios de la inmunología humoral y celular	34
Estudios de la respuesta proliferativa de las células mononucleares	35
Clasificación de los pacientes deficientes en piruvato quinasa	37
Caracterización bioquímica de la PK de pts con anemia por deficiencia de PK.....	46
Caracterización bioquímica de la variante de PK	48

Estudio de cationes intraeritrocíticos de pacientes deficientes en PK	49
Contenido de calcio de los eritrocitos de los pacientes con deficiencia de la PK.....	51
Cambios en el contenido de cationes y ATP	52
Origen de las familias venezolanas deficientes en PK.....	53
ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN PERROS	56
Niveles de la G-6-PD y PK en eritrocitos de perros Basenji	58
Caracterización bioquímica de la PK de perros Basenji	60
Estudio comparativo entre la PK de perros Basenji y la variante humana	63
Estudio de cationes intraeritrocíticos de perros Basenji.....	68
Cambios en el contenido de cationes, índices y ATP de perros Basenji	70
Comparación entre el contenido de cationes de eritrocitos humanos y de eritrocitos de perros Basenji	71
Comparación entre los cambios en el contenido de cationes, índices globulares y ATP de eritrocitos humanos y caninos.....	71
DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA	73
Anemia hemolítica crónica asociada a una variante de Hexoquinasa	73
Determinaciones enzimáticas.....	75
Actividades de la Hx de glóbulos rojos jóvenes y maduros	77
Características de la hexoquinasa residual.....	77
Anemia hemolítica por deficiencia de hexoquinasa en la familia Per-Cam.....	80
Determinaciones enzimáticas	83
Anemia hemolítica congénita por deficiencia de hexoquinasa en la familia GG1	85
Determinaciones enzimáticas	88
DISCUSION	91
BIBLIOGRAFIA	103

INTRODUCCION

El eritrocito maduro a diferencia de otras células del organismo posee una maquinaria metabólica relativamente reducida, carece de núcleo, mitocondrias, ribosomas y otros organelos, y por lo tanto de fosforilización oxidativa, de síntesis de proteínas y de capacidad de replicación celular. La única fuente de energía que posee es el ATP, el cual proviene casi exclusivamente de la conversión de glucosa en ácido láctico a través de la vía glicolítica, pero es suficiente para llevar a cabo los requerimientos metabólicos limitados del eritrocito maduro. (Fig. 1). El descubrimiento de que varias enzimopatías glicolíticas congénitas dan como resultado anemias hemolíticas ha llevado a un estudio más profundo de dicha interrelación. Por otra parte, aunque se han detectado deficiencias adquiridas de enzimopatías glicolíticas en malignidades hematopoyéticas, sin embargo, no han resultado en anemias hemolíticas (1,2).

La deficiencia congénita o la presencia de anomalías moleculares (variantes moleculares) de algunas enzimas de la vía glicolítica conduce a un acortamiento de la vida media del eritrocito y en consecuencia se establece un cuadro de anemia hemolítica, el cual puede ser distinguido claramente de la anemia hemolítica que acompaña a la esferocitosis congénita porque el frotis de sangre periférica presenta ausencia de esferocitos, poseen una curva de fragilidad globular normal, por una estructura y síntesis de la hemoglobina normal, por una respuesta terapéutica parcial a la esplenectomía, y porque la mayoría presenta un modo de herencia recesivo en lugar de dominante. Estas anemias se conocen también con el nombre de anemias hemolíticas congénitas no esferocíticas (AHCNE) (3).

Vía Glicolítica

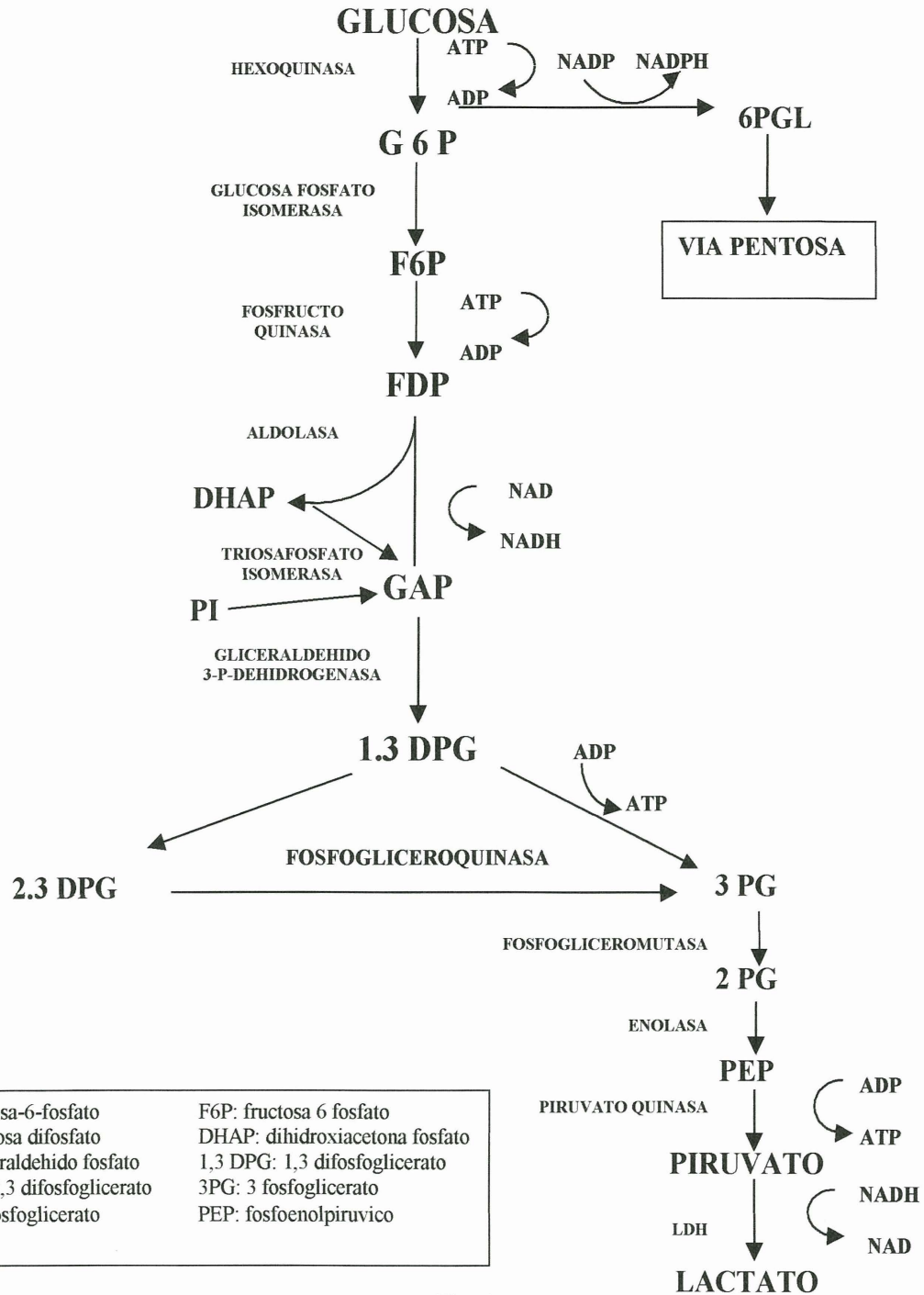


Fig. 1

Se han descrito anemias hemolíticas congénitas no esferocíticas por deficiencias de las siguientes enzimas de la vía glicolítica: hexoquinasa (Hx), glucosafosfatoisomerasa (GPI), fosfofructoquinasa (PFK), aldolasa (ALD), triosafosfato isomerasa (TPI), fosfogliceratoquinasa (PGK), difosfogliceratomutasa (DPGM), difosfoglicerofosfatasa (DPGP), enolasa (ENO), piruvato quinasa (PK) y deshidrogenasa láctica (LDH), (Fig. 1). (4)

En líneas generales, el patrón de herencia de estas deficiencias es autosómico recesivo, con excepción de la deficiencia de PGK, la cual está ligada al sexo y de la deficiencia de enolasa, la cual se cree es autosómica dominante. En ausencia de consanguinidad, los pacientes clínicamente afectados poseen dos genes afectados, excepto los deficientes en fosfogliceroquinasa (PGK). (5)

En general, los heterocigotos para estas deficiencias son clínicamente asintomáticos, aunque pueden ser detectados por que sus eritrocitos presentan anormalidades bioquímicas. Hay que resaltar que todas estas deficiencias son heterogenias debido a un marcado polimorfismo genético. (3)

DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA.

Representa el más frecuente de los defectos genéticos de enzimas del ciclo glicolítico, siendo descrita por Dacie en 1953 como una anemia hemolítica congénita no esférica (AHCNE). (6, 41)

INCIDENCIA

Aproximadamente 350 individuos con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa han sido reportados. La mayoría proviene de individuos originarios del norte de Europa. Casos esporádicos han sido detectados en negros, japoneses, chinos, mexicanos, europeos del sur, y sirios. En Venezuela, Acquatella, Müller y Francheski en 1970 reportaron el primer caso de anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa en un niño de 6 años que acudió a consulta de Hematología en el Hospital Universitario de Caracas [1,7]. Una anemia hemolítica parecida a la de los humanos ha sido reportada en perros Basenji. (8).

FISIOPATOLOGIA Y METABOLISMO DEL ERITROCITO DEFICIENTE EN PIRUVATO QUINASA

I. MECANISMO DE HEMOLISIS

El mecanismo de hemólisis de los eritrocitos deficientes en PK no está completamente dilucidado, actualmente se cree que diferentes causas contribuyen a este proceso. Hay dos anormalidades metabólicas claves asociadas con estos eritrocitos: la primera es que el contenido de ATP está generalmente disminuido, y la segunda anormalidad es que el contenido de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) está aumentado aproximadamente dos veces. La disminución del ATP se debe a una reducción de la conversión de glucosa a ácido láctico

debido a la disminución de la enzima piruvato quinasa, la cual constituye un pilar fundamental del ciclo glicolítico donde 2 moléculas de ATP son convertidas a ATP. El aumento de 2,3-DPG se debe a la acumulación de 3-fosfoglicerato (3-PG), el cual es un cofactor de la fosfogliceromutasa, la enzima responsable de la síntesis del 2,3-PDG y un inhibidor de la difosfoglicerofostasa, la enzima responsable de la degradación del 2,3-DPG (Fig. 1).

Valentine y Paglia han sugerido que la depleción de ATP es un factor crucial que conduce a hemólisis en el eritrocito deficiente en PK. Por su parte, Mentzer y Glader han demostrado que la depleción de ATP intraeritrocítica causa apertura de los canales de K⁺ con pérdida de este ion y de agua, lo cual resulta en un eritrocito deshidratado y rígido, el cual va ser atrapado y hemolizado por los macrófagos del bazo (9,10,11).

2. OTRAS ANORMALIDADES METABÓLICAS DEL ERITROCITO DEFICIENTE EN PIRUVATO QUINASA.

Hay otras dos anormalidades metabólicas, las cuales no pueden ser explicadas directamente por la disminución de la actividad de la PK. Estas son: 1) disminución de la suma total de los tres nucleótidos de la adenina: adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP) y adenosina trifosfato (ATP); y 2) disminución de la suma total de los nucleótidos nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD) y nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). Además, existe no sólo disminución de la suma total de cada uno de los nucleótidos sino una disminución de cada uno de estos separadamente. La disminución del contenido total de los nucleótidos de la adenina no podría ser causada sólo por la disminución de la conversión de ADP a ATP por reducción de la actividad de la PK, ya que la disminución de ATP debería estar acompañada necesariamente de un aumento del ADP y del AMP, si la disminución de esta conversión a través de la piruvato quinasa fuese la única anormalidad. De modo que la ausencia de aumento de los niveles de ADP y AMP sugiere una anormalidad en la síntesis o degradación de esos nucleótidos. De modo similar, la disminución del contenido intraeritrocítico de NAD en los eritrocitos deficientes en piruvato quinasa no puede ser causado sólo por la disminución de la conversión de NADH

a NAD a nivel de la LDH (Fig. 1), lo que sugiere que la existencia de anormalidades en la síntesis y degradación del ADP deben ser responsables de la disminución del contenido total de NAD. Actualmente existen evidencias que indican que los eritrocitos deficientes en PK tienen disminución de la síntesis de los nucleótidos de la adenina y del NAD (9,10,11).

3. DISMINUCION DE LA ACTIVIDAD GLICOLITICA DE LOS ERITROCITOS DEFICIENTE EN PIRUVATO QUINASA

Los eritrocitos deficientes en PK tienen unos niveles ADP y NAD disminuidos, por lo cual presentan una actividad glicolítica menor que la de los eritrocitos normales. Es de hacer notar que la disminución del contenido de ADP y NAD exagera la disminución de la actividad de la vía glicolítica debida a la disminución de la enzima PK (9).

4. HEMOLISIS EN LOS PACIENTES CON VARIANTES DE PIRUVATO QUINASA

La depleción de ATP no puede explicar la hemólisis en pacientes con variantes de PK, que poseen un contenido intraeritrocítico de ATP normal o aumentado. Así, Tanaka y col. han estudiado las consecuencias de niveles intraeritrocíticos aumentados de 2,3-DPG, los cuales tienen consecuencias positivas y negativas. Entre las consecuencias positivas tenemos la facilitación de la difusión del oxígeno de la hemoglobina a los tejidos y entre las consecuencias negativas tenemos: 1) la 2-3-DPG es un inhibidor de la hexoquinasa y por lo tanto puede agravar la disminución de la actividad de la vía glicolítica por deficiencia de PK; 2) la 2,3-DPG inhibe también la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD). Esta inhibición es responsable de la disminución de la actividad de la vía de las pentosas en el eritrocito deficiente en PK, lo cual puede ser un factor que contribuya a la hemólisis, especialmente durante infecciones o exposición a drogas oxidantes (9).

GENETICA Y HERENCIA

Es autosómica recesiva, con raras excepciones. Típicamente la enfermedad hemolítica ocurre en los homocigotos o en los heterocigotos dobles. Los verdaderos heterocigotos por lo general no presentan anemia, aunque bioquímicamente presentan niveles disminuidos de la enzima PK en el 50%, con alteraciones de los intermediarios glicolíticos, y algunos de ellos pueden exhibir evidencia de hemólisis discreta (12,13).

La prevalencia de los heterocigotos varía de acuerdo a la población estudiada, siendo de 6% en Arabia Saudita, 3,4% en Hong Kong, 2,2% en Cantón, China, 1,4% en Alemania y de solo 0,14% en Ann Arbor, Michigan.

La mayoría de los pacientes con anemia hemolítica son heterocigotos dobles o compuestos para dos genes mutantes de la PK; es decir, estos pacientes poseen alteraciones o mutaciones en los dos alelos que determinan la síntesis de la enzima, lo cual va a producir anormalidades cuantitativas o cualitativas o ambas, en la función de la PK; por ejemplo, el gen heredado del padre podría producir deficiencia cuantitativa de PK, mientras que el otro gen mutante, heredado de la madre, podría producir anormalidades bioquímicas cualitativas de la función enzimática. En otros casos se presenta una combinación de dos variantes diferentes de la molécula de PK, en lugar de ser homocigotos para un solo gen mutante, es decir, heredar de cada padre el mismo tipo de gen productor de hemólisis por anormalidades de la enzima PK. Los pacientes con anemia hemolítica congénita por verdadera deficiencia homocigótica provenientes de matrimonios consanguíneos han sido caracterizados principalmente en Japón, las llamadas PK Tokio, PK Nagasaki, PK Sapporo (14).

Los pacientes heterocigotos pueden presentar diferentes tipos de genes mutantes que codifican moléculas de PK con actividad disminuida o más a menudo con la actividad residual de la PK anormal. Estas presentan alteraciones en sus características, tales como termoestabilidad, afinidad baja o elevada por sus sustratos fosfoenolpirúvico (PEP) y ADP o respuesta anormal a su modificador alostérico fosfofructoquinasa (PFK), pH óptimo anormal, movilidad electroforética anormal, etc. (15).

GENETICA MOLECULAR SUBUNIDADES DE PIRUVATO QUINASA EN LOS TEJIDOS HUMANOS

Existen tres subunidades de PK en los tejidos humanos. La subunidad **L** se encuentra en el hígado, la subunidad **MI** en músculo y cerebro, y la subunidad **M2** en riñones, tejido adiposo, glóbulos blancos, y plaquetas. En todos los tejidos la forma activa de PK es un homotetrámero formado de la subunidad correspondiente. La subunidad **L** está compuesta de 543 aminoácidos y la subunidad **M2** de 531 aminoácidos (16, 17,42).

COMPOSICION DE LA PIRUVATO QUINASA INTRAERITROCITICA

En los eritrocitos la enzima piruvato quinasa (PK) es un tetrámero (PM: 230 Kd), cuya composición puede variar. En los precursores eritroides predomina el homotetrámero tipo **M2**. Con la maduración eritroide la síntesis de subunidades **M2** declina y es reemplazada por la producción de subtipos **L**, los cuales se encuentran en los eritrocitos maduros. Dos subtipos de subunidades **L**, referidos como **L** y **L'** se han identificado en los eritrocitos maduros. Aunque son codificados por un solo gen, ellos representan los productos de traducción de dos ARN mensajeros, que se originaron de un solo gene estructural por reorganización del gen o por procesamiento diferencial.

En eritrocitos jóvenes el tipo de PK predominante es un homotetrámero (llamado isoenzima R1) formado de subunidades **L'**. En el eritrocito completamente maduro, R1 es reemplazado por R2, un heterotetrámero compuesto de ambas subunidades **L'** y **L**. Ambas isoenzimas R1 y R2 pueden ser convertidas a isoenzimas hepáticas (L4) por digestión proteolítica in vitro.

Las diferentes isoenzimas están bajo control genético separado, por lo cual no es sorprendente que la enzima piruvato quinasa de los leucocitos y de las plaquetas estén normales en los pacientes con anormalidades de la piruvato quinasa intraeritrocítica. Por otro lado, cuando la PK eritrocítica es anormal, la PK hepática (tipo L4) puede estar afectada pero no hay desórdenes de la función hepática (16,17, 42).

DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA

La hexoquinasa (Hx) es la enzima que inicia la vía glicolítica mediante la fosforilización de la glucosa, convirtiéndola en glucosa-6-fosfato [Fig. 1]. Este paso es crucial para el metabolismo eritrocitario, ya que el eritrocito maduro depende casi exclusivamente de la glucosa-6-fosfato para generar ATP, glutatión reducido y nucleótidos de la piridina, los cuales son las fuentes de energía para mantener una sobrevivida normal.

HERENCIA

Es autosómica recesiva. Los heterocigotos no presentan signos de hemólisis, a pesar de que su actividad enzimática está alrededor del 50% de lo normal. El gen estructural de la hexoquinasa está en el cromosoma 10. La electroforesis de la hexoquinasa leucocitaria y la plaquetaria revela una isoenzima anodal (HK3) distinta de aquellas del eritrocito (HK1, HK2). Anormalidades de la hexoquinasa leucocitaria no han sido detectadas en pacientes deficientes en hexoquinasa intraeritrocítica (18,19, 20).

INCIDENCIA

Es una deficiencia rara, solo 22 casos han sido reportados de origen noreuropeo o perimediterráneo (41).

DEFICIENCIA DE GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA

Esta enzima cataliza la reacción en la vía glicolítica de glucosa-6-P a fructosa-6-fosfato [Fig.1]. **Incidencia:** la deficiencia de la glucosa fosfato isomerasa es, en términos de frecuencia a nivel mundial, la segunda deficiencia enzimática eritrocitaria, que causa hemólisis, después de la G-6-PD. Han sido reportados 45 casos provenientes de 33 familias diferentes (41).

GENETICA Y HERENCIA

Es del tipo autosómico recesivo. Los heterocigotos obligados presentan el 50% de la actividad enzimática de hexoquinasa intraeritrocítica. El gen estructural para la GPI está localizado en el cromosoma 19 (21).

La glucosa fosfato isomerasa es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas, cada una con un PM de 60 Kd. Los heterocigotos heredan un alelo mutante y un alelo normal de GPI, sintetizando dos subunidades de GPI diferentes que pueden combinarse y formar tres tipos de dímeros: homodímero normal, homodímero mutante, o heterodímero que contiene una subunidad normal y otra mutante. La electroforesis de GPI eritrocitaria de los heterocigotos puede demostrar de una a tres bandas de dímeros dependiendo de la extensión de la alteración de la carga o actividad de la subunidad mutante.

La anemia hemolítica ocurre cuando la actividad de la enzima GPI cae por debajo del 40% de lo normal. Esos individuos son homocigotos para una forma mutante de GPI o heterocigotos compuestos para dos mutantes no similares de GPI (9).

ETIOLOGIA DE LA HEMOLISIS

La termoestabilidad pronunciada in vitro es la característica más importante de la enzima residual. A diferencia de las variantes de PK, la GPI muestra una cinética enzimática normal, pH óptimo normal y PM. La actividad de GPI está presente en grandes cantidades en el eritrocito, pero presumiblemente su inestabilidad térmica resulta en disminución progresiva de su actividad in vivo, afectando la glicólisis y conduciendo a la hemólisis (9).

MANIFESTACIONES CLINICAS

En la mayoría de los casos la anemia hemolítica ha aparecido en la infancia y ha sido lo suficientemente severa para ameritar transfusiones. El 30% de los pacientes reportados han presentado ictericia neonatal. Se han descrito hidrops fetal, muerte neonatal y crisis de aplasia postinfección. Muchos pacientes han sufrido crisis hiperhemolíticas después de infecciones o exposición a drogas.

Presentan más propensión a las crisis hemolíticas postinfección que el resto de los pacientes con anemias hemolíticas congénitas por deficiencias de enzimas de la vía glicolítica. Se han reportado casos de retardo mental, miopatía y función granulocítica anormal (22, 23, 24,25).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Los pacientes presentan anemia, reticulocitosis hasta de un 81% y aumento de la bilirrubina indirecta. En algunos casos se ha detectado la presencia microesferocitos espiculados en los frotis de sangre periférica de dichos pacientes, y en otros, estomatocitos. Los heterocigotos tienen 50% de la actividad normal y los sujetos anémicos homocigotos o dobles heterocigotos presentan alrededor de un 15%. El diagnóstico se realiza mediante la cuantificación intraeritrocítica de GPI por espectrofotometría (41,9).

DEFICIENCIA DE FOSFOFRUCTOQUINASA

Esta enzima cataliza la conversión irreversible de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato durante la glicólisis. La deficiencia heredada de esta enzima puede afectar eritrocitos, músculos, o ambos tejidos, dependiendo de la subunidad de PFK afectada y la naturaleza del defecto bioquímico. A nivel muscular la deficiencia severa de PFK causa miopatía. **Incidencia:** treinta casos han sido reportados a nivel mundial. **Herencia:** es de

tipo autosómica recesiva. **Manifestaciones clínicas:** se presenta una anemia hemolítica moderada, en ocasiones compensada, acompañada de debilidad muscular, miopatía, calambres, intolerancia al ejercicio y mioglobinuria. La enfermedad puede manifestarse al nacimiento y causar la muerte por insuficiencia respiratoria u otras complicaciones o ser poco severa y estar presente en edades avanzadas. En algunos casos la hemólisis puede demostrarse claramente, pero la anemia puede estar ausente. La mayoría de los casos se detecta en la adolescencia (26, 27, 28).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Se realiza mediante la cuantificación de los niveles de PFK en eritrocitos y en músculo. El diagnóstico puede ser sospechado si no hay producción de lactato en sangre del antebrazo después de ejercicios, pero para confirmarlo se requiere de biopsia de músculo para determinar actividad de PFK o estudios del metabolismo de los carbohidratos del músculo por resonancia magnética no invasiva.

Cuando la deficiencia de PFK esta restringida al eritrocito no hay síntomas de miopatía y los niveles de lactato sanguíneo después de ejercicios son normales. Estos pacientes pueden ser hematológicamente normales o mostrar una anemia hemolítica leve a moderada (29).

DEFICIENCIA DE ALDOLASA

Esta enzima cataliza la conversión de fructosa 1,6 difosfato a las triosas dihidroacetona fosfato y gliceraldehido-3-fosfato. **Incidencia:** solo dos familias han sido reportadas en el ámbito mundial. **Manifestaciones clínicas:** anemia hemolítica que puede estar asociada a retardo mental (9,30).

DEFICIENCIA DE TRIOSA FOSFATOISOMERASA

Esta enzima cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído-3-fosfato, y viceversa. **Herencia:** es de tipo autosómica recesiva. **Incidencia:** 28 casos han sido reportados en todo el mundo, particularmente en EEUU, Europa y Japón.

MANIFESTACIONES CLINICAS

Se presenta anemia hemolítica, disfunción neurológica progresiva, susceptibilidad aumentada a las infecciones y muerte en la niñez temprana. La anemia hemolítica es moderada pero la disfunción neurológica es responsable de la morbi-mortalidad aumentada. Los síntomas neurológicos aparecen entre los seis meses y dos años de edad. Hay daño de la neurona motora anterior con aparición de distonía y disquinesia. La debilidad es generalizada, pero predomina en las piernas. Las manifestaciones clínicas sistémicas sugieren fuertemente que la deficiencia de TPI involucra todos los tejidos del cuerpo y así la TPI ha sido encontrada deficiente en eritrocitos, linfocitos, músculos, corazón, suero, LCR, fibroblastos, cerebro, hígado, páncreas, riñón. (9, 31,41).

DEFICIENCIA DE FOSFOGLICEROQUINASA

Esta enzima cataliza la conversión de 1,3-difosfoglicerato a 3-fosfoglicerato, el primer paso que genera ATP en la glicólisis. **Incidencia:** doce casos han sido reportados en la literatura. **Herencia:** es la única deficiencia de las enzimas glicolíticas ligada al sexo. **Manifestaciones clínicas:** anemia hemolítica crónica acompañada de manifestaciones neurológicas, que incluyen: retardo mental de grado variable, labilidad emocional, convulsiones, y enfermedad extrapiramidal progresiva. **Diagnóstico:** se realiza mediante cuantificación de la actividad de PGK en los eritrocitos. Los deficientes usualmente presentan entre 0 y 10% de la actividad normal (1, 9, 32).

OBJETIVOS

Analizar los estudios realizados a 2338 pacientes con anemias hemolíticas congénitas no inmunes referidos al Instituto de Oncología y Hematología durante el período 1987-1997 para establecer la etiología de la anemia.

Analizar el estudio clínico, hematológico, bioquímico, e inmunológico realizado a los pacientes que resultaron con enzimopatías de la vía glicolítica.

Correlacionar en los pacientes con anemias hemolíticas por deficiencias de enzimas glicolíticas y hemoglobinopatías los niveles séricos de hierro y ferritina con resultados de las pruebas inmunológicas para detectar alteraciones de la inmunología humoral y celular.

Presentar las características clínicas y bioquímicas de la variante de piruvato quinasa detectada en pacientes venezolanos con anemia hemolítica asociada a úlceras en piernas y compararla con la piruvato quinasa de los eritrocitos de los pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa pero sin úlceras en miembros inferiores.

Además, presentar la incidencia de la deficiencia de piruvato quinasa en grupos de habitantes de diferentes regiones de Venezuela que incluye poblaciones indígenas, negroides y mestizas para tratar de dilucidar el origen de la deficiencia de PK en Venezuela

Comparar las características bioquímicas y cinéticas de la enzima piruvato quinasa proveniente de eritrocitos de pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa, con la enzima piruvato quinasa de eritrocitos de perros Basenji con anemia hemolítica por dicha deficiencia. Dicho estudio incluye las alteraciones en la permeabilidad de cationes del eritrocito humano y canino deficiente en piruvato quinasa que podrían contribuir a el mecanismo de hemólisis

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL

- 200 Muestras de sangre provenientes de indígenas venezolanos.
- 400 Muestras de sangre provenientes de habitantes de diferentes regiones de Venezuela: 157 de Caracas (Dto. Federal), 20 de SanCristóbal (Edo. Táchira), 32 de Pregonero (Edo. Táchira), 102 de Adícora (Edo Falcón), 131 de Tapipa (Edo Miranda).
- 2338 pacientes con anemia hemolítica referidos al Instituto de Oncología y Hematología del MSAS-UCV durante el período 1987-1997.

Animales experimentales: 2 Perros Basenji con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa, uno homocigoto y otro heterocigoto, 2 Golden Retriever sirvieron de controles.

METODOS

- A. **HISTORIA CLÍNICA Y EXAMEN FÍSICO** de los pacientes con deficiencia de enzimas glicolíticas (seguidos durante 20 años).
- B. **ESTUDIOS DE LABORATORIO:**
1. Hematología, conteo de reticulocitos, niveles séricos de bilirrubina total y fraccionada.
 2. Curva de fragilidad globular en fresco e incubada
 3. Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa Helena y corridas en cámara microzonal Beckman, usando buffer tris-borato-EDTA, pH 8, de

acuerdo a las recomendaciones del Comité para Estandarización en Hematología (33).

4. Cuantificación de la Hb A2 aislada por cromatografía usando columnas de Sephadex de intercambio de aniones de los Laboratorios Helena, según la técnica de Bernini (34).
5. Cuantificación de la hemoglobina fetal por inmunodifusión radial usando placas de gel que contienen anticuerpos anti-hemoglobina fetal de los Laboratorios Helena.
6. **Cuantificación de los niveles intraeritrocíticos de las enzimas** de la vía glicolítica y de la hexosa monofosfato por espectrofotometría, siguiendo la metodología descrita por Beutler en la referencia 35, usando un espectrofotómetro Gilford con registrador. Para ello se procedió a separar los eritrocitos del resto de los componentes de la sangre de la siguiente forma:

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

Se cuantificaron las siguientes enzimas de la vía de la hexosa monofosfato:

1. Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PD)
2. 6-fosfogluconato dehidrogenasa (6PGD)
3. Glutación reductasa. (GR)

Se cuantificaron las siguientes enzimas de la vía glicolítica

1. Hexoquinasa (Hx).
2. Glucosa-fosfato-isomerasa (GPI).

3. Gliceraldehido-fosfato-dehidrogenasa (GPD).
4. Fosfogliceroquinasa (PGK).
5. Difosfogliceromutasa (DPGM).
6. Monofosfogliceromutasa (MPGM).
7. Enolasa.
8. Piruvatoquinasa (PK).
9. Deshidrogenasa láctica (LDH).

7. Caracterización bioquímica de la enzima Piruvato Quinasa intraeritrocítica de pacientes, donantes de sangre y perros Basenji.

Se preparó el hemolizado según la técnica de Beutler descrita en el párrafo anterior y se purificó parcialmente la enzima piruvato quinasa de los eritrocitos precipitándola con sulfato de amonio según el método de Kahn con ligeras modificaciones según recomendaciones del Comité Internacional de Estandarización en Hematología y se cuantificó la enzima según la técnica de Beutler. (35, 36). A la enzima parcialmente purificada se le determinaron los siguientes parámetros:

1. Constante de Michaelis (KM) para sus sustratos adenosindifosfato (ADP) y fosfoenolpiruvato (PEP).
2. Curva de la termoestabilidad.
3. Electroforesis en gel fino de poliacrilamida.

8. Estudios del contenido de cationes intraeritrocíticos y la permeabilidad de la membrana del eritrocito a los cationes: El paquete de eritrocitos de la sangre proveniente de pacientes o perros deficientes en piruvato quinasa y la sangre usada como control proveniente de pacientes con anemia hemolítica autoinmune con reticulocitosis o perros controles fue separada por centrifugación.

Estudio del contenido de Na y K intraeritrocítico en fresco: el paquete globular fue lavado tres veces con 15 volúmenes de CIMg (300 mOsmolar). Dicho paquete globular fue suspendido en dicha solución volumen a volumen para llevarlo a 50%

de Hto y el contenido de Na y K fue medido en un fotómetro de llama modelo 143 (Instrumentation Laboratory corporation, Lexington, Mass, USA): 0,020 ml de la suspensión de eritrocitos fue añadida a un unopette que contenía 3,98 ml de carbonato de litio (Na-K unopette, Becton-Dickinson, Sutherford, New Jersey, USA).

Estudios de la permeabilidad de la membrana del eritrocito para los cationes:

la sangre fue lavada tres veces en buffer Na-HEPES (n-2- hidroxitipiperazina-N-2-ácido etano sulfónico) con la siguiente composición: 140 mM NaCl, 5mM KCl, 1 mM CIMg, 1 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES (pH: 7,4 a 37 °C).

El paquete de glóbulos rojos fue resuspendido en Na-Hepes hasta un Hto del 20% y se le realizaron los siguientes parámetros hematológicos: conteo de eritrocitos, hemoglobina y la hemoglobina corpuscular media (HCM). Dichos parámetros fueron determinados con un contador Coulter, y el hematocrito fue determinado manualmente en una microcentrífuga Internacional y el volumen corpuscular medio (VCM) calculado del conteo de eritrocitos del Coulter y el Hto manual (VCM: Hto x 10⁶/gl. Rojos x 10⁶ Se midieron niveles intraeritrocíticos de ATP (35).

Estudio de los cationes intraeritrocíticos de los eritrocitos jóvenes y de los viejos (maduros):

El paquete de glóbulos rojos de pacientes y perros deficientes en piruvato quinasa, y de sangre control proveniente de pacientes con anemia hemolítica autoinmune y reticulocitosis fueron llevados al 80% de suspensión con CIMg y fueron centrifugados a 3400 r.p.min. por 60 minutos y fueron tomadas muestras de eritrocitos de la capa superficial (eritrocitos jóvenes) y eritrocitos del fondo del tubo de ensayo (eritrocitos maduros)

Los eritrocitos jóvenes de los pacientes con deficiencia de piruvato quinasa y con anemia hemolítica autoinmune y los eritrocitos de los perros deficientes en PK

fueron suspendidos con un Hto al 5% en el buffer Na-GBS, luego se incubaron cuatro horas a 37°C en presencia ó ausencia de KCN al 2mM.

Al comienzo de las incubaciones (Tiempo 0: T0) y al finalizar las cuatro horas (Tiempo 4 horas: T4) se tomaron muestras de la suspensión de eritrocitos y se midió el contenido intraeritrocítico de Na y K, contenido de ATP, índices globulares.

9. **Determinación de calcio eritrocítico en un espectrofotómetro de absorción atómica.** Para ello el paquete de glóbulos rojos de pacientes con deficiencia de piruvato quinasa, hemoglobinopatías, talasemias y glóbulos rojos de donantes fueron lavados en un buffer Tris-Hcl pH 7,4 con una concentración de cloruro de colina de 160mM, procediéndose a la determinación del calcio (37).
10. **Cuantificación de los niveles de inmunoglobulinas tipo IgG, IgM, IgA** por inmunodifusión radial en placas de gel con anticuerpos anti-IgG, IgA, IgM.(38).
11. **Cuantificación de los niveles de complemento hemolítico total** con glóbulos rojos de carnero (39)
12. **Cuantificación de los componentes del complemento C3 y C4** en placas de gel con anticuerpos anti-C3 y anti-C4 (39).
13. **Respuesta proliferativa de las células mononucleares (CMN) de sangre de controles y pacientes con anemias hemolíticas congénitas por hemoglobinopatías, talasemias, deficiencias de enzimas.** Se estudió la respuesta proliferativa a los siguientes mitógenos: fitohemaglutinina de Phaseolus vulgaris (PHA, Welcome Research Lab., Beckenham, Inglaterra), Concanavalina A de Conavalia ensiformis (Con A, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo) y mitógeno de Fitolaca americana (PWM, Gibco Lab., Grand Island, NY.)

Obtención de células mononucleares de sangre periférica: se obtuvieron bajo condiciones de esterilidad centrifugando la sangre en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque de acuerdo al método descrito por Boyum en 1968 (40). El Ficoll Hypaque se preparó a una densidad de 1077-1080 g/l. La sangre fue diluida 1:1 en solución buffer fosfato (PBS) a pH 7,2 y se colocaron en tubos plásticos cónicos a la proporción de 10 ml de sangre sobre se centrifugaron a 1800 4 ml de Ficoll Hypaque y r.p.m. durante 10 min., obteniéndose una interfase blanquecina donde se ubican las células mononucleares. De aquí se extrajeron con pipeta Pasteur y se lavaron 3 veces en PBS. Las células se resuspendieron en 5 ml de RPMI-1640 (Lab. Gibco) suplementado al 0,2% con una mezcla de antibióticos-antimicóticos (10.000 U/ml Penicilina G, 10.000 µg/ml amfotericina B, y suero fetal bovino al 5% previamente inactivado a 56°C durante 30 min. Se procedió luego al conteo de células mononucleares con solución de Turk a una dilución de 1:10, la cual contiene violeta de Genciana al 0,1 % en ácido acético al 3%. La suspensión celular se ajustó a una concentración de 1×10^6 células/ ml para los cultivos con mitógenos.

Método de cultivo y ensayo de proliferación: 10^5 células fueron colocadas en pozos de 0,1 ml en placas de microcultivo de fondo redondo (Linbro, Flow Lab, Inc, MacLean Virginia, USA). A cada pozo se le añadió 0,1 ml de RPMI-1640 suplementado para el caso de los cultivos no estimulados y 0,1 ml por pozo de los mitógenos. Previo a la realización de los ensayos, se realizó curvas dosis-respuestas para determinar las concentraciones a ser utilizadas.

Dilución de los mitógenos: estos estuvieron disueltos en RPMI-1640 y preparados como soluciones madres en alícuotas a una concentración de 1000 µg/ml utilizados. Las placas de los cultivos estimulados con mitógenos fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 horas.

Medidas de la transformación blástica: La evaluación de la transformación blástica de las CMN estimuladas se realizó mediante la determinación de la incorporación de un precursor isotópico de ADN (Oppenheim y col., 1976). Se añadió 18 horas antes de finalizar los

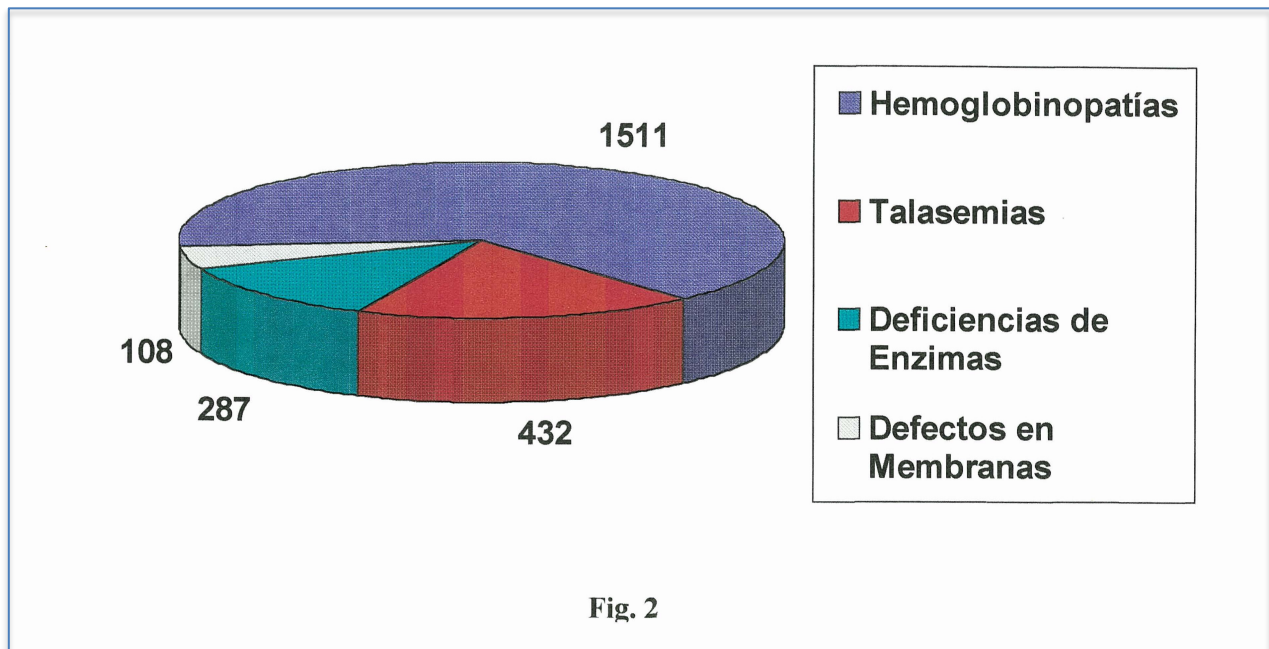
cultivos 0,5 microcuries por pozo de Timidina Triteriada ($^3\text{H-TdR}$) (New England Nuclear) de una actividad específica 2 Ci/mM. La recolección fue hecha empleando un cosechador semiautomático de muestras múltiples (MASH II, Microbiological Associates) sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman Glass Microfibre Filters. Whatman Ltd. Maidstone, England), los cuales permitieron que las células sean retenidas y que la radioactividad no incorporada sea eliminada mediante lavados sucesivos con agua destilada; los filtros se dejan secar en estufa a 37 °C, se colocan en miniviales de centelleo y se les añade 4 ml de líquido de centelleo (tolueno+PPO+PoPOP), el cual se preparó con 6 mg de Dimetil PoPOP (Packard Instrument Co, Inc. Powers Grone, III) por litro de tuoleno.

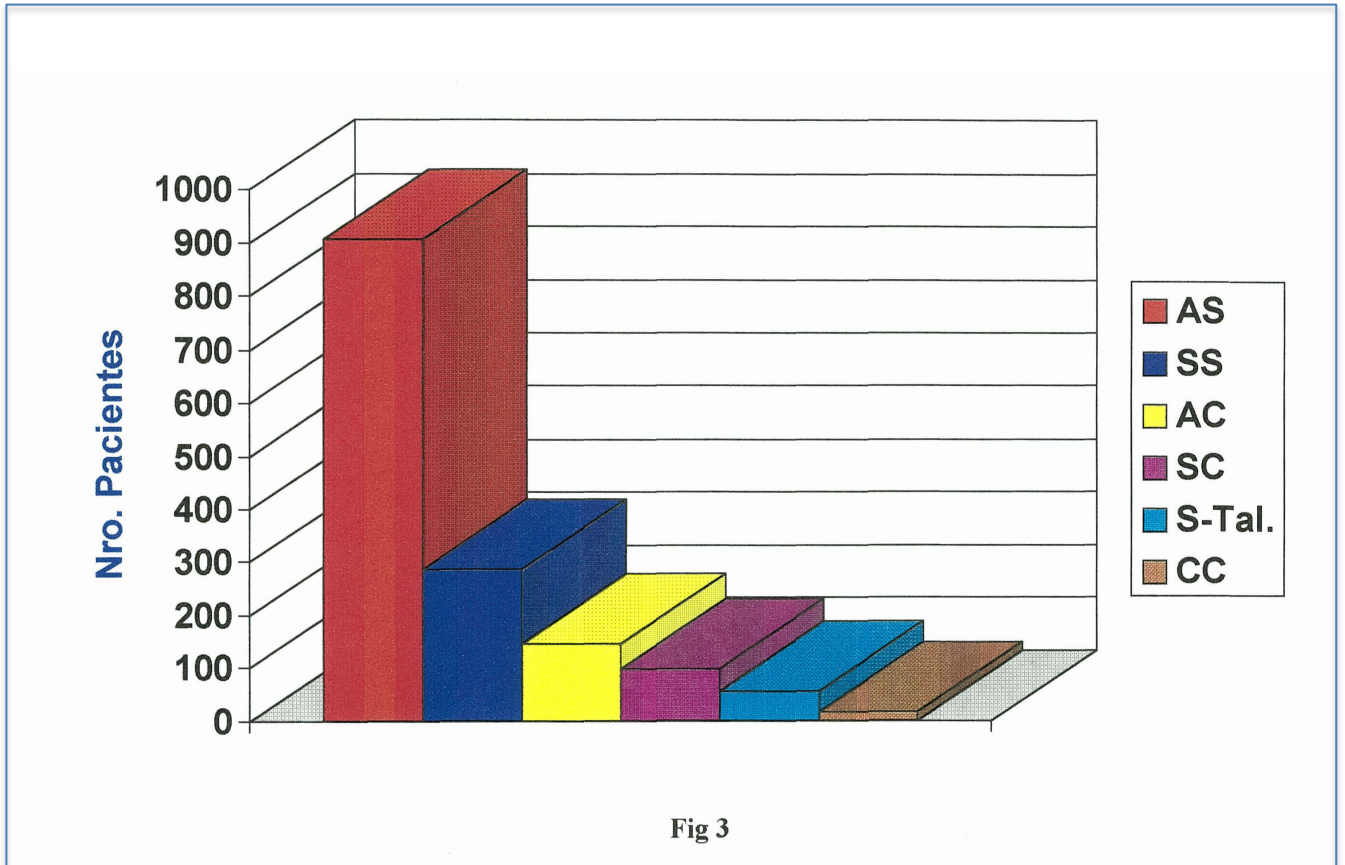
RESULTADOS

ETIOLOGÍA DE LA HEMÓLISIS EN 2338 PACIENTES CON ANEMIA HEMOLÍTICA CONGÉNITA

2338 pacientes con anemias hemolíticas congénitas fueron estudiados en el Instituto de Oncología y Hematología del MSAS-UCV en el período 1987-1997. Aplicando la metodología descrita anteriormente se clasificaron de acuerdo a la etiología de la hemólisis en: 1511 hemoglobinopatías; 432 síndromes talasémicos, 287 deficiencias de enzimas y 108 defectos de la membrana del eritrocito (Fig.2). Los 1511 pacientes con hemoglobinopatías fueron clasificados de la siguiente manera: 287 drepanocitosis homocigótica (HbSS), 907 taras drepanocíticas (Hb AS), 147 hemoglobinopatías tipo AC, 98 Hemoglobinopatías tipo SC, 15 Hemoglobinopatías CC, 57 Hemoglobinopatías tipo S-Talasemia (Fig.3)

Hemólisis en 2338 pacientes con Anemia Hemoglobinopatías Talasemias





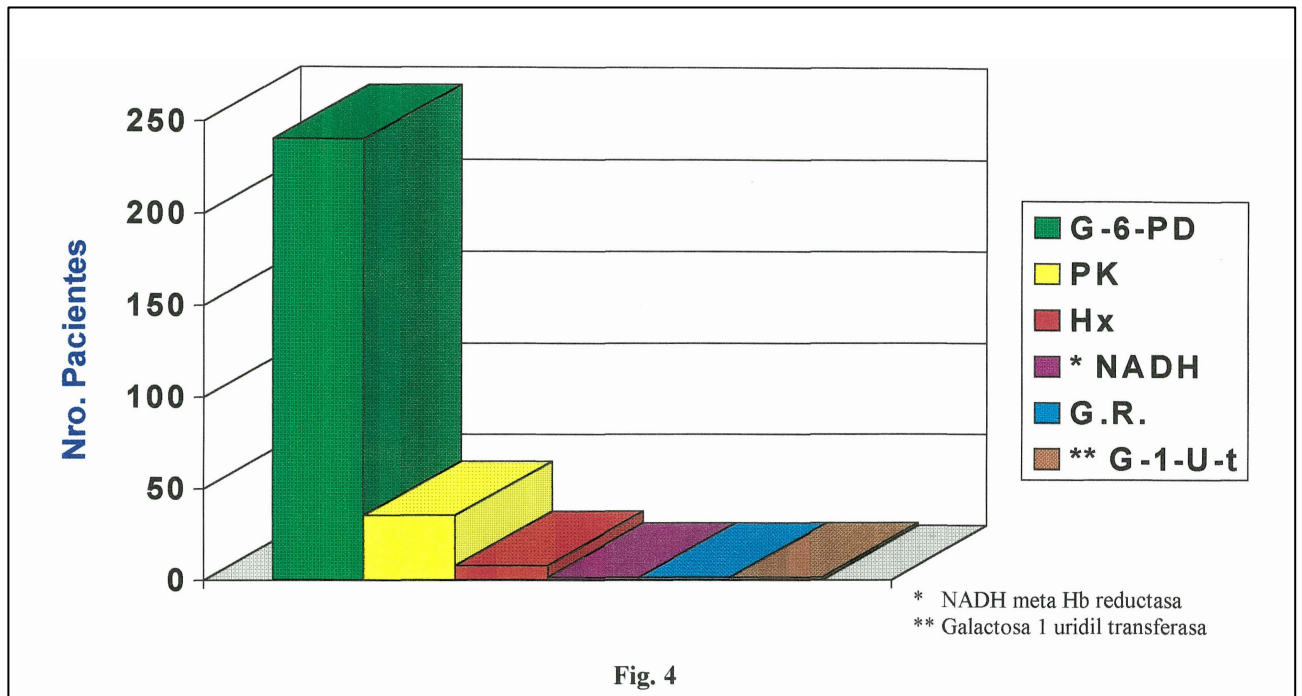
CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES DEFICIENTES EN ENZIMAS

Los pacientes con anemia hemolítica congénita clasificados como deficientes en enzimas del eritrocito presentaron las pruebas de Coombs directa e indirecta negativas, indicándonos que la anemia no era debida a autoinmunidad. La electroforesis de hemoglobina fue normal detectándose solo las bandas AA del adulto normal con niveles normales de hemoglobina A2 y niveles de hemoglobina fetal, de acuerdo a la edad del paciente, indicándonos que la anemia no era debida a hemoglobinopatías ni talasemias. La prueba de la inestabilidad de la hemoglobina fue negativa indicándonos que la anemia no era debida a la presencia de hemoglobinas inestables. La curva de fragilidad globular de estos pacientes tanto en fresco como incubada y el frotis de sangre periférica de estos pacientes (los cuales fueron coloreados con Wright y examinados cuidadosamente bajo el microscopio de luz)

no fueron compatibles con anemia hemolítica por defectos de la membrana del eritrocito tales como esferocitosis, ovalocitosis, estomatocitosis, etc. La cuantificación de las enzimas de las vías glicolíticas y hexosa monofosfato fueron normales excepto las correspondientes a la deficiencia enzimática del paciente.

De 2338 pacientes con diagnóstico de anemia hemolítica congénita, 287 pacientes (12,27%) presentaron deficiencias enzimáticas. De éstos 241 pacientes presentaron la deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (84,32 %). Se detectaron 35 pacientes deficientes en piruvato quinasa (12,19%), 8 pacientes deficientes en hexoquinasa (2,78%), 1 paciente deficiente en NADH metaHb reductasa (0,3%), 1 paciente deficiente en galactosa 1 uridiltransferasa (0,3%) (Fig.4)

287 Pacientes Deficientes en Eritroenzimopatías



CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES DEFICIENTES EN ENZIMAS DE LA VÍA GLICOLÍTICA

De 287 pacientes deficientes en las enzimas de las vías glicolítica y hexosa monofosfato, se detectaron 35 pacientes deficientes en piruvato quinasa y 8 pacientes deficientes en hexoquinasa. No se detectaron otras deficiencias de la vía glicolítica en este estudio realizado con pacientes venezolanos.

ESTUDIO HEMATOLÓGICO DE LOS PACIENTES DEFICIENTES EN LA PIRUVATO QUINASA:

Los pacientes deficientes en piruvato quinasa propósitos presentaron antecedentes de ictericia neonatal, que en la mayoría de los casos ameritó fototerapia o exanguinotransfusión.

Clínicamente se caracterizaron por presentar ictericia conjuntival, palidez cutáneo mucosa, esplenomegalia desde el grado I al III, que varió en tamaño de acuerdo a la edad del paciente y a la severidad de la hemólisis. La mayoría presentó hepatomegalia discreta. Tres de las familias estudiadas se caracterizaron porque algunos de sus miembros presentaron úlceras en miembros inferiores (Tabla 1a y 1b).(Fig.5).

Manifestaciones Clínicas de los Propósitos Deficientes en Piruvato Quinasa

	%
ICTERICIA NEONATAL	100
FOTOTERAPIA	40
EXANGUINOTRANSFUSION	50
CRISIS HEMOLITICA CRONICA	100
CRISIS HEMOLITICA POR INFECCION	50
HEPATOMEGALIA	60
ESPLENOMEGALIA	100
ULCERAS EN PIERNAS	30
DISMINUCION T _x POSTESPLENECTOMIA	100

TABLA 1a

**Aspectos Clínicos y Valores Hematológicos
de Pacientes deficientes en PK**

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

TABLA Ib



Fig. 5

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

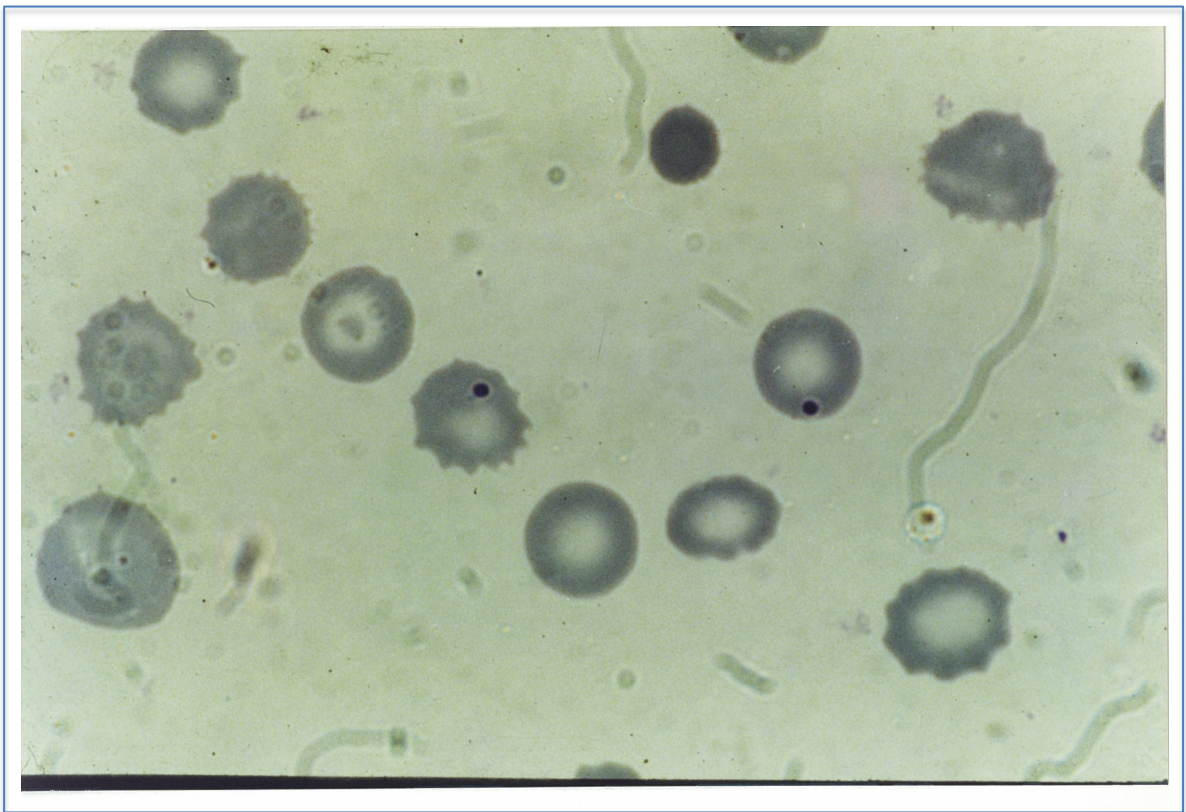


Fig. 6

En todos los casos las infecciones sobre agregadas agravaron la hemólisis y la esplenectomía disminuyó los requerimientos transfusionales.

Un paciente propósito (AD) ameritó exanguinotransfusión al nacer y transfusiones a repetición en el período de lactante menor, por lo cual hubo que esplenectomizarlo a los 8 meses de edad, disminuyendo a partir de ese momento los requerimientos transfusionales. Este es el paciente con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa de este grupo que fué esplenectomizado más precozmente. En el transcurso de sus 22 años este paciente ha ameritado transfusiones de concentrado globular cuando ha presentado cuadros virales o bacterianos. Dicho paciente hubo que colecistectomizarlo a los 18 años de edad por cálculos en la vesícula biliar (Fig. 12).

Otro paciente (LS) se le hizo el diagnóstico de deficiencia de piruvato quinasa asociada a úlceras en piernas en la quinta década de su vida cuando fue sometido a una colecistectomía por cálculos en la vesícula biliar y se le estudia su anemia hemolítica, hasta esa fecha de causa desconocida. Este paciente murió a los 72 años de edad de problemas cardiovasculares. Su hermana mayor que sufría de su misma enfermedad, había muerto sin diagnóstico, hacía 20 años (Fig.16).

VALORES DE HIERRO SÉRICO, CAPACIDAD TOTAL DE FIJACIÓN DEL HIERRO Y FERRITINA DE PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA

Se estudiaron 15 pacientes propósitos con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa observándose que el nivel de hierro sérico estuvo en algunos de ellos por arriba del límite superior del rango normal y la ferritina siempre estuvo elevada con valores de 232 – 1650 ng/ml (VN: 12-100) esto dependió del grado de hemólisis y la edad del paciente (Tabla II).

Hierro, CTCH y Ferritina en 15 pacientes Propósitos con deficiencia de Piruvato Quinasa

HIERRO	128 – 209,4	(VN: 60 - 160 mg/dl)
CTCH*	293 – 686,4	(VN: 250 – 400 mg/dl)
SATURACION	27 – 47	(VN: 20 – 55 %)
FERRITINA	232 – 1650	(VN: 12 – 100 ng/ml)

TABLA II

*CTCH: Capacidad total de combinación del hierro

ESTUDIOS DE LA INMUNOLOGÍA HUMORAL Y CELULAR DE PACIENTES DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA

Como puede apreciarse en la Tabla III los pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa presentaron valores que cayeron dentro del rango de la normalidad den IgG, IgM, IgA y de complemento CH50, C3, C4.

Diez de estos pacientes presentaron un número normal de linfocitos B y T en sangre periférica. Así mismo presentaron valores normales en las subpoblaciones de linfocitos B medidos con anticuerpos monoclonales específicos CD10, CD19 y CD20 y de las subpoblaciones de linfocitos T medidos con CD4 y CD8 (Tabla IV).

INMUNOLOGÍA HUMORAL DE 15 PACIENTES DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA

IgG	1455 ± 195 mg/dl	(VN: 1125 ± 475)
IgA	218,5 ± 161,5 mg/dl	(VN: 195 ± 155)
IgM	90 ± 65 mg/dl	(VN: 177,5 ± 122,5)
CH50	185 - 277 U/h/cc	(VN: 200 ± 50)
C3	95 - 190 mg/dl	(VN: 140 ± 50)
C4	21 - 39 mg/dl	(VN: 30 ± 10)

TABLA III

**INMUNOFENOTIPAJE DE LINFOCITOS T Y B EN 10 PACIENTES
PROPÓSITOS DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA**

	%	Controles Valores Normales %
LINFOCITOS "T"		
CD7	75,5 ± 6,5	72,5 ± 12,3
CD4	35 ± 8	37,2 ± 8,7
CD8	24 ± 10	14,5 ± 34,1
RELACION T4/T8	1,45 ± 0,2	1,6 ± 0,4
LINFOCITOS "B"		
CD10	1,4 ± 1,3	11,8 ± 4,9
CD19	21,5 ± 4,5	15,7 ± 6,1
CD20	14 ± 1	15,7 ± 6,1

TABLA IV

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LAS CÉLULAS
MONONUCLEARES DE LOS PACIENTES CON ANEMIA HEMOLÍTICA
POR DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA**

Se estudió la respuesta proliferativa de las células mononucleares separada de sangre periférica de 6 pacientes propósitos con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa y se comparó con la respuesta de las células mononucleares de donantes del Banco de Sangre que sirvieron de controles y de pacientes con hemoglobinopatías tipo drepanocitosis SS y se notó una disminución de la respuesta proliferativa de las células mononucleares a la Phitohemaglutinina y a la concanavalina A (Fig. 7 y Fig. 8).

Respuesta Proliferativa a la PHA de las Células Mononucleares

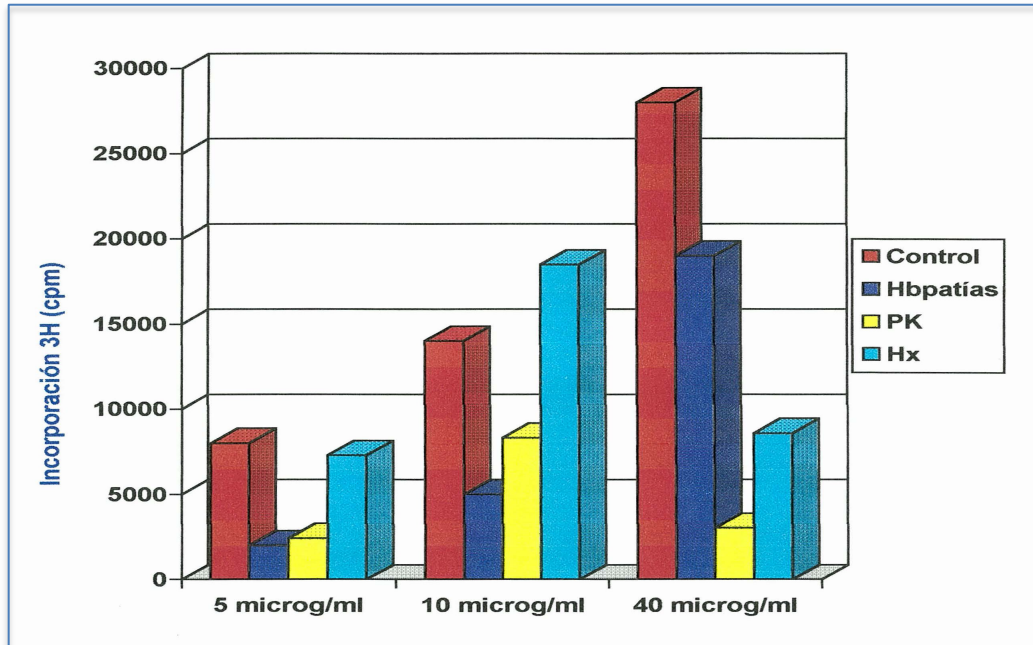


Fig. 7

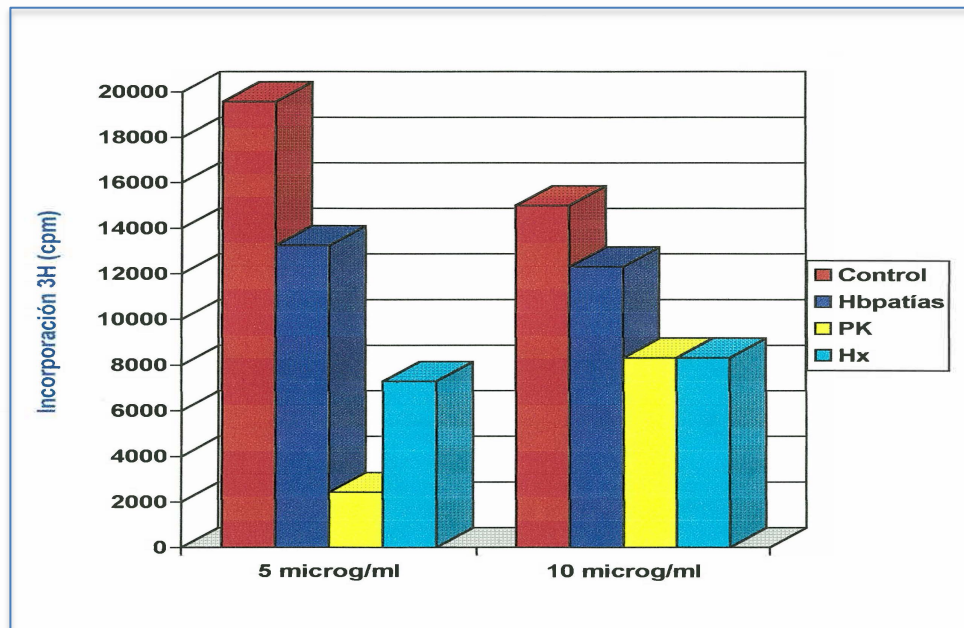


Fig. 8

Respuesta proliferativa a la Con A de las Células Mononucleares

**CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES DEFICIENTES EN PIRUVATO
QUINASA DE ACUERDO A LOS NIVELES INTRAERITROCÍTICOS
DE LA ENZIMA.**

Estos pacientes fueron clasificados de acuerdo al nivel intraeritrocítico de la enzima piruvato quinasa. De 35 pacientes estudiados 25 pacientes fueron clasificados como deficientes homocigotos (o dobles heterocigotos) y 10 pacientes en heterocigotos. (Tabla V). (Fig.9).

**Pacientes con deficiencias de Piruvato Quinasa y Hemólisis
Valores de la Piruvato Quinasa intraeritrocítica de 25 Propósitos Deficientes en**

	Paciente	Edad	Retic %	Paciente PK = U.I./gHb	Control	% Control
1	F.C.	47	25	7,80	16,50	47,27
2	L.C.	38	30	7,00	10,57	66,23
3	E.F.	6	15	2,90	9,93	29,20
4	A.D.	2	20	2,10	8,96	23,44
5	J.M.	18	26	4,54	7,77	58,43
6	6. J.S	55	24	1,48	5,60	26,43
7	Ye. R.	7	30	6,43	9,47	67,90
8	C.S.	25	57	5,50	8,42	65,32
9	G.M.	18	14	0,61	2,00	30,50
10	J.G.M.	20	14	0,40	2,00	20,00
11	U.G.M.	14	16	0,64	2,00	32,00
12	V.G.M.	5	23	0,85	2,00	42,50
13	W.C.	6	15	2,14	4,65	46,02
14	J.G.	9	33	2,13	6,37	33,44
15	M.M.	9	20	3,75	11,10	33,78
16	W.C.	9	33	3,35	7,38	45,39
17	CHA	6	15	2,50	15,00	16,67
18	D.E.	26	20,2	2,97	5,66	52,47
19	R.Y.	4	20,4	7,35	10,30	71,36
20	M.M.	16	20	5,10	8,47	60,21
21	J.P.	18	18	1,99	3,35	59,40
22	J.B.	16	15	1,05	4,91	21,38
23	C.R.	15	16	8,52	16,52	51,57
24	A.M.	6	18	4,54	7,77	58,43
25	J.G.V.	3	20	3,10	6,69	46,34
				Valores PK	$3,55 \pm 2,42$	$7,74 \pm 4,20$

TABLA V

Piruvato Quinasa
Pacientes con deficiencias de Piruvato Quinasa y Hemólisis

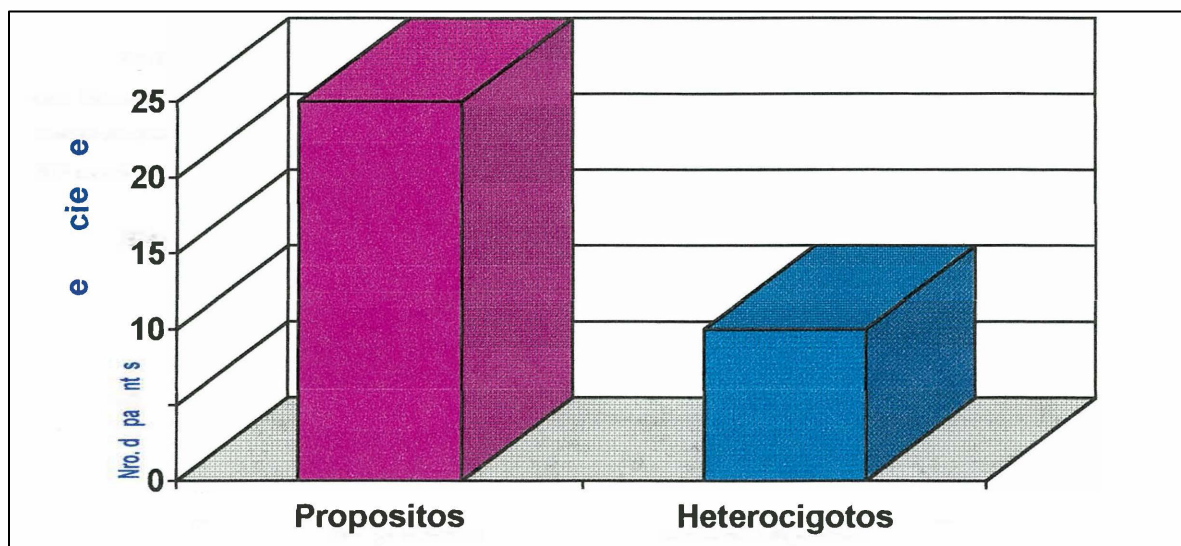


Fig. 9

HERENCIA DE LA PIRUVATO QUINASA

En todas las familias estudiadas deficientes en piruvato quinasa la herencia fue autosómica recesiva, los hijos provenían de padres heterocigotos para la deficiencia de piruvato quinasa (Fig. 10 a 16)

Deficiencia de PK Familia GUE. (Pregonero, Edo. Táchira)

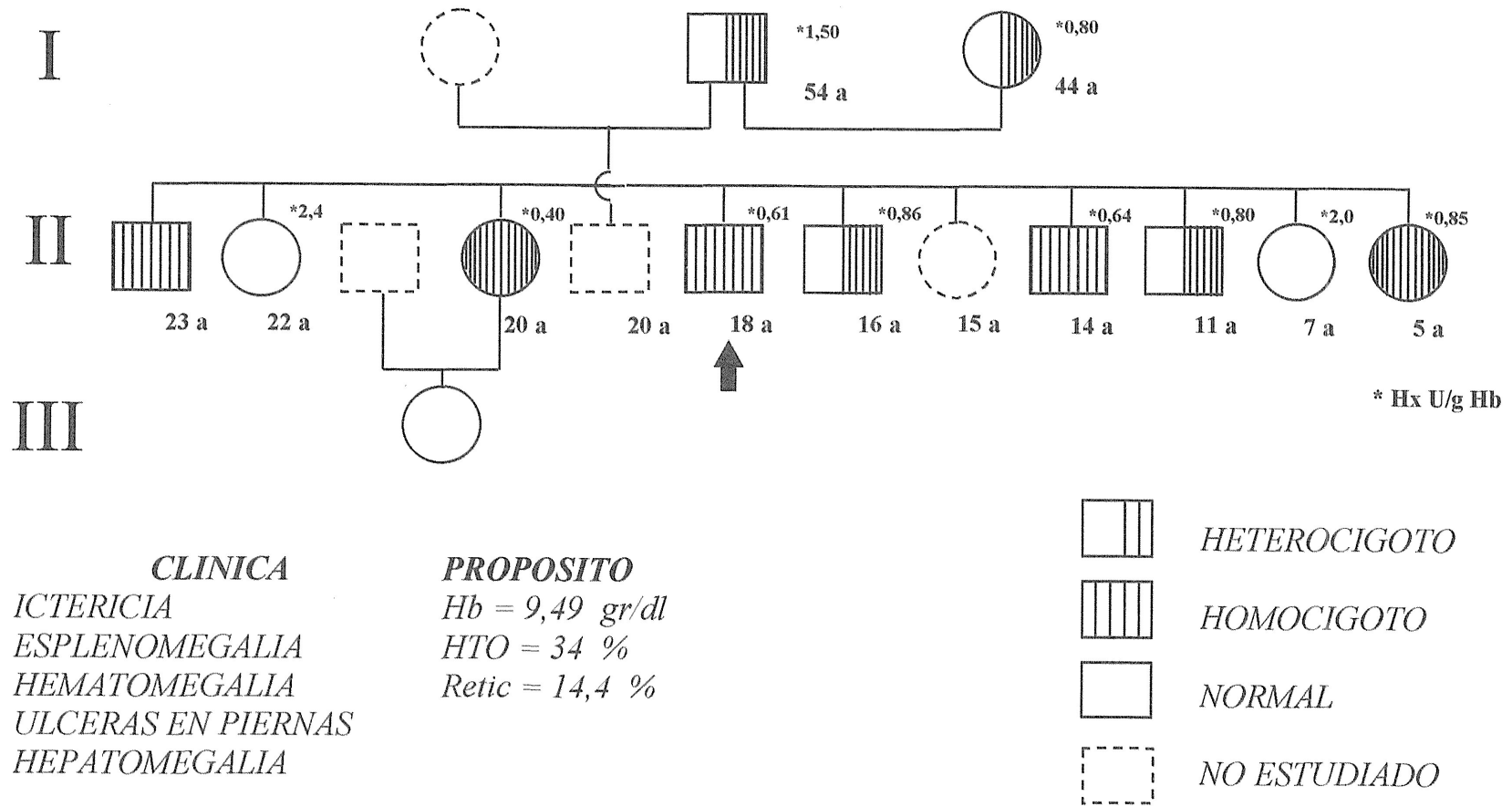
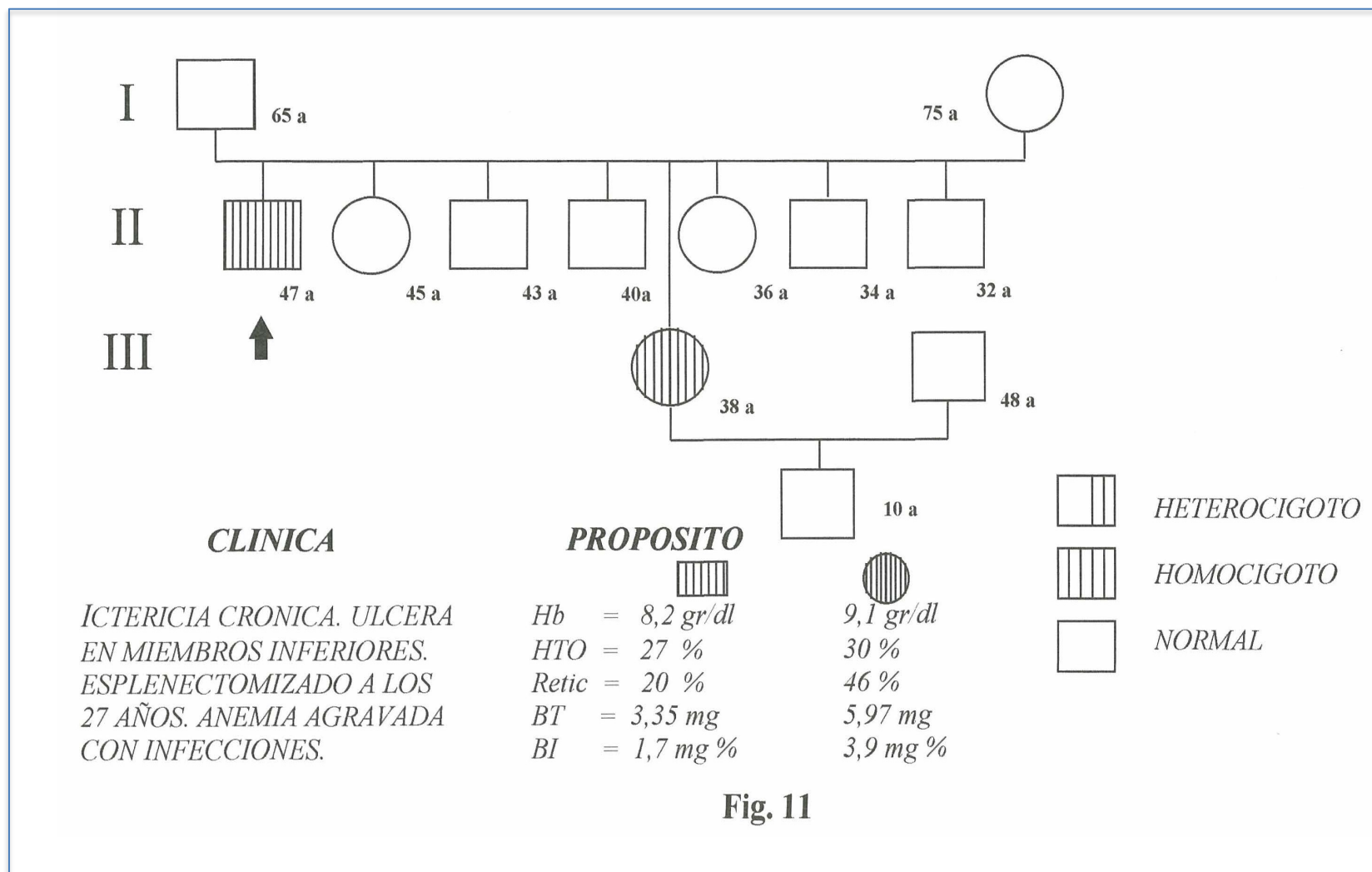


Fig. 10

Deficiencia de PK
Familia CAST (San Cristóbal, Edo. Táchira)



Deficiencia de Pk
Familia A-Día (Maracaibo, Edo. Zulia)

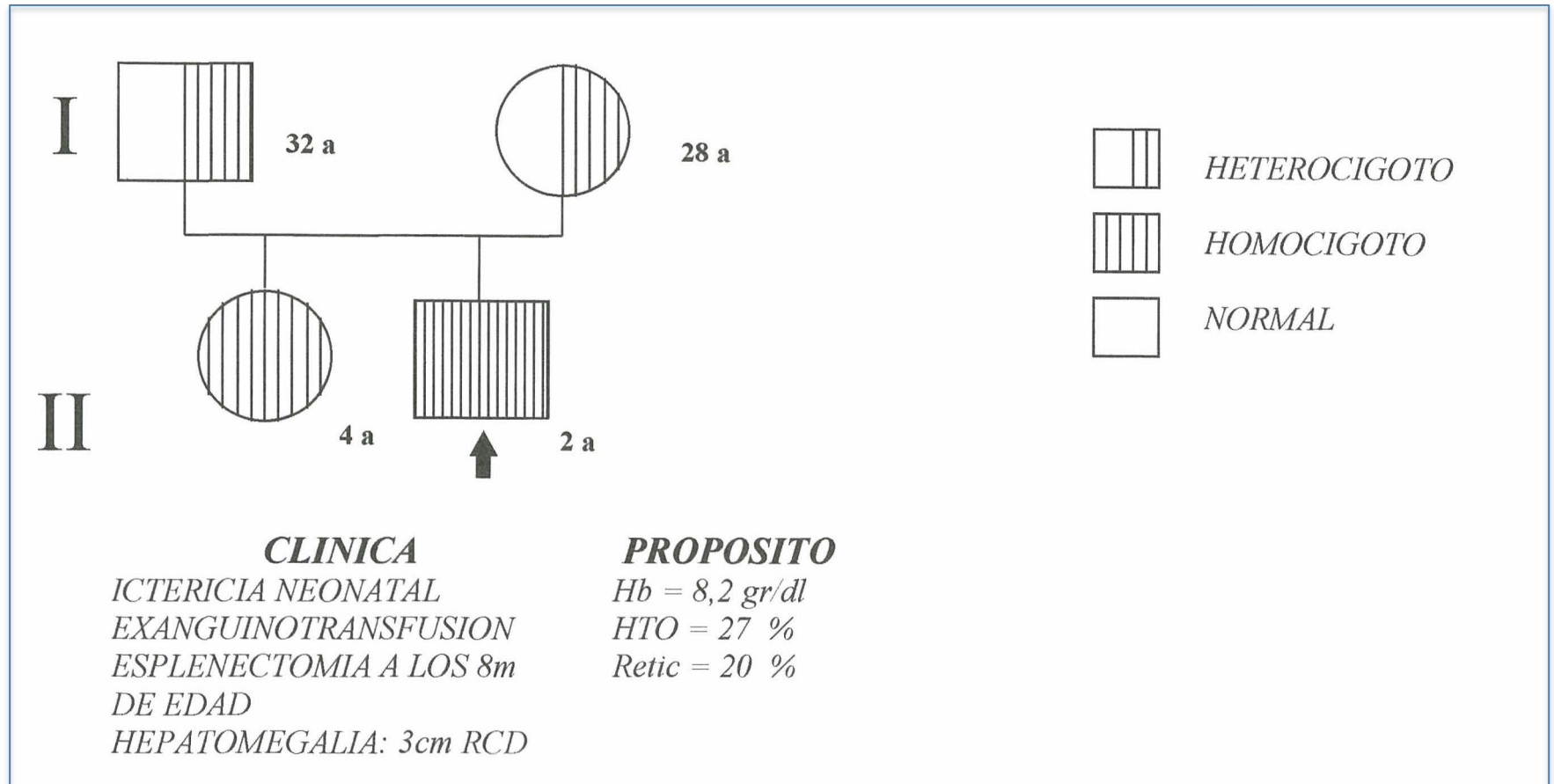


Fig. 12

Deficiencia de PK
Familia MOLI (Mérida, Edo. Mérida)

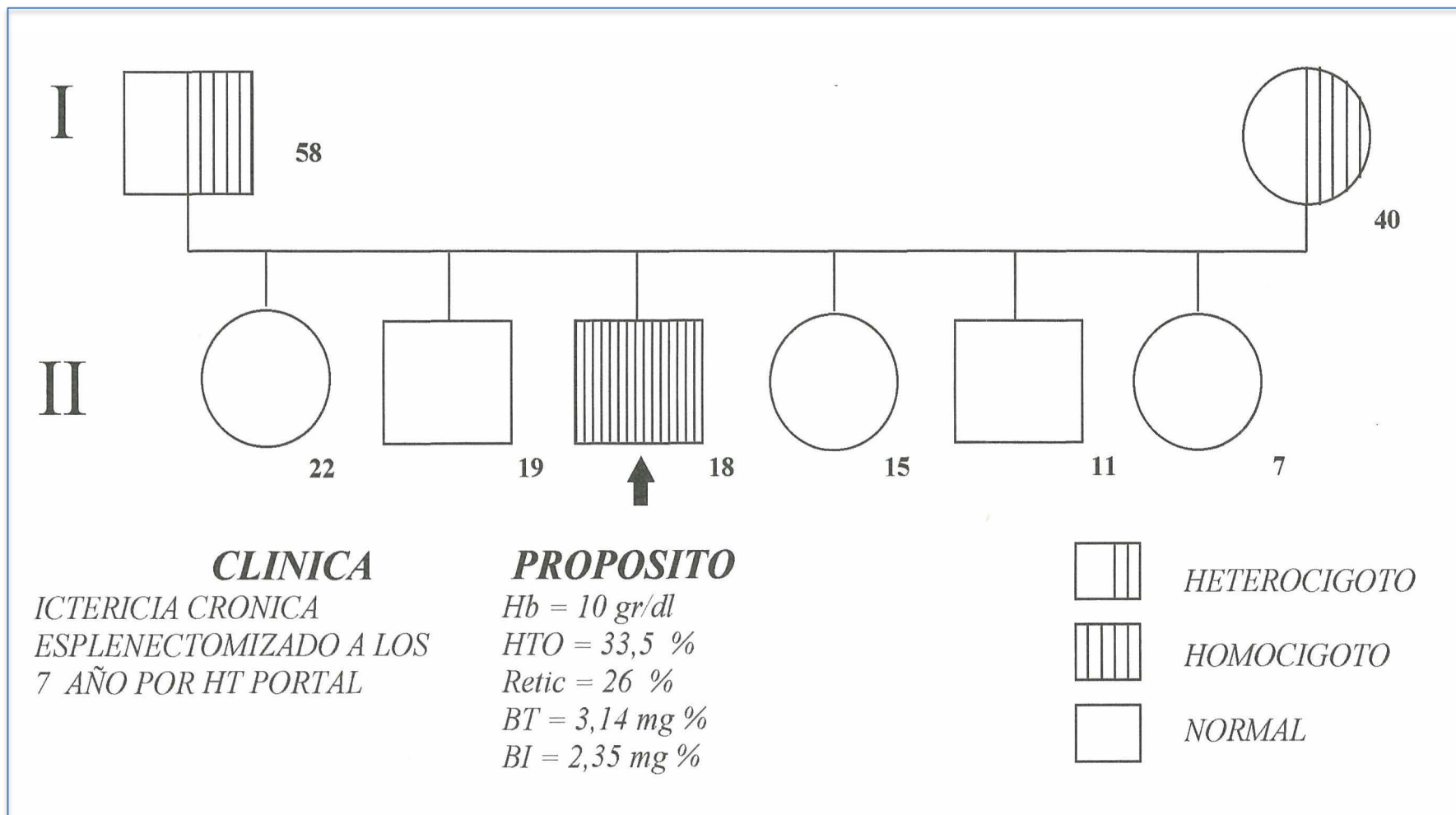


Fig. 13

Deficiencia de PK
Familia SIMA (San Cristobal, Edo. Táchira)
Deficiencia de PK

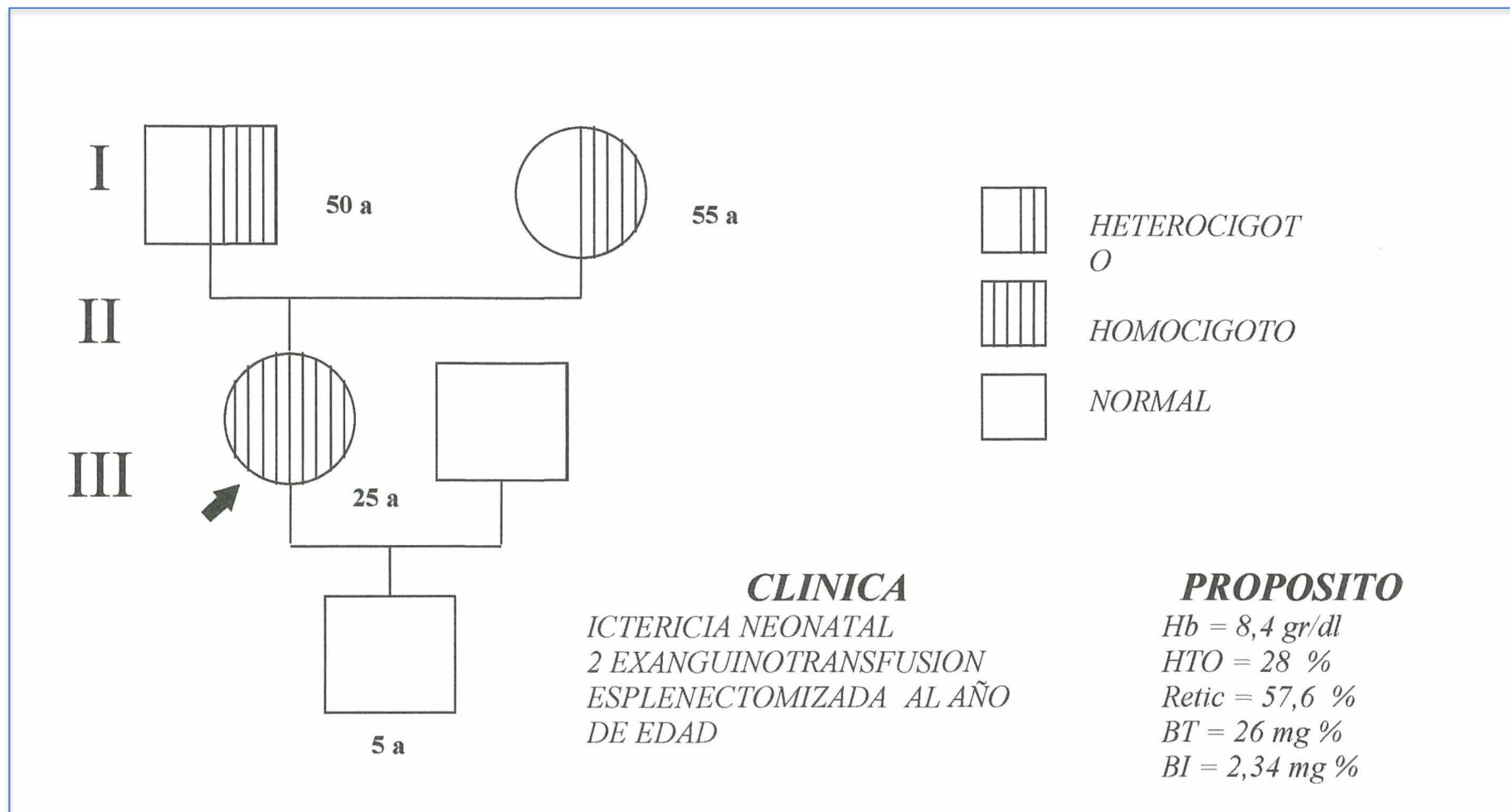


Fig. 14

Familia CHA. (Maracaibo, Edo. Zulia)

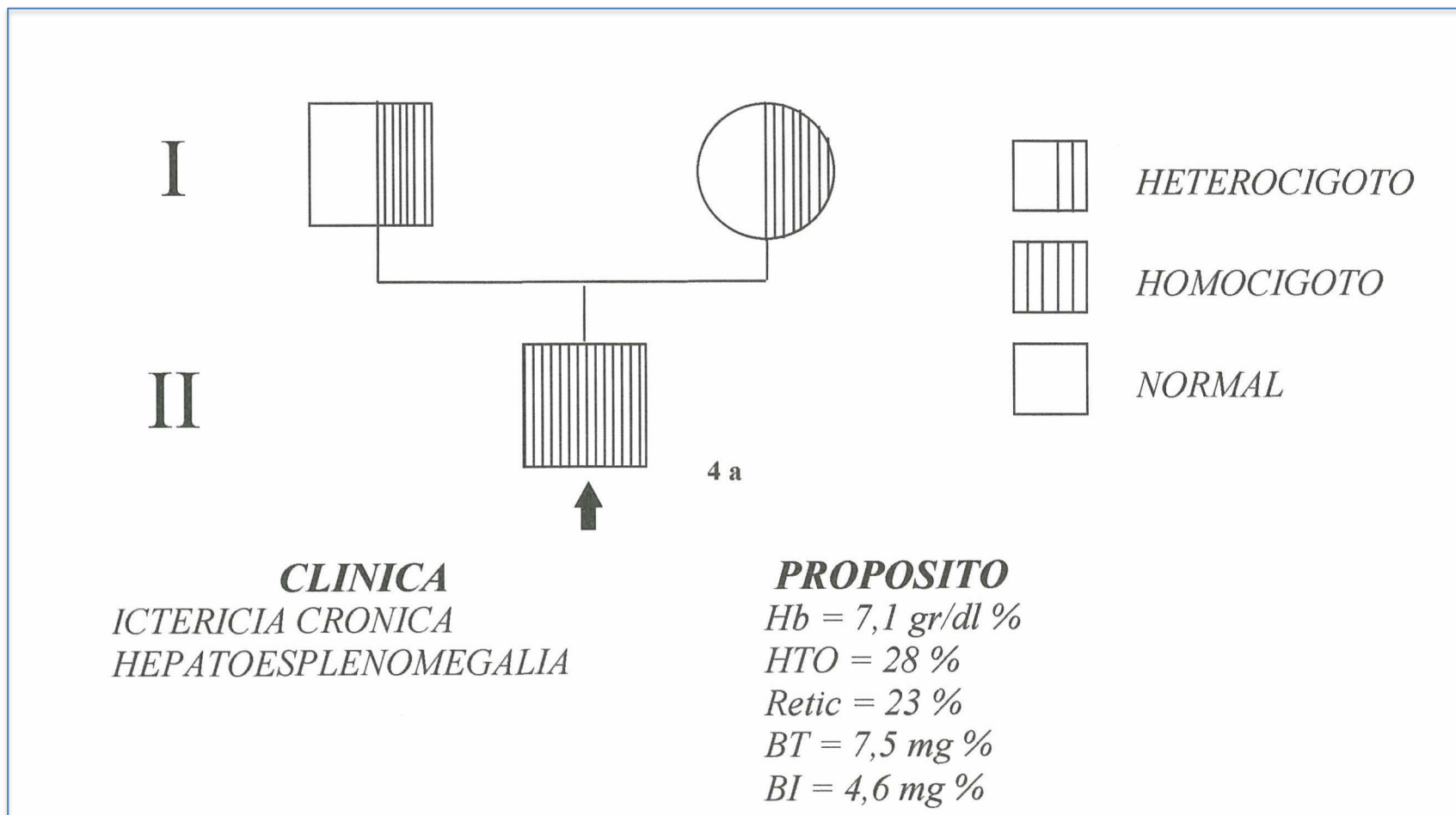


Fig. 15

Deficiencia de PK
Familia SEMP. (Maracaibo) Edo. Zulia)

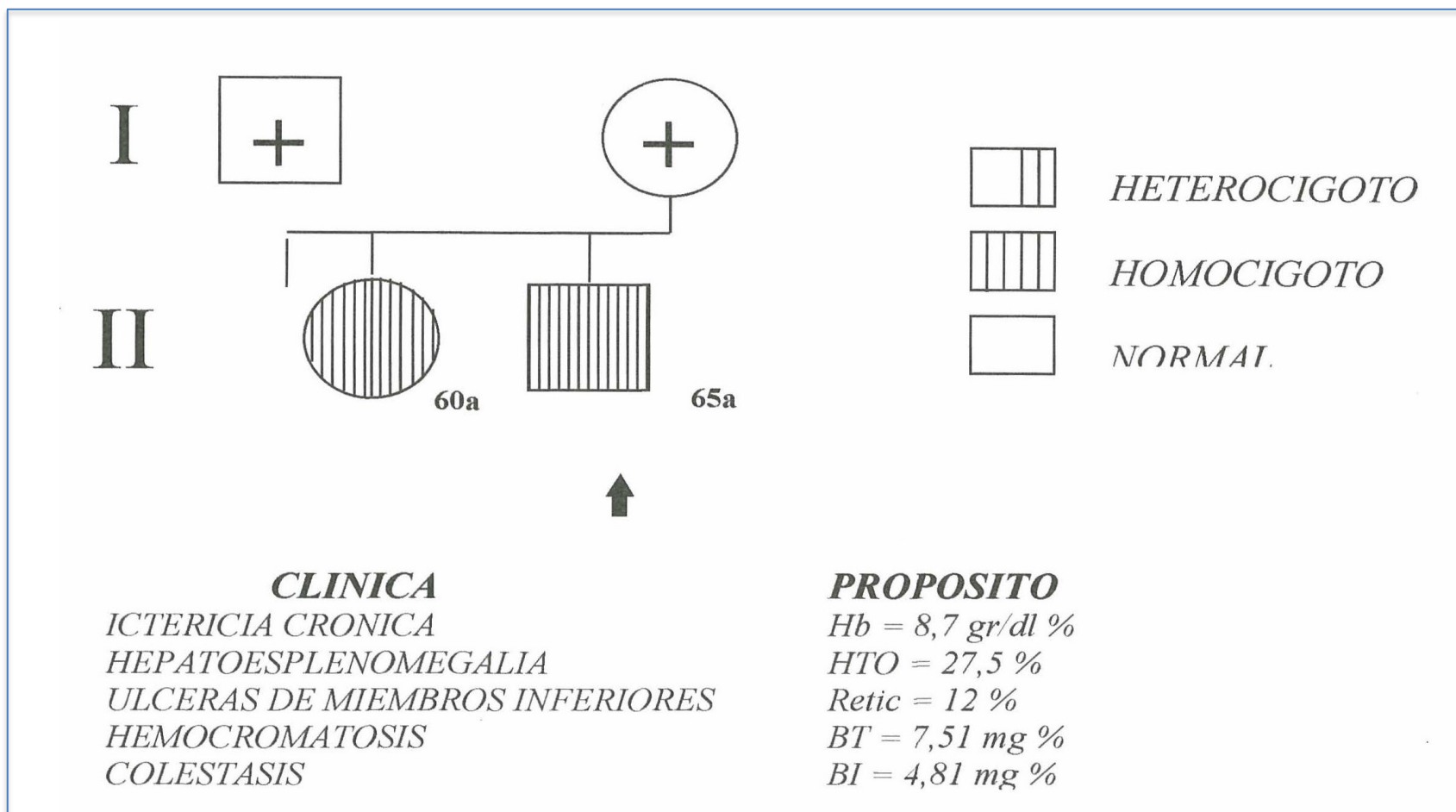


Fig. 16

**CARACTERIZACION BIOQUÍMICA DE LA
PIRUVATO QUINASA DE PACIENTES CON ANEMIA HEMOLÍTICA
CONGÉNITA POR DEFICIENCIA DE PK.**

La enzima piruvato quinasa intraeritrocítica de 18 pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa y sin úlceras en miembros inferiores fué purificada y caracterizada cinéticamente. El efecto del sustrato fosfoenolpiruvico, y de su activador alostérico, fructosa difosfato (FDP) a una concentración de 500J1M, fueron investigados en el hemolizado parcialmente purificado y que había sido dializado toda la noche contra 7mM beta mercaptoetanol- 2,7 mM EDTA (pH:7,0). El Km de la piruvato quinasa para su sustrato fosfoenol pirúvico (Km [PEP]) fué de $1,15 \pm 0,10$ mM (VN: $1,1 \pm 0,10$ mM), siendo la curva para el PEP de aspecto sigmoidal, muy parecida a la curva para el PEP de la enzima PK de los eritrocitos de los donantes de sangre, que sirvieron de controles (Tabla VI, Fig. 17). El Km de la PK para su sustrato PEP pero con el activador alostérico fructosa difosfato [FDP] fué de $0,120 \pm 0,030$ mM.(VN: $0,119 \pm 0,028$ mM).(Tabla VI), (Fig.17).

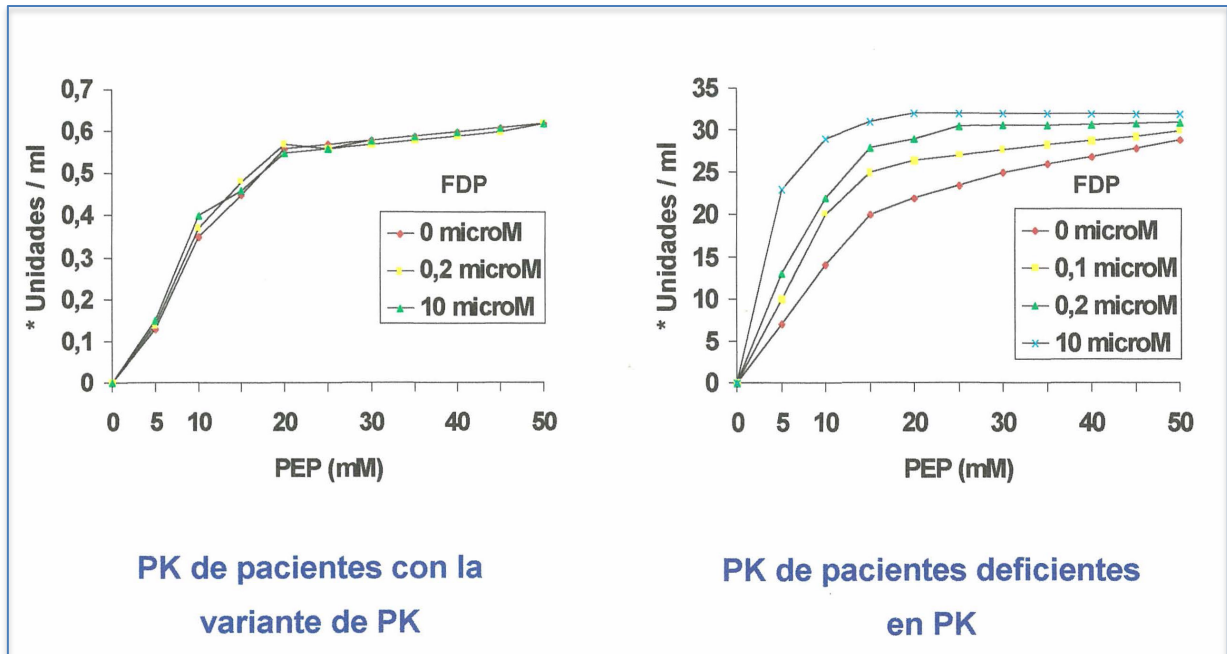
El Km de la piruvato quinasa para su sustrato ADP de los pacientes en estudio fué medido y encontrado en $0,26 \pm 0,01$ mM (VN: $0,26 \pm 0,01$ mM) (Tabla VI)

**Parámetros Cinéticos de la PK
Intraeritrocítica Humana**

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

Tabla VI

Respuesta de la PK a su sustrato PEP + Activador FDP



*Unidades de PK por ml de hemolizado parcialmente purificada y dializado

Fig. 17

La curva de termoestabilidad de la enzima PK de los eritrocitos de los pacientes deficientes en PK mostró una enzima estable al calor, permaneciendo el $94\% \pm 2$ de actividad de piruvato quinasa a la hora de incubación a 53°C , similar a la curva de termoestabilidad de la enzima PK de eritrocitos de donantes del Banco de Sangre que sirvieron de controles (Fig. 18)

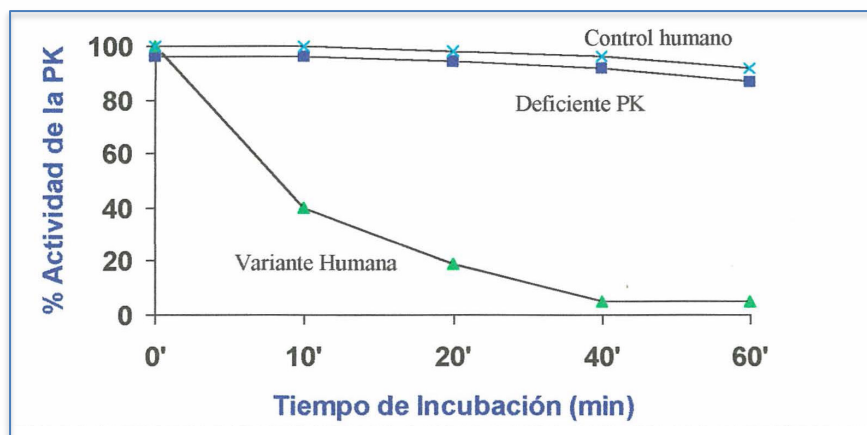


Figura 18

Curva de Termoestabilidad de la Piruvato Quinasa Humana

El pH óptimo de la enzima PK de eritrocitos de pacientes deficientes en PK y de eritrocitos controles varió entre 6,5-7,0.

La enzima PK de los eritrocitos deficientes en piruvato quinasa provenientes de pacientes con anemia hemolítica y sin úlceras en miembros inferiores presentan una cinética, pH óptimo y termoestabilidad igual a la enzima PK de eritrocitos controles provenientes de donantes de sangre.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA VARIANTE DE PIRUVATO QUINASA

La enzima piruvato quinasa de 5 pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa y con úlceras en miembros inferiores fué purificada y caracterizada cinéticamente.

El efecto del sustrato fosfoenolpirúvico, y de su activador alostérico fructosa difosfato (FDP), fue investigado en la misma forma que con los pacientes deficientes en Piruvato Quinasa con hemólisis pero sin úlceras en las piernas.

La PK de los eritrocitos de pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK y úlceras en piernas para su sustrato fosfoenol pirúvico K_m [PEP] fué de $0,75 \pm 0,05$ mM (VN: $1,1 \pm 0,10$ mM), siendo la curva para el PEP de aspecto sigmoidal. El K_m para su sustrato PEP pero con el activador alostérico FDP fué de $0,75 \pm 0,050$ mM. Como se ve la enzima PK intraeritrocítica de estos pacientes no respondió a su activador alostérico, aún usando concentraciones de FDP altas como $500 \mu\text{M}$. (Tabla VI, Fig.17).

El K_m [PEP] de la PK de los eritrocitos controles bajo de $0,75$ mM a $0,66 \text{ mM} \pm 0,01$ mM con $0,2 \pm 0,01$ microM ADP y a $0,12 \text{ mM} \pm 0,01$ mM en la presencia de 10 microM FDP.

La PK de los eritrocitos de los pacientes con deficiencia de PK y úlceras en piernas presentaron un K_m [ADP] de $0,55 \pm 0,05$ mM mientras que el K_m (ADP) de los eritrocitos humanos controles fué de $0,26 \pm 0,01$ mM (Tabla VI).

La curva de termoestabilidad para la PK practicada a los eritrocitos de los pacientes con hemólisis por deficiencia de PK y úlceras en piernas mostró una enzima inestable al calor, permaneciendo solo el $58 \pm 3\%$ de la actividad de piruvato quinasa a

la hora de incubación a la temperatura de 53°C (Fig. 18).

El pH óptimo de la PK intraeritrocítica fue similar a los pacientes con anemia y sin úlceras, variando entre 6,5-7,0.

Al comparar los valores de Km de la PK intraeritrocítica de los pacientes con anemia hemolítica congénita con úlceras en miembros inferiores con los valores de Km de la PK intraeritrocítica de los pacientes con anemia hemolítica, pero sin úlceras en piernas, se encuentra que, la PK de los eritrocitos de los pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK y úlceras en piernas tienen un Km [PEP] disminuido 0,75 vs 1,15 mM y un Km [ADP] aumentado 0,55 vs 0,26 mM. Así mismo la PK intraeritrocítica de éstos pacientes con úlceras es no alostérica y es termolábil, mientras que la PK intraeritrocítica de los otros pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK pero sin úlceras en piernas es alostérica y es termoestable (Tabla VI, Fig. 17, Fig. 18)

Esta enzima PK encontrada en eritrocitos de pacientes venezolanos con anemia hemolítica congénita por deficiencia de piruvato quinasa y úlceras en piernas puede ser clasificada como una variante de PK.

ESTUDIO DE CATIONES INTRAERITROCÍTICOS DE PACIENTES DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA

Se estudiaron 6 pacientes con anemia hemolítica severa por deficiencia de piruvato quinasa obteniéndose valores de Na intraeritrocítico de $15 \pm 1,9$ meq./Lt/glóbulos rojos mientras que los de los eritrocitos controles procedentes de donantes de sangre sanos fueron de $9 \pm 2,5$ meq./Lt/glóbulos rojos y los valores Na intraeritrocíticos de pacientes con drepanocitosis homocigótica, que nos sirvieron de comparación fueron de $22,9 \pm 4,5$ meq./Lt/glóbulos rojos (Tabla VII).

Los valores de K intraeritrocíticos de los 6 pacientes con deficiencia de piruvato quinasa fueron de $119 \pm 4,9$ meq./Lt/ glóbulos rojos, mientras que los valores de K intraeritrocítico de glóbulos rojos de donantes, que sirvieron de controles fueron de: $97,2 \pm 7,7$ meq./Lt/ glóbulos rojos y en eritrocitos de pacientes drepanocíticos, que también sirvieron de comparación fueron de $81,8 \pm 6$ meq./L t/ glóbulos rojos (Tabla VII).

El contenido total de cationes para los eritrocitos de los pacientes deficientes en PK fueron de $134 \pm 4,9$ meq/ Lt/ glóbulos rojos, mientras que los de los eritrocitos controles de donantes fueron de: $106 \pm 7,7$ meq/L/ glóbulos rojos y la de los eritrocitos de pacientes drepanocíticos homocigóticos, que como ya dijimos sirvieron de comparación fueron de $104 \pm 5,6$ meq. / L / glóbulos rojos. (Tabla VII).

**Contenido Intraeritrocítico de Na y K de Pacientes deficientes
en Piruvato Quinasa**

INDIVIDUOS	Na meq/lt/gl rojos	K meq/lt/gl. rojos	Na+K meq/lt/gl. rojos
50 donantes	$9 \pm 2,5$	$97,2 \pm 7,7$	$106,2 \pm 7,7$
10 Drepanocíticos	$22,9 \pm 4,5$	$81,8 \pm 6$	$104 \pm 5,6$
6 Deficientes en PK	$15 \pm 1,9$	$119 \pm 4,9$	$134 \pm 4,9$

TABLA VII

El contenido de ATP de los eritrocitos provenientes de 6 pacientes deficientes en piruvato quinasa sin úlceras en piernas y de 3 pacientes con la variante de piruvato quinasa fue encontrado en $1,5 \pm 0,2$ mM- 10^{13} glóbulos rojos mientras que el de los eritrocitos controles, provenientes de donantes del Banco de Sangre fue de $2 \pm 0,12$ mM / 10^{13} glóbulos rojos (Tabla VIII).

**Contenido de ATP y Cationes de los Eritrocitos Deficientes
en Piruvato Quinasa de Humanos**

	RETIC %	ATP mM/10 ¹³ gl.r	Na	K meq/lt/gl.r	NA + K	VCM micras ³
50 Controles Humanos	1 ± 0,2	2,0	9,0 ± 2,5	97 ± 7,7	106,2 ± 62,4	115
6 Pts Deficientes en PK	34 ± 5	1,5	15 ± 1,9	119 ± 4,9	134 ± 4,9	124
3 Pts con la Variante de PK	25,0	1,5	22,0±1,0	118 ± 2,5	140 ± 2,0	120

TABLA VIII

**CONTENIDO DE CALCIO DE LOS ERITROCITOS DE LOS
PACIENTES CON DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA**

A los eritrocitos de 6 pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa se le determinó el contenido de calcio y se encontró en $138 \pm 12,1$ mM/ ml, mientras que el contenido de calcio de los eritrocitos provenientes de donantes, que sirvieron de controles estuvo en 91 ± 27 mM/ml cel. El contenido de calcio de los eritrocitos de pacientes drepanocíticos homocigotos, que sirvieron de comparación estuvo en $223,7 \pm 23,8$ mM/ml cel (Tabla IX).

Se puede observar que el contenido de calcio de los eritrocitos de los pacientes deficientes en piruvato quinasa es mayor que el de los controles, pero los eritrocitos de los pacientes con drepanocitosis lo tienen aún más elevado que los eritrocitos de los pacientes deficientes en PK (Tabla IX).

Contenido de Calcio de los Eritrocitos Humanos

Número	Patologías	Ca mM/ml cel
10	Drepanocíticos SS	223,7 ± 23,8
6	Deficientes PK	138 ± 12,1
10	Controles	91,4 ± 27

Tabla IX

CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE CATIONES, ÍNDICES GLOBULARES Y ATP DE ERITROCITOS DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA.

Los reticulocitos de los pacientes deficientes en piruvato quinasa incubados en la presencia de un bloqueador de la fosforilización oxidativa mitocondrial como el KCN (2mM) presentaron una caída del contenido de ATP intraeritrocítico desde 1,5 a 0,2 mM/10¹³ glóbulos rojos, simultáneamente con la depleción de las reservas de energía hubo una disminución marcada del contenido de K desde 136,5 a 52 meq/10¹³ glóbulos rojos. Como consecuencia de esta depleción de ATP el eritrocito deficiente en piruvato quinasa se deshidrató. Esto se evidenció por una disminución del volumen corpuscular medio (VCM) de 124 a 96 μ^3 y un aumento de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) desde 30 a 40 g/dl de glóbulos rojos (Tabla X).

Los reticulocitos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune que sirvieron de controles, fueron incubados bajo las mismas condiciones con KCN y no se evidenció cambios en su contenido de ATP, contenido de cationes intraeritrocíticos, VCM o CHCM (Tabla X).

**Cambios en el contenido de Cationes y ATP
de Eritrocitos Humanos Deficientes
en Piruvato Quinasa**

ERITROCITOS	RETIC %	ATP mM/10¹³gl.r	Na	K meq/lt/gl.r	NA + K	VCM micras³
CONTROLES						
T-0	40	2	14	124	138	115
T-4		2	13	122	135	113
T-4+CN		1,8	14	118	132	112
DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA						
T-0	60	1,5	13,6	136,5	150,1	124
T-4		1,7	13,6	136	169	124
T-4+CN		0,2	24	52	76	93
AHA: Anemia Hemolítica T-0: Tiempo 0 T-4: 4 Horas de Incubación T-4+CN: 4 Horas						
TABLA X						

**ORIGEN DE LAS FAMILIAS VENEZOLANAS DEFICIENTES
EN PIRUVATO QUINASA**

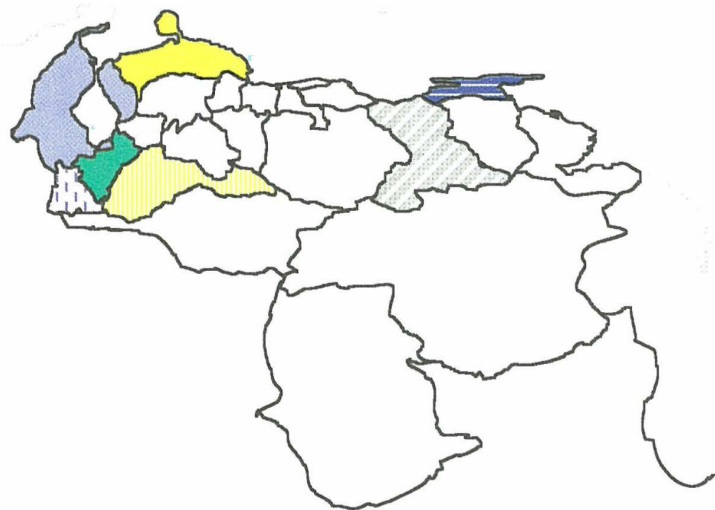
Aparecen indicados los estados venezolanos de donde provenían los pacientes en el mapa de Venezuela. Es de hacer resaltar que la mayoría de ellos provenían de la región occidental, principalmente de Los Andes venezolanos (Fig.19).

CONSANGUINIDAD AUMENTADA EN HABITANTES DEL PUEBLO DE PREGONERO, EDO. TÁCHIRA

Tomando en cuenta que varias familias con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa procedían del Estado Táchira y que los padres de dos de estas familias cuyos hijos padecían anemia hemolítica congénita por deficiencia de piruvato quinasa y úlceras en las piernas eran primos hermanos, se procedió a revisar las actas de matrimonio civiles y eclesiásticos del pueblo de Pregonero, durante los años 50-70. Se escogió el pueblo de Pregonero, porque para esa época el pueblo de Pregonero había permanecido sin carreteras hacia la Capital y los matrimonios entre familiares debían de ser más frecuentes y cualquier defecto genético debería transmitirse con alta frecuencia. Además, se habían recibido en el Hospital Central de San Cristóbal varios casos de la enfermedad de Chediak-Higashi, cuya incidencia estaba probablemente aumentada por la consanguinidad elevada de esta región.

Se encontró que los habitantes de Pregonero con mucha frecuencia contraían matrimonio entre primos hermanos y que muchos individuos presentaban el mismo apellido hasta por cuatro generaciones, lo cual nos indica un alto grado de consanguinidad y de ahí la presencia de hijos homocigotos o dobles heterocigotos con anemia hemolítica severa por deficiencia de PK.

Origen de las Familias Venezolanas deficientes en Piruvato Quinasa



Población Estudiada Ciudad (Estado)	Numero de Individuos	Deficiencia PK %
Caracas (Dto. Federal)	157	3
San Cristobal (Tachira)	20	0
Pregonero (Tachira)	32	0
Adicora (Falcon)	102	0
Tapipa (Miranda)	131	0
Yanomami	100	0
Waraos	100	0
TOTAL	642	

Familias

Nro.	Origen Ciudad (Estado)
1	La Grita (Tachira)
2	San Cristobal (Tachira)
1	Merida (Merida)
2	Maracaibo (Zulia)
1	Pregonero (Tachira)
1	Cumana (Sucre)
1	Barcelona (Anzoategui)

Fig. 19

DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA
ESTUDIOS EXPERIMENTALES
EN PERROS

ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN PERROS

ESTUDIO CLÍNICO DE LOS PERROS

El examen físico de uno de los perros Basenji se caracterizó por retardo de crecimiento, ictericia conjuntival, palidez de mucosas, esplenomegalia, por lo cual fue diagnosticado como un paciente canino con anemia hemolítica homocigótica para la deficiencia de piruvato quinasa.

El otro perro Basenji presentaba un examen físico normal excepto por discreta ictericia conjuntival y palidez de mucosas fue diagnosticado como un paciente canino heterocigoto para la deficiencia de piruvato quinasa.

Dos perros Golden Retriever, usados como control, presentaron un examen físico normal.

ESTUDIO HEMATOLÓGICO DE LOS PERROS

La hematología practicada mostró que el perro Basenji con clínica de anemia hemolítica presentó anemia severa: conteo de eritrocitos: $5,58 \text{ glóbulos rojos} \times 10^8/\text{dl}$; hemoglobina: 7,6 g/dl, hematocrito: 24,3%, reticulocitos de 25% y el otro perro Basenji clasificado como heterocigoto presentó valores de conteo de eritrocitos: $5,14 \text{ glóbulos rojos} \times 10^8/\text{dl}$; hemoglobina de 12g/dl; hematocrito: 35,3%, reticulocitos de 1% mientras que los valores del perro Golden Retriever, que sirvió de control eran normales. (Tabla: XI). El frotis de sangre periférica del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de PK mostró policromasia marcada, anisocitosis, poiquilocitosis, y eritrocitos fragmentados o esquistocitos.

**Estudio de Sangre Periférica de Perros
deficientes en Piruvato Quinasa**

	Control	Heterocigoto	Homocigoto
Gl. Rojos (10^8/dl)	5,58	5,14	2,98
Hemoglobina (%)	13,1	12	7,6
Hematocrito (%)	39,4	35,3	24,3
Reticulocitos (%)	0,1	1	25

TABLA XI

**NIVELES DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DEHIDROGENASA Y PIRUVATO
QUINASA EN ERITROCITOS JÓVENES Y MADUROS
DE PERROS BASENJI**

En la tabla XII puede apreciarse que los eritrocitos jóvenes contienen niveles de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mucho más elevados que los eritrocitos viejos o maduros. Los eritrocitos jóvenes del perro Basenji heterocigoto contenían valores de G-6-PD de 4,25 U.I /g .Hb mientras que los eritrocitos del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de PK con reticulocitosis del 45% contenían valores de G-6-PD 26,63 U.I /g.Hb. Puede apreciarse una gran diferencia en el contenido de G-6-PD de los eritrocitos jóvenes del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de PK y los eritrocitos jóvenes del perro Basenji heterocigoto para la deficiencia de PK (26,63 vs 4,25 U.I/g Hb)

Se observa que los niveles de PK de los eritrocitos jóvenes del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de PK con reticulocitosis del 45% estuvieron por arriba de los niveles de PK de eritrocitos caninos controles con 3% de reticulocitosis: 6,27 vs 3,73 U.I./g Hb.

Los niveles de piruvato quinasa estuvieron disminuidos en los eritrocitos viejos o maduros del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de PK: 1,46 U.I./g Hb (Control: 3,49 UI/gHb).

Piruvato Quinasa Intraeritrocítica de Perros

ERITROCITOS JOVENES			
Perros	G-6-PD (U.I./g Hb)	Piruvato Quinasa (U.I./g Hb)	Reticulocitos (%)
Perro Control	6,84	3,73	3 %
Perro Homocigoto	26,63	6,27	45%
Perro Heterocigoto	4,25	4,13	4%
ERITROCITOS MADUROS			
Perros	G-6-PD (U.I./g Hb)	Piruvato Quinasa (U.I./g Hb)	Reticulocitos (%)
Perro Control	4,78	3,49	0%
Perro Homocigoto	15,38	1,46	6%
Perro Heterocigoto	3,49	3,18	1%

TABLA XII

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA PIRUVATO QUINASA DE LOS PERROS BASENJI

La enzima piruvato quinasa de los eritrocitos de perros Basenji y perros controles fue purificada y caracterizada cinéticamente. El efecto del sustrato fosfoenolpiruvico, y de su activador alostérico, fructosa difosfato (FDP) a una concentración de $500\mu\text{M}$, fueron investigados en el hemolizado parcialmente purificado y que había sido dializado toda la noche contra 7mM beta mercaptoetanol- $2,7\text{ mM}$ EDTA (pH: 7,0).

El K_m de la piruvato quinasa intraeritrocítica para su sustrato fosfoenol pirúvico (K_m [PEP]) del perro homocigoto para la deficiencia de piruvato quinasa fue de $0,020\text{mM}$ y el K_m [PEP] de los eritrocitos del perro heterocigoto fué más elevado de $0,066\text{mM}$, siendo el K_m [PEP] de eritrocitos caninos controles de $1,0\text{ mM}$. Puede apreciarse que la enzima piruvato quinasa intraeritrocítica de los perros Basenji tiene un K_m bajo para el PEP (Tabla XIII).

La actividad de la curva de la piruvato quinasa intraeritrocítica a concentraciones de PEP menores de $1,0\text{ mM}$ del perro homocigo para la deficiencia de piruvato quinasa fué de aspecto hiperbólica. y la actividad de la curva de la piruvato quinasa intraeritrocítica del perro heterocigoto solo ligeramente hiperbólica (Fig. 20).

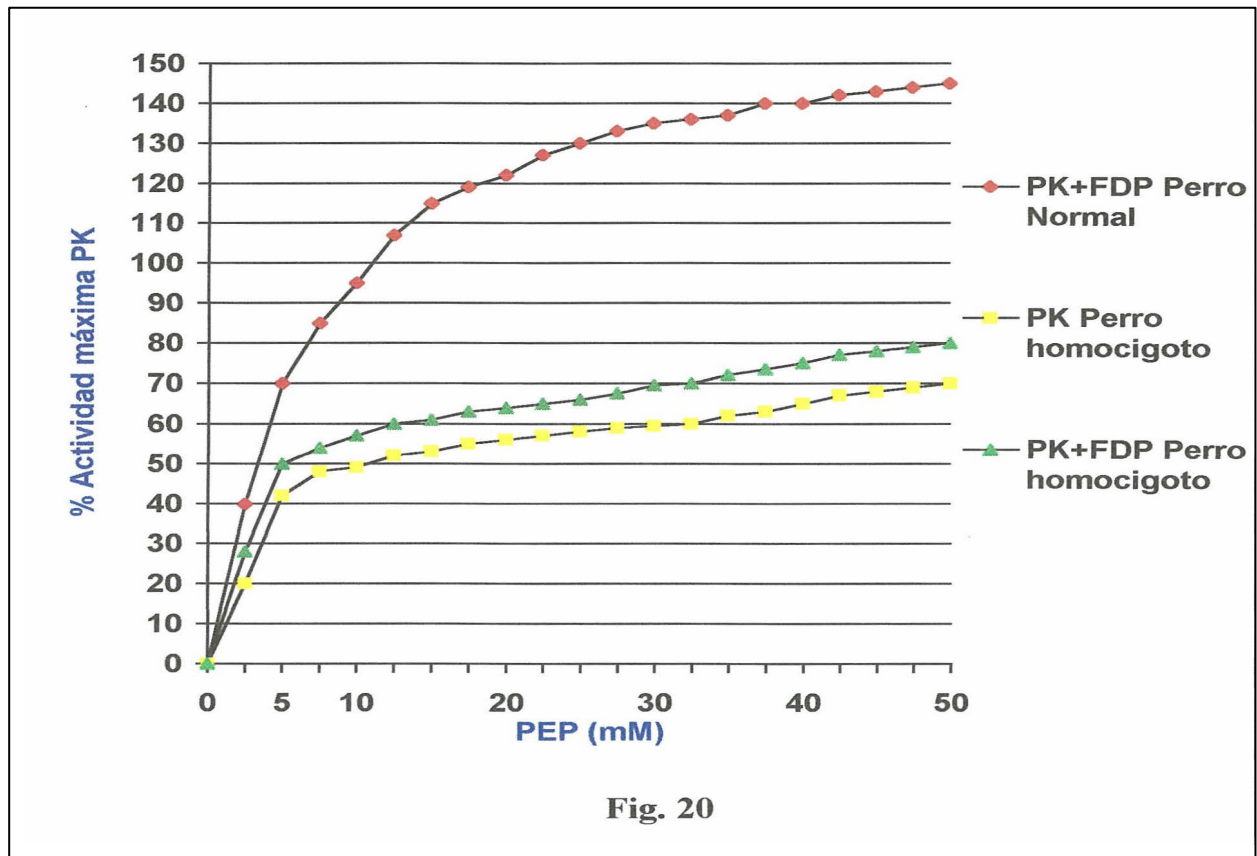
La enzima piruvato quinasa de los eritrocitos del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de piruvato quinasa, no respondió al FDP, mientras que este estimulador alostérico de la PK produjo conversión completa de la actividad de la enzima piruvato quinasa canina de los perros Golden Retriever (controles) de forma sigmoide a hiperbólica, aumentando ligeramente la velocidad máxima de la enzima (V_{max}) y disminuyendo el K_m [PEP] (Tabla XIII, Fig.20).

Parámetros Cinéticos de la Piruvato Quinasa Intraeritrocítica Canina

	Km [PEP] (mM PEP)	Km [ADP] (mM ADP)	Km [PEP]+FDP (mM PEP)	Curva PEP
Perros controles	1,0 ± 0,1	0,024 ± 0,02	0,120 ± 0,02	Sigmoidal
Perros heterocigotos PK	0,066 ± 0,0	0,100 ± 0,01	0,040 ± 0,01	Ligeramente hiperbólica
Perros homocigotos- PK	0,020 ± 0,01	0,200 ± 0,02	0,020 ± 0,01	Hyperbólica

TABLA XIII

Propiedades Cinéticas de la Piruvato Quinasa Intraeritrocítica de perros



El K_m [ADP] de la piruvato quinasa intraeritrocítica de perros Basenji homocigotos para la deficiencia de piruvato quinasa fué medido y encontrado en $0,200 \pm 0,01$ mM, el K_m [ADP] de la piruvato quinasa de los eritrocitos de los perros heterocigotos fué de 0,100 mM, mientras que el K_m [ADP] de la PK intraeritrocítica de perros controles fué de 0,024 mM (Tabla XIII). Es de hacer notar que la piruvato quinasa de perros Basenji deficientes en piruvato quinasa presentaron un K_m [ADP] elevado si se comparan con el K_m [ADP] de eritrocitos caminos controles. Los eritrocitos de los perros Basenji heterocigotos para la deficiencia presentaron también dicho K_m [ADP] elevado pero en menor proporción que el de los perros homocigotos.

La curva de termoestabilidad de la PK de los eritrocitos de los perros Basenji deficientes en PK perdió el 50% de su actividad en 10 min. 72% en 20 min. y el 90% de su actividad en 40 min. Bajo las mismas condiciones la enzima PK de los eritrocitos del perro Basenji heterocigoto para la deficiencia de PK perdió 42%, 50%, y 70% de su actividad enzimática, mientras que la PK de los eritrocitos de los perros que sirvieron de controles, perdió 0% a los 10 min., 30% a los 20 min. y 50% a los 40 min. Es decir la enzima PK de los perros Basenji deficientes en PK es más inestable al calor que la enzima PK de perros controles a 53°C en buffer de trietanolamina a pH 7,5 (Fig. 21).

El pH óptimo varió de la enzima de los eritrocitos de perros Basenji homocigotos para la deficiencia de PK varió entre 6,5-7,0.

Curva de Termoestabilidad de la Piruvato Quinasa Canina

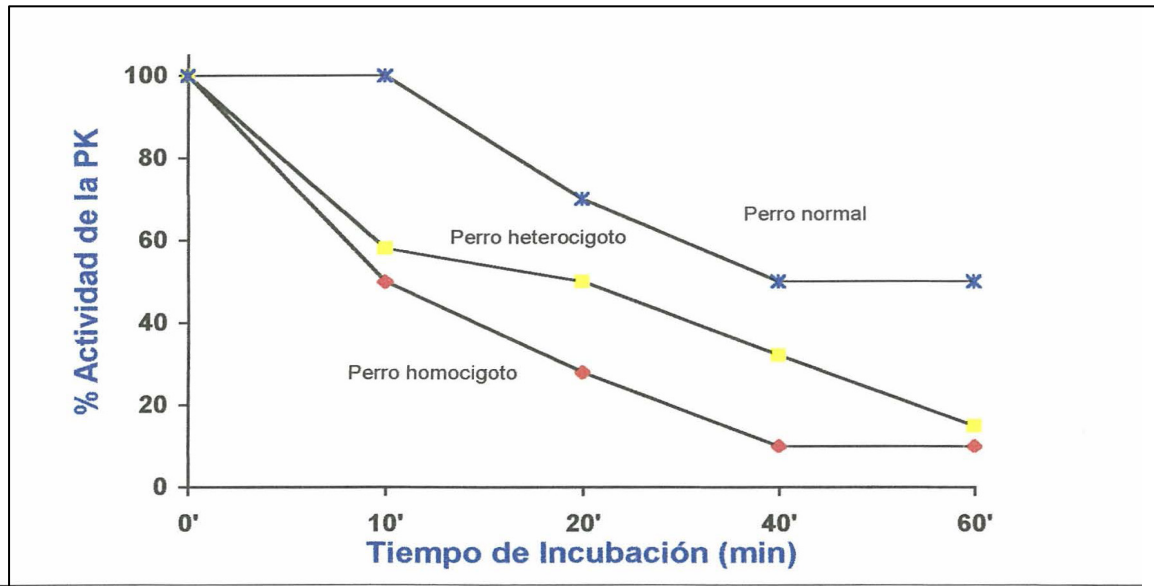


Fig. 21

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA PIRUVATO QUINASA DE ERITROCITOS DE PERROS BASENJI Y LA VARIANTE DE P.K. HUMANA

Como hemos visto los perros Basenji deficientes en piruvato quinasa clínicamente sufren de anemia hemolítica severa caracterizada como en el humano fundamentalmente por ictericia y esplenomegalia. Al igual que los pacientes humanos que sufren la deficiencia de PK, los eritrocitos caninos deficientes en la enzima contienen menor cantidad de piruvato quinasa.

Si comparamos las propiedades cinéticas de la enzima PK de los eritrocitos de perros que sufren la deficiencia homocigótica para la PK intraeritrocítica, con la enzima PK de los eritrocitos de los pacientes humanos con anemia hemolítica congénita con la variante de PK, tendremos que:

El K_m [PEP] para la PK intraeritrocítica de perros Basenji con la deficiencia fué de 0,020 mM, mientras que el K_m [PEP] de los eritrocitos caninos controles fué de 1mM. Es

decir, la enzima PK de los perros Basenji tiene un Km bajo para su sustrato PEP (Tabla XIV).

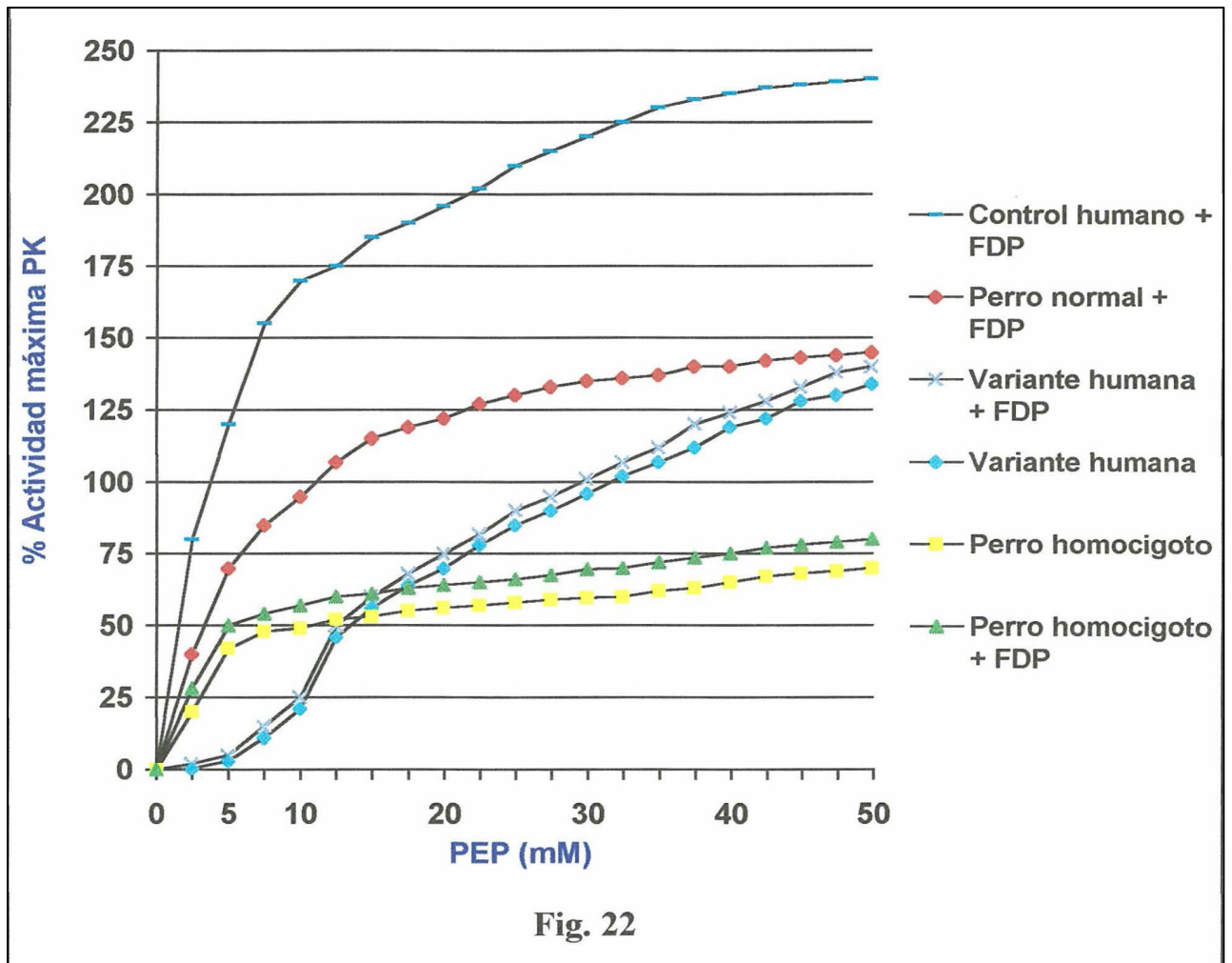
**Parámetros Cinéticos de la Piruvato Quinasa
Intraeritrocítica Humana y Canina**

	Km [PEP] (mM PEP)	Km [ADP] (mM ADP)	Km [PEP]+FDP (mM PEP)	Curva PEP
Control Humano	1,15 ± 0,1	0,26 ± 0,01	0,120 ± 0,030	Sigmoidal
* Variante Humana	0,75 ± 0,05	0,55 ± 0,05	0,74 ± 0,05	Sigmoidal
Control Canino	1,0 ± 0,1	0,024 ± 0,02	0,120 ± 0,02	Sigmoidal
Canino Heterocigoto	0,066 ± 0,0	0,100 ± 0,01	0,040 ± 0,01	Ligeramente hiperbólica
Canino Homocigoto	0,020 ± 0,01	0,200 ± 0,02	0,020 ± 0,01	Hiperbólica
<i>* Variante Humana: La enzima es encontrada en pacientes venezolanos con deficiencia de PK y úlceras en las piernas</i>				
TABLA XIV				

La PK de los eritrocitos de pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de PK y úlceras en piernas para su sustrato fosfoenol pirúvico Km [PEP] fue de 0,75 ± 0,05 mM, mientras que el Km [PEP] de eritrocitos humanos controles fue de 1,1 ± 0,10 mM. Es decir, la enzima PK de los eritrocitos de pacientes con deficiencia de PK y úlceras en piernas tiene también un Km bajo para su sustrato PEP (Tabla VI).

La enzima PK de los eritrocitos del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de PK, no respondió al activador alostérico FDP, mientras que este estimulador alostérico produjo conversión completa de la actividad de la enzima PK canina de los perros controles de forma sigmoide a hiperbólica, aumentando ligeramente la velocidad máxima de la enzima (V_{max}) y disminuyendo el K_m [PEP]. La enzima PK de los eritrocitos con la variante de PK humana tampoco respondió a su activador alostérico FDP (Tabla XIV, Fig. 22).

Propiedades Cinéticas de la Piruvato Quinasa Intraeritrocítica de humanos y perros



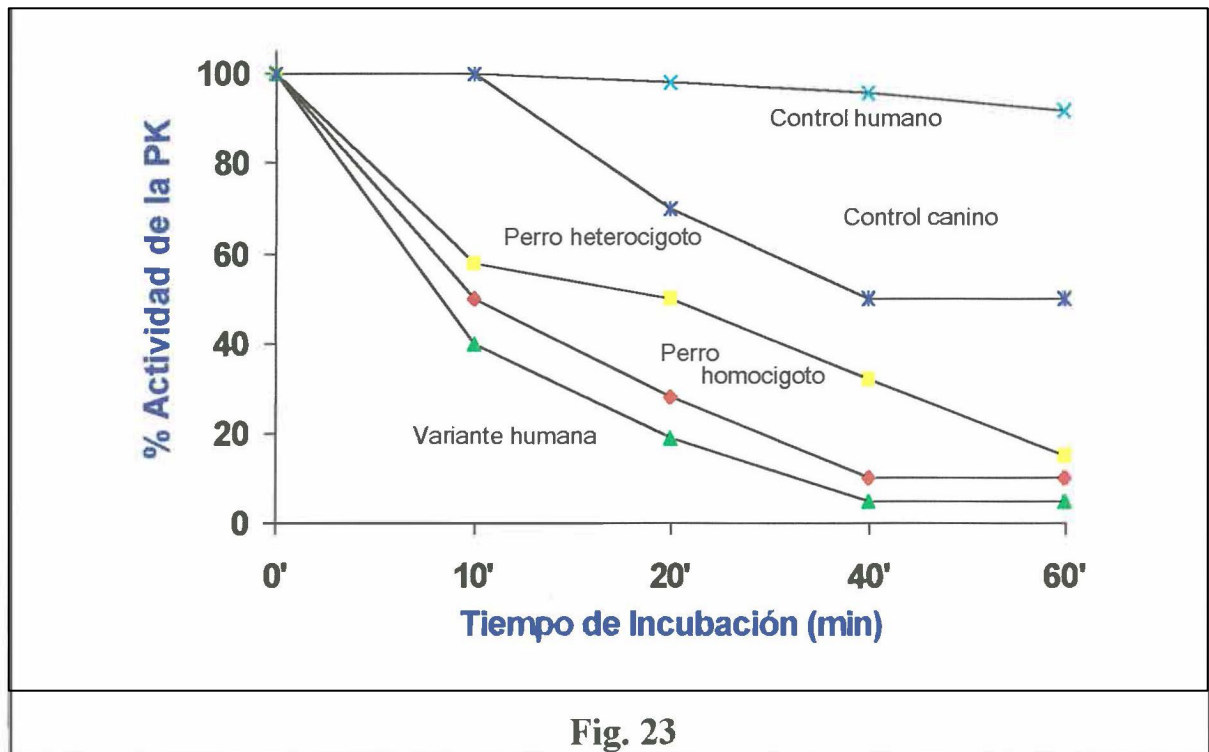
El K_m para su sustrato PEP pero con el activador alostérico FDP fué de $0,74 \pm 0,050$ mM. Como se ve la enzima PK intraeritrocítica de estos pacientes no respondió a su activador alostérico, aún usando concentraciones de FDP altas como 500 μ M. (Tabla VI, Fig.17, Fig. 18).

La actividad de la curva de la PK intraeritrocítica a concentraciones de PEP menores de 1mM del perro homocigoto para la deficiencia de PK fue de aspecto hiperbólica. Así mismo la de PK intraeritrocítica de pacientes con la variante de PK humana (Fig.22).

El K_m [ADP] de la piruvato quinasa intraeritrocítica de perros Basenji homocigotos para la deficiencia de PK fue medido y encontrado en $0,200 \pm 0,01$ mM, y el K_m [ADP] de la PK intraeritrocítica de perros controles fue de 0,024mM. El K_m de la piruvato quinasa intraeritrocítica de los pacientes con la variante de PK para su sustrato ADP fué de $0,55 \pm 0,05$ mM mientras que el K_m [ADP] para la PK de eritrocitos humanos controles fue de 0,26 mM (Tabla XIV).

La curva de termoestabilidad de la PK de los eritrocitos de los perros Basenji deficientes en PK perdió el 50% de su actividad en 10 min., 72% en 20 min., 90% de su actividad en 40 min. a 53°C en buffer de trietanolamina a pH 7,5. La PK de eritrocitos de los perros controles, bajo las mismas condiciones perdió 0% a los 10 min., 30% a los 20 min. y 50% a los 40 min. Es decir, la enzima PK de los eritrocitos de perros Basenji deficientes en PK es más inestable al calor que la enzima PK de perros controles (Fig.21, Fig. 23).

Curva de Termoestabilidad de la Piruvato Quinasa de Humanos y Perros



La curva de termoestabilidad de la enzima PK de los eritrocitos de los pacientes con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa y úlceras en piernas mostró una enzima PK inestable al calor, permaneciendo solo el $58 \pm 3\%$ de la actividad de piruvato quinasa a la hora de incubación a 53°C (Fig.19).

Al comparar las enzimas PK de los eritrocitos de los pacientes con la variante de PK y la PK de los eritrocitos de perros Basenji deficientes en PK tenemos que ambas enzimas tienen el K_m [PEP] disminuido y el K_m [ADP] aumentado, las curvas para el PEP son hiperbólicas y son inestables al calor (Tabla XIV y Fig.22).

ESTUDIO DE CATIONES INTRAERITROCÍTICOS DE PERROS BASENJI

Se estudiaron los cationes intraeritrocíticos de 4 perros: un perro Basenji deficiente homocigoto para la PK y otro perro Basenji deficiente heterocigoto para la PK y dos perros Golden Retriever que sirvieron de controles.

Se obtuvieron en el perro Basenji homocigoto los siguientes valores: Na intraeritrocíticos 66,6 meq/Lt./glóbulos rojos, K intraeritrocítico de 19,9 meq/Lt./glóbulos rojos, respectivamente (control canino: Na: 61,1 y K: 3,7 meq/Lt./glóbulos rojos). El contenido total de cationes fue de 86,5 meq/Lt./glóbulos rojos (control canino: 64,8 meq/Lt./glóbulos rojos).

Se obtuvieron en el perro heterocigoto los siguientes valores: Na intraeritrocíticos: 61,9 meq/Lt./glóbulos rojos; K: 5 meq/Lt./glóbulos rojos (control canino: Na: 61,1 y K: 3,7 meq/Lt 1 glóbulos rojos). El contenido total de cationes intraeritrocíticos fue de 66,9 meq/Lt/ glóbulos rojos (control canino: 64,8 meq/Lt /glóbulos rojos) (Tabla XV).

**Contenido de Cationes de los Eritrocitos
de los perros Basenji**

	RETIC %	Na	K meq/lt/gl.r	NA + K	VCM micras ³
Control Canino	1,0	61,1 ± 2	3,7 ± 0,5	64,8 ± 2,3	80
Perro homocigoto deficiente en Pk	25,0	66,6 ± 4	19,9 ± 2,2	86,5 ± 3,3	85
Perro heterocigoto deficiente en Pk	1,5	61,9 ± 1,5	5,0 ± 0,5	66,9 ± 4,1	78

TABLA XV

En la tabla XVI observamos que cuando separamos los eritrocitos jóvenes de los maduros o viejos por centrifugación los eritrocitos jóvenes del perro homocigoto para la deficiencia de piruvato quinasa presenta valores de Na intraeritrocítico de 68,8 meq./Lt/glóbulos rojos y de K de 32,8 meq./Lt/glóbulos rojos mientras que los eritrocitos viejos presentan valores de Na de 85,5 meq./Lt/glóbulos rojos y de K de 9,2 meq./Lt/glóbulos rojos. El contenido total de cationes de los eritrocitos jóvenes del perro homocigoto fue de 101,6 meq./Lt/glóbulos rojos y el de sus eritrocitos viejos fue de 94,7 meq./Lt/ glóbulos rojos. Se aprecia que el contenido de Na está disminuido en los eritrocitos jóvenes con un aumento compensatorio del K intraeritrocítico. No hubo diferencias en el contenido de cationes entre los eritrocitos caninos controles jóvenes y maduros. Tampoco hubo diferencias entre el contenido de cationes de los eritrocitos jóvenes y viejos del perro heterocigoto para la deficiencia de piruvato quinasa.

En la tabla XVI también se aprecia que los eritrocitos jóvenes del perro homocigoto para la deficiencia de piruvato quinasa contienen el doble de la cantidad de ATP intraeritrocítico que los eritrocitos viejos 0,80 vs 0,43 meq./10¹⁰ glóbulos rojos.

Sodio (Na) y Potasio (K) de Eritrocitos Caninos Jóvenes y Maduros

Eritrocitos de Perros	G-6-PD (U/g Hb)	Reticulocitos (%)	CHCM	ATP meq/10 ¹⁰ /gl.r	Na	K meq/10 ¹⁰ /gl.r	NA+K
Control							
JOVENES	6,84	3	76	0,66	61,2	6,1	67,3
MADUROS	4,78	0	74	0,60	62,4	4,2	66,7
Homocigoto							
JOVENES	26,63	45	107	0,80	68,8	32,8	101,6
MADUROS	15,38	10	93	0,43	85,5	9,2	94,7
Heterocigoto							
JOVENES	4,25	4	75	0,68	64,3	5,6	69,9
MADUROS	3,49	1	74	0,60	63,6	4,0	67,6

TABLA XVI

CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE CATIONES, INDICES GLOBULARES Y ATP DE ERITROCITOS DE PERROS BASENJI

Los reticulocitos de los perros Basenji homocigotos para la deficiencia de piruvato quinasa incubados en la presencia de un bloqueador de la fosforilización oxidativa mitocondrial como el KCN (2mM) presentaron una caída del contenido de ATP intraeritrocítico desde 0,6 a 0,1 mM/10¹³ glóbulos rojos. Simultáneamente con la depleción de las reservas de energía hubo una disminución marcada del contenido de K desde 32 a 9 meq/10¹³ glóbulos rojos y el contenido de Na aumentó de 65 a 87 meq/10¹³ glóbulos rojos (Tabla XVII).

El aumento de Na fué equivalente a la pérdida de K y eritrocito deficiente en piruvato quinasa no sufrió cambios en su volumen. Esto se evidenció en que el volumen corpuscular medio (VCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) permaneció constante.

Cambios en el contenido de Cationes, Indices y ATP de Eritrocitos de Perros Basenji

	RETIC %	ATP mM/10 ¹³ gl.r	Na	K meq/lt/gl.r	NA + K	VCM micras ³
BASENJI						
T-0	40	0,6	65	32	97	102
T-4		0,5	63,6	34,2	97,8	103
T-4+CN		0,1	87	9	96	102
AHA						
T-0	60	1,5	13,6	136,5	150,1	124
T-4		1,7	13,6	136	169	124
T-4+CN		0,2	24	52	76	93
* AHA: Anemia Hemolítica Autoinmune (Humanos controles)						
T0: Tiempo 0						
T4: 4 horas de incubación						
T4+CN: 4 horas de incubación de glóbulos rojos con cianuro de sodio						
TABLA XVII						

COMPARACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE CATIONES DE ERITROCITOS HUMANOS Y ERITROCITOS DE PERROS BASENJI.

Los eritrocitos de los pacientes con anemia hemolítica severa por deficiencia de piruvato quinasa presentaron valores de Na intraeritrocítico de $15 \pm 1,9$ meq/Lt/glóbulos rojos (V.N: $9 \pm 2,5$) y de K intraeritrocítico de $119 \pm 4,9$ meq/Lt/glóbulos rojos (V.N: $97,2 \pm 7,7$), siendo el contenido total de cationes de $134 \pm 4,9$ meq/Lt glóbulos rojos (V.N: $106 \pm 7,7$) (Tabla VII).

Se obtuvieron en el perro Basenji homocigoto los siguientes valores: Na intraeritrocíticos $66,6 \pm 4$ meq/Lt/glóbulos rojos, intraeritrocítico de $19,9 \pm 2,2$ meq/Lt/glóbulos rojos, respectivamente. (control canino: Na: $61,1 \pm 2$ y K: $3,7 \pm 0,5$ meq/Lt/glóbulos rojos). El contenido total de cationes fué de $86,5 \pm 3,3$ meq/Lt/glóbulos rojos (control canino: $64,8 \pm 2,3$ meq/Lt glóbulos rojos) (Tabla XV).

Puede observarse que existe una diferencia notable en los cationes intraeritrocíticos humanos y caninos, los humanos tienen un K intraeritrocítico elevado y Na bajo, mientras que los caninos poseen un contenido alto de Na y bajo de K.

COMPARACIÓN ENTRE LOS CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE CATIONES, INDICES GLOBULARES Y ATP DE ERITROCITOS HUMANOS Y CANINOS DEFICIENTES EN PIRUVATO QUINASA.

Los reticulocitos de los pacientes deficientes en piruvato quinasa incubados con KCN presentaron una caída del contenido de ATP intraeritrocítico desde $1,5$ a $0,2$ mM/ 10^{13} glóbulos rojos. Los reticulocitos de los perros Basenji homocigotos incubados con KCN presentaron también caída de los niveles de ATP.

En los eritrocitos de los pacientes deficientes en PK simultáneamente con la depleción de ATP hubo una disminución marcada del contenido de K desde $136,5$ a 52

meq/10¹³ glóbulos rojos, produciéndose una deshidratación del eritrocito que se evidenció por disminución del VCM y aumento de la CHCM (Tabla XVII).

En los eritrocitos caninos deficientes en PK, también se produjo simultáneamente con la depleción de ATP, una disminución del contenido intraeritrocítico de K desde 32 a 9 meq/10¹³ glóbulos rojos, pero con aumento del contenido de Na desde 65 a 87 meq/10¹³ glóbulos rojos. El aumento de Na fué equivalente a la pérdida de K y el eritrocito canino deficiente en piruvato quinasa no se deshidrato y el VCM y la CHCM permanecieron constante (Tabla XVII).

Los reticulocitos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune (AHA) que sirvieron de controles, incubados con KCN, no presentaron cambios en su contenido de ATP, contenido de cationes intraeritrocíticos, VCM, CHCM (Tabla XVII).

Podemos observar que al usar un bloqueador de la fosforilización oxidativa con los reticulocitos humanos y deficientes en PK se produce una caída de ATP y pérdida de K importante con deshidratación celular mientras que en los reticulocitos caninos caen los niveles de ATP y de K intracelular con una ganancia de Na compensadora y el eritrocito canino deficiente en PK no se deshidrata. Los reticulocitos controles de pacientes con anemia hemolítica autoinmune incubados con el KCN no presentan caída del ATP, cambio en cationes intraeritrocíticos ni cambios en VCM o CHCM.

DEFICIENCIA DE HEXOQUINASA

ANEMIA HEMOLITICA CRÓNICA ASOCIADA A UNA VARIANTE DE HEXOQUINASA

I. ANAMNESIS

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

II. EXÁMENES DE LABORATORIO

A. Hematología

Contaje rojo: $3,54 \times 10^6$ gl. Rojos/mm³

Hb: 11 gr%

Hto: 32,1%

VCM: 87 mu (VN: 80-94mu)

CHCM: 35,7% (VN: 32-36%)

Reticulocitos: 6,8% (VN: 0,1-0,5%)

Contaje blanco y plaquetario: normales

Frotis de sangre periférica mostró:

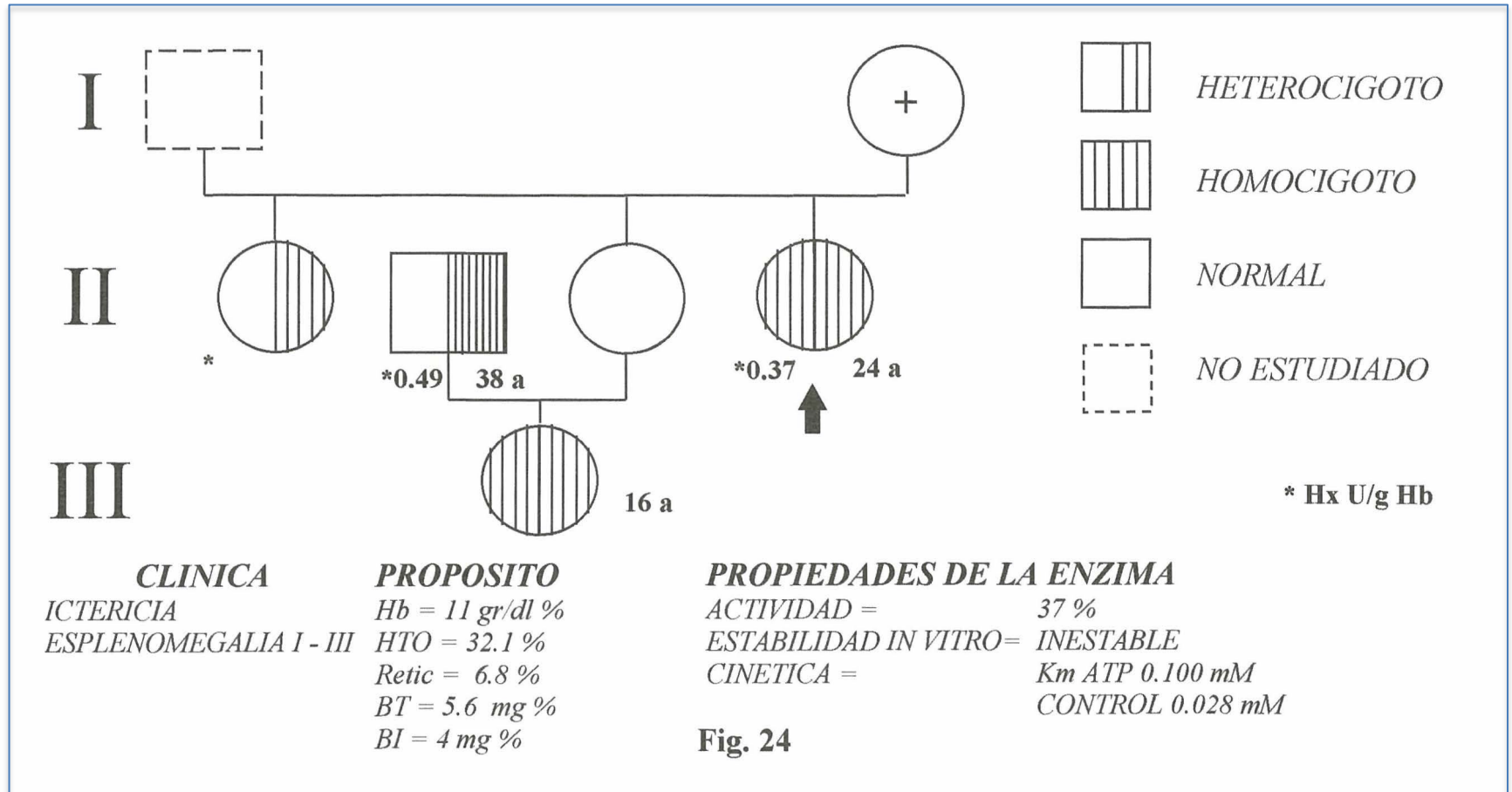
Policromasia ++

Poliquilocitosis ++

Esferocitosis ++

Esquistocitos ++

Deficiencia de Hexoquinasa
Familia LIN (San Casimiro, Edo. Aragua)



r
m *HETEROCIGOTO*

B. Química Sanguínea

Bilirrubina total:	5,6 mg/dl (VN:0,2-1,2)
Bilirrubina Directa:	1,6 mg/dl (VN: 0,2-1)
Bilirrubina Indirecta:	4,0 mg/dl (VN: 0,1-0,3)
Fosfatasas Alcalinas:	89 U/lit (VN: 30-115)
LDH:	432 U/15 (VN: 100-225)

C. Exámenes Especiales

Coombs directo e indirecto: *negativos*

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

Curva de Fragilidad Globular en fresco e incubada: *normal*

Prueba de Ham: *negativa*

Prueba de Inestabilidad al Calor: *negativa*

Electroforesis de Hemoglobina en Acetato de Celulosa, Buffer tris HCL 0,1 M pH 8,6: *hemoglobulina AA del adulto.*

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

Cuantificación de hemoglobina fetal: 0,6% (VN: 0,5-1,2%)

Curva de disociación de oxígeno practicada en el Hemoscan Aminco: *ligeramente desviada a la derecha con un p50: 33 mmHg (VN: 26-27 mmHg)*

D. Determinaciones Enzimáticas

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

Cuantificación de las enzimas de 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 Hb), es decir 41% de la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos normales (0,88 UI/g Hb) (Tabla XVIII). Cuando comparamos la actividad de hexoquinasa 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 hexoquinasa es de 2,24 UI/g Hb más alta que la de los eritrocitos controles ($0,870 \pm 0,027$) y aún más alta que la los eritrocitos del propósito. ($0,372$) (Tabla XIX).

Actividades Enzimáticas Intraeritrocíticas en Propósito LI Y Control

<i>Enzimas</i>	<i>Propósito Eritrocitos UI/g Hb</i>	<i>Control Eritrocitos UI/g Hb</i>
HX	0,350	$0,88 \pm 0,27$
GPI	30	$30,19 \pm 11,31$
PFK	9,27	$9,27 \pm 2,7$
ALD	1,65	$1,82 \pm 0,42$
GAPD	158,4	$124,5 \pm 40,2$
PGK	248,8	$219 \pm 21,2$
DPGM	4,94	$3,35 \pm 0,6$
MPGM	10	$11 \pm 1,42$
ENOLASA	1,9	$1,8 \pm 0,1$
PK	1,15	$1,09 \pm 0,1$
LDH	50,9	$25,2 \pm 15$
G6PD	11,7	$8,0 \pm 1,6$
GR+FAD	5	$4,4 \pm 1,42$
- FAD	4,6	$3,6 \pm 0,74$

TABLA XVIII

Los eritrocitos provenientes de los hermanos de la paciente presentaron niveles intraeritrocíticos de hexoquinasa disminuidos (0,487 y 0,454 UJg Hb) en relación al control ($0,870 \pm 0,27$), mientras que los eritrocitos de sus sobrinos presentaron valores normales de hexoquinasa (1 y 0,920 UJg Hb). (Tabla XX)

E. Actividad de la HX Intraeritrocítica en Glóbulos Rojos Jóvenes y Maduros

Cuando se comparó la actividad de los eritrocitos del propósito se encontró que la actividad de hexoquinasa estaba disminuida en ambas poblaciones celulares, siendo de 0,400 UJg Hb en los jóvenes y 0,200 UJg Hb en los maduros. En contraste sólo los eritrocitos maduros provenientes de los hermanos de la paciente mostraron la enzima disminuida (Tabla XIX)

F. Características de la Hexoquinasa Residual

pH OPTIMO: 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. (Fig.25)

TERMOESTABILIDAD: El estudio de la estabilidad de la enzima hexoquinasa del hemolizado de los eritrocitos del paciente y del control 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 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 (Fig.25)

Niveles de Hexoquinasa (UI/g Hb) Intraeritrocíticos

	<i>Eritrocitos Jóvenes</i>	<i>Eritrocitos Maduros</i>	<i>Eritrocitos Totales (Maduros + Jóvenes)</i>
PROPÓSITO (LL)	0,400	0,200	0,372
HERMANO (AL)	1260	0,334	0,487
HERMANA (ML)	0,817	0,310	0,454
CONTROL	1,500	0,900	0,870±0,27
ANEMIA HEMOLITICA (6,4% RETICULOCITOS)	-	-	2,24

TABLA XIX

Actividad De Hexoquinasa Eritrocítica Familia LI

<i>Actividad HX (UI/g Hb)</i>			
<i>Pacientes</i>	<i>Hemolizado Fresco</i>	<i>Hemolizado de 24h. (Sin glucosa)</i>	<i>Hemolizado Dializado 12 horas</i>
PROPÓSITO (LL)	0,372	0,232	0
HERMANO (AL)	0,487	0,241	-
HERMANA (ML)	0,454	0,276	-
SOBRINA (ML)	1,00	-	-
SOBRINA (ML)	0,920 (100%)	-	-
CONTROL	0,992 (100%)	0,908 (93%)	0,519 (59%)

TABLA XX

Fig. 25

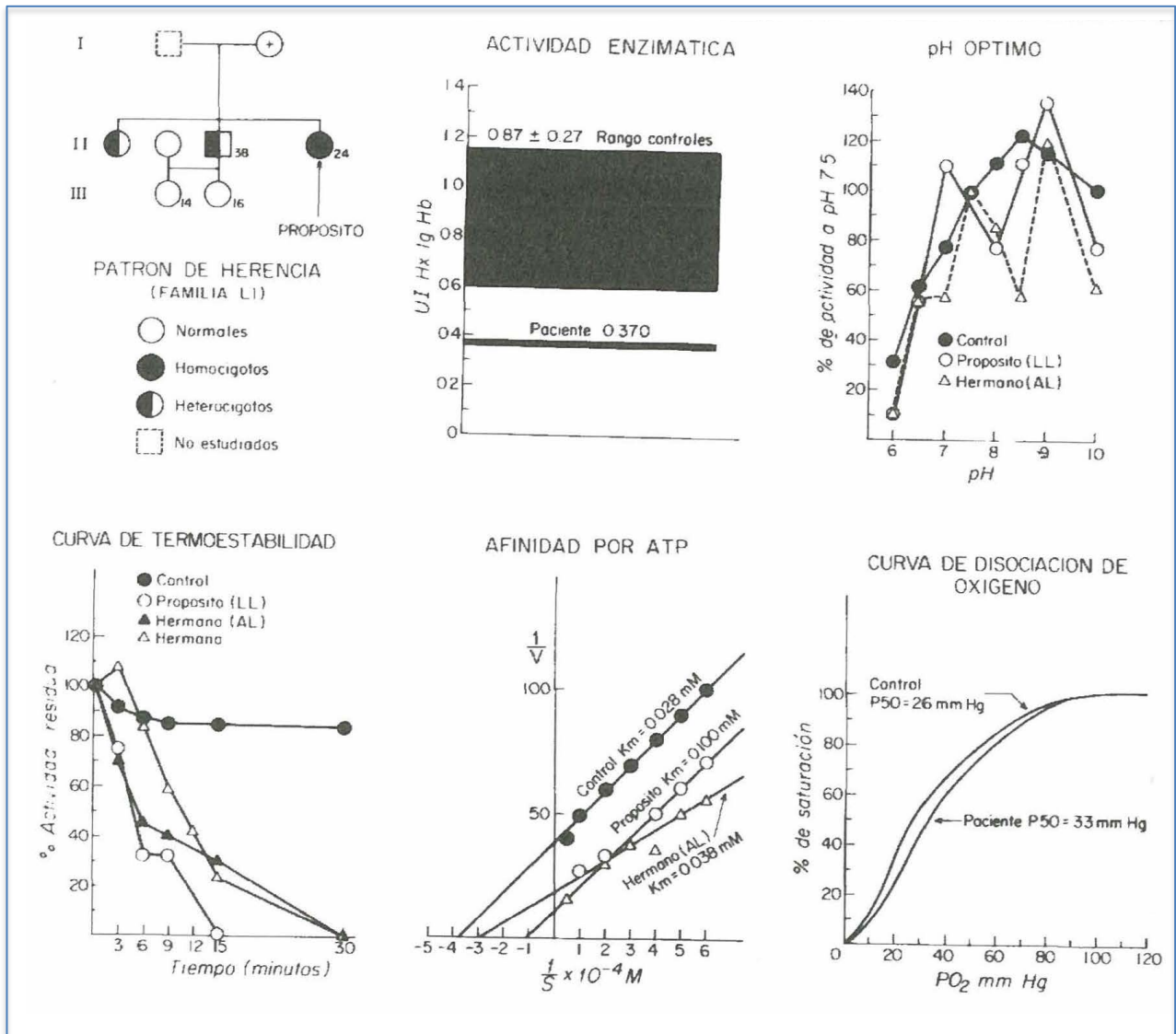
Características Clínicas y Bioquímicas de la Variante de Hexoquinasa Caracas

DIAGNÓSTICO:

ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA NO ESFEROCITICA

Hb: 11 g/dl

RETICULOCITOS: 6,85 %



ESTABILIDAD DE LA HEXOQUINASA A LA DIÁLISIS

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

AFINIDAD DE LA HEXOQUINASA POR SUSTRATOS

El K_m para el ATP de la 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 K_m para el ATP de 0,038 mM y 0,065 mM. (Fig.25)

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

I. ANAMNESIS

Se trata de un paciente de 6 años de edad quién fue referido a la consulta del Instituto de Oncología y Hematología por hiperbilirrubinemia indirecta. El paciente tenía antecedentes de ictericia neonatal que ameritó fototerapia. Al examen físico preescolar en buenas condiciones generales con ictericia conjuntival y polo esplénico palpable. El paciente era oriundo de Villa de Cura, Estado Aragua, así como sus progenitores. (Fig. 26)

Deficiencia de Hexoquinasa
Familia PER-CAM (Villa de Cura, Edo. Aragua)

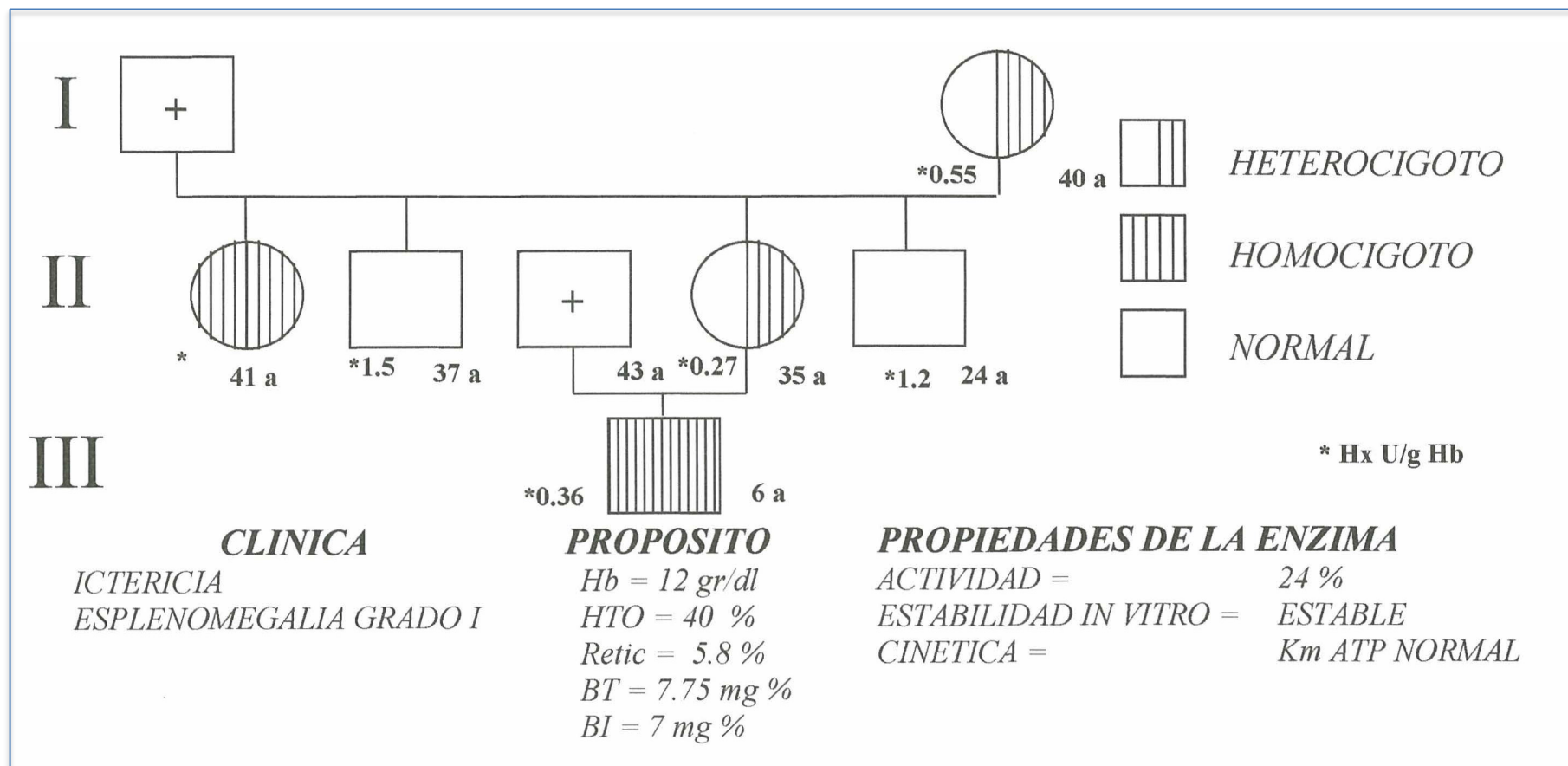


Fig. 26

II. EXAMENES DE LABORATORIO

A. Hematología

Hb:	12 gr%	
Hto:	40%	
VCM:	80mu	(VN: 80-94 mu)
HCM:	30 pg.	(VN: 27-32 pg)
CHCM:	34%	(VN: 32-36%)
Reticulocitos:	5,8%	(VN: 0,1-0,5%)
Contaje blanco y plaquetario: normales		
Frotis de sangre periférica mostró:		
	Policromasia	++
	Esquistocitosis	+
	Esferocitosis	+

B. Química Sanguínea

Bilirrubina Total:	7,75 mg/dl (VN: 0,2-1,2)
Bilirrubina Directa:	0,75 mg/dl (VN: 0.2-1)
Bilirrubina Indirecta:	7,0 mg/dl (VN: 0.1-0.3)
Fosfatasas Alcalinas:	140 U/lit (VN adultos: 30-115)
LDH:	400 U/lit (VN: 100-225)

C. Exámenes Especiales

Coombs directo e indirecto: negativos

Investigación de cuerpos de Heinz en fresco e incubados: negativos

Curva de Fragilidad Globular en fresco e incubada: normal

Prueba de Ham para detectar hemoglobinuria paroxística nocturna: negativa.

Prueba de Inestabilidad al calor para detectar hemoglobinas inestables: negativa

Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, buffer tris

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

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

Cuantificación de hemoglobina Fetal: 1,0% (VN: 0,5-1,0%).

Curva de disociación de oxígeno practicada en el Hemoscan

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

D. Determinaciones Enzimáticas

Pruebas Pantallas de Beutler para detectar deficiencias de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, piruvato quinasa, triosa fosfato isomerasa, NADH metahemoglobina reductasa: fueron normales, no se detectó deficiencia de ninguna de éstas enzimas.

Cuantificación de las Enzimas de la Vía Glicolítica y de la Vía de la Hexosa Monofosfato: todos los niveles de enzimas intraeritrocíticas fueron encontrados normales o ligeramente aumentados excepto el de la hexoquinasa que fue encontrado disminuido en 0,360(VN: $0,88 \pm 0,27$ U.IIg Hb), dichos eritrocitos solamente poseían el 41% de la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos normales provenientes de donantes del Banco de Sangre (Tabla XXI).

Cuando comparamos la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos del paciente con la de los eritrocitos provenientes de un paciente con anemia hemolítica congénita por esferocitosis con 5,8% de reticulocitos encontramos que en estos casos la actividad de hexoquinasa fue de 2,24 UI/g Hb mientras que la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos del paciente con 5,8% de reticulocitos fue mucho más baja de 0,360 U.l/ g Hb.

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

**ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS ERITROCITOS DEL
PACIENTE PER-CAM DEFICIENTE EN HEXOQUINASA Y DE LOS
CONTROLES**

<i>Enzimas</i>	<i>Propósito Eritrocitos UUg Hb</i>	<i>Control Eritrocitos UI/g Hb</i>
Hexoquinasa (Hx)	0,36	0,88 ± 0,27
Glucosa fosfato isomerasa (GPI)	32,0	30,19 ± 11,31
Fosfofructoquinasa (PFK)	9,27	9,27±2,7
Aldolasa	1,70	1,82 ± 0,42
Gliceraldeído fosfato dehidrogenasa (GPD)	128,40	124,5 ± 40,2
Fosfogliceroquinasa (PGK)	228,80	219 ± 21,2
Difosfogliceromutasa (DPGM)	3,94	3,35 ± 0,6
Monofosforogliceromutasa (MPGM)	11,00	11 ± 1,42
Enolasa	1,80	1,8 ± 0,1
Piruvato quinasa (PK)	1,00	1,09 ± 0,1
Dehidrogenasa láctica (LDH)	28,90	25,2 ± 15
Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PD)	10,70	8,0 ± 1,6

TABLA XXI

**NIVELES DE HEXOQUINASA INTRAERITROCITICA EN PACIENTE
PER-CAM CON ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA Y FAMILIARES**

Eritrocitos de Paciente y Familiares	Hexoquinasa U.I/gHb
PROPÓSITO	0,36
MADRE	0,27
TIA	0,61
TIO	1,20
TIO	0,1,5
ABUELA Materna	0,559
CONTROL (donante)	0,870± 0,27
CONTROL (anemia hemolítica con 5,8% de reticulocitos).	2,24

TABLA XXII

**ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA POR DEFICIENCIA DE
HEXOQUINASA EN LA FAMILIA GG**

I. AMNANESIS:

Se trata de un paciente de 20 años de edad quién fue referido a la consulta del Instituto de Oncología y Hematología por hiperbilirrubinemia indirecta. El paciente tenía antecedentes de ictericia neonatal que ameritó fototerapia. Al examen físico adulto joven en buenas condiciones generales con ictericia conjuntival y resto del examen físico completamente normal. El paciente era oriundo de Carúpano, Edo. Sucre, así como sus progenitores (Fig. 27)

**Deficiencia de Hexoquinasa
Familia G.G. (Carúpano, Edo. Sucre)**

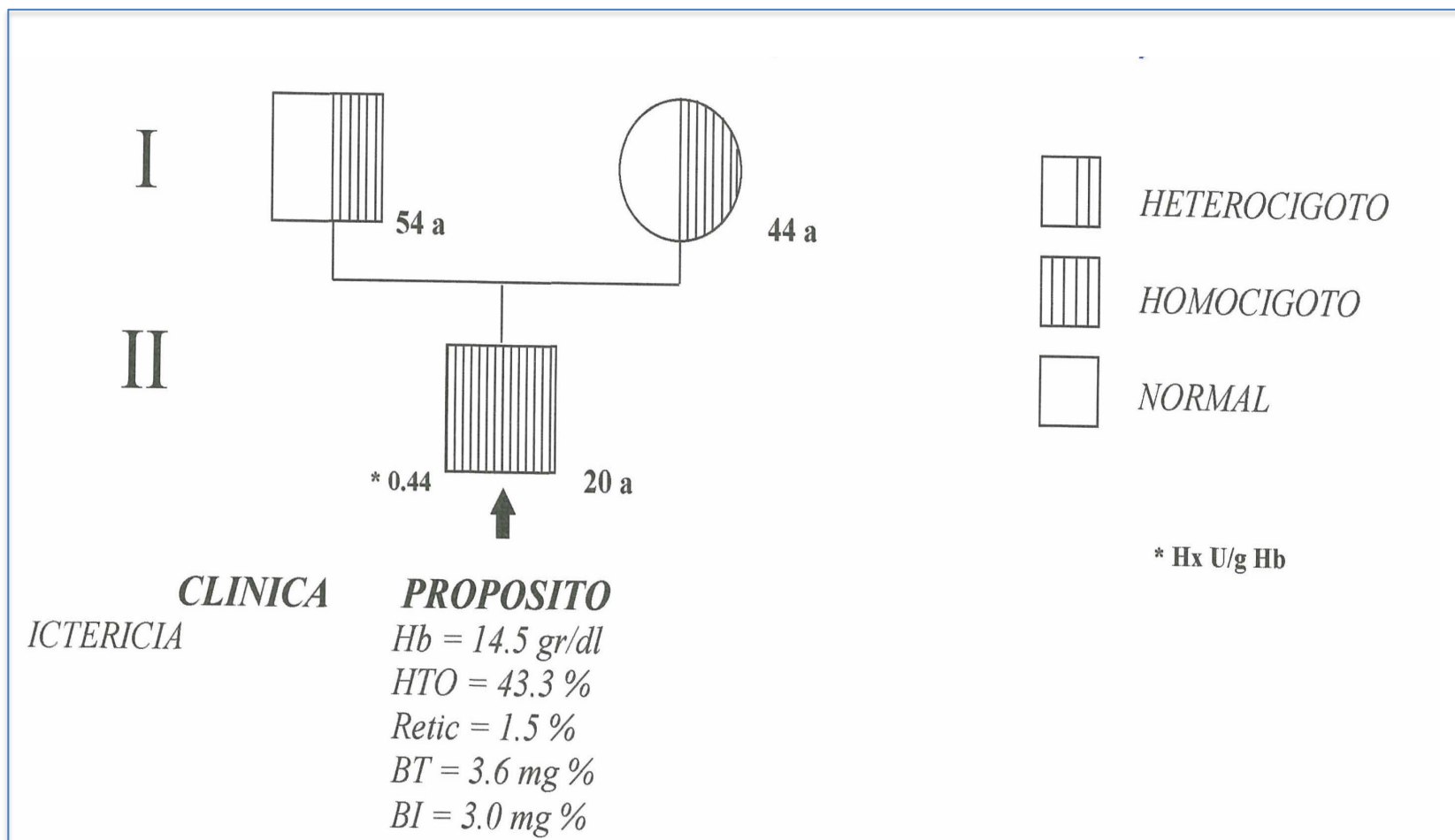


Fig. 27

11. EXAMENES DE LABORATORIO

A. Hematología

Hemoglobina:	14.5 gr/dl	
Hematocrito:	43,3 o/o	
VCM:	83 mu	(VN: 80-94 mu)
HCM:	30,9 pg.	(VN: 27-32 pg)
CHCM:	34,7%	(VN: 32 – 36%)
Reticulocitos:	1,5%	(VN: 0,1-0,5%)
Contaje blanco y plaquetario:	normales	
Frotis de sangre periférica:	normal	

B. Química Sanguínea

Bilirrubina Total	3,60 mg/dl	(VN:0.2-1.2)
Bilim1bina		
Directa:	3,0 mg/dl	(VN: 0.2-1)
Bilirrubina Indirecta:	0,60 mg/dl	(VN: 0.1-0.3)
Fosfatasas Alcalinas:	115 UI/lt	(VN adultos: 30-115)
LDH:	180 U/lt	(VN: 100-225)

C. Exámenes Especiales

Coombs directo e indirecto: negativos

Investigación de cuerpos de Heinz en fresco e incubados: negativos

Curva de Fragilidad Globular en fresco e incubada: normal

Prueba de Ham para detectar hemoglobinuria paroxística nocturna: negativa.

Prueba de Inestabilidad al calor para detectar hemoglobinas inestables: negativa

Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa, buffer tris

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

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

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

Curva de disociación de oxígeno practicada en el Hemoscan
Aminco: normal con un p50: 26 mmHg (VN: 26-27 mmHg)

D. Determinaciones Enzimáticas

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

Cuantificación de las enzimas de la Vía Glicolítica y de la Vía de la Hexosa Monofosfato: todos los niveles de enzimas intraeritrocíticas fueron encontrados normales o ligeramente aumentados excepto el de la hexoquinasa que fué encontrado disminuido en 0,44(VN: 0,80-1,2 U.I g/ Hb), dichos eritrocitos presentaban el 50% de la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos normales provenientes de donantes del Banco de Sangre (Tabla XXIII). Los eritrocitos de los padres del paciente G.G. presentaron también niveles intraeritrocíticos de hexoquinasa disminuidos en relación a los eritrocitos controles. (Tabla XXIV)

**ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS ERITROCITOS
DEL PACIENTE G.G DEFICIENTE EN HEXOQUINASA
Y DEL CONTROL**

Enzimas	Propósito Eritrocitos U.I/g Hb	Control Eritrocitos U.I/g Hb
Hexoquinasa (Hx)	0,44	0,88 ± 0,27
Glucosa fosfato isomerasa (GPI)	31,0	30,19 ± 11,31
Fosfofructoquinasa (PFK)	2,90	9,27 ± 2,7
Aldolasa	1,60	1,82 ± 0,42
Gliceraldeido fosfato Dehidrogenasa (BPD)	126,80	124,5 ± 40,2
Fosfogliceroquinasa (pGK)	228,00	219 ± 21,2
Difosfogliceromutasa (DPGM)	3,20	3,35 ± 0,6
Monofosforogliceromutasa (MPGM)	12,00	11 ± 1,42
Enolasa	17,70	1,8 ± 0,1
Piruvato quinasa (PK)	1,36	1,09 ± 0,1
Dehidrogenasa láctica (LDH)	28,00	25,2 ± 15
Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa	12,70	8,0 ± 1,6

TABLA XXIII

**NIVELES DE HEXOQUINASA INTRAERITROCITICA
EN PACIENTE G.G CON ANEMIA HEMOLÍTICA CONGÉNITA Y FAMILIARES**

<i>Eritrocitos de Paciente y familiares</i>	<i>Hexoquinasa U.I/gHb</i>
PROPÓSITO	0,44
MADRE	0,27
PADRE	0,30
CONTROL (donante)	0,870±0,27

TABLA XXIV

DISCUSION

En este estudio encontramos que la etiología más frecuente en 2338 pacientes estudiados con anemias hemolíticas congénitas fueron las hemoglobinopatías, las cuales fueron detectadas en 1511 pacientes y de éstas hemoglobinopatías la más frecuente fue la tara drepanocítica, lo cual concuerda con los estudios realizados por Arends y otros autores en Venezuela (43, 44).

Las anemias hemolíticas congénitas secundarias a deficiencias de enzimas fueron encontradas con menor frecuencia en éste estudio como ha sido reportado anteriormente en Venezuela por Muller y col. (45).

La deficiencia de G-6-PD como etiología de la anemia hemolítica congénita fue la más frecuente, detectándose 241 pacientes deficientes en G-6- PD de un total de 287 pacientes deficientes en enzimas, lo cual representa el 84,32% de las deficiencias de enzimas en nuestro estudio, mientras que los deficientes en enzimas de la vía glicolítica representaron solo el 3,78%. La deficiencia de G-6-PD es la enzimopatía más frecuente no solamente en Venezuela sino a nivel mundial y tiene áreas de alta prevalencia en Africa, en el sur de Europa, en el Medio Este, en el sureste de Asia y Oceanía (46).

Las deficiencias de la vía glicolítica encontradas fueron solo la piruvato quinasa y la hexoquinasa, siendo la deficiencia de piruvato quinasa la más frecuente. La deficiencia de piruvato quinasa fue la primera enzimopatía detectada de la vía de Embden-Meyerhof que fue reconocida como etiología de una anemia hemolítica congénita no esferocítica y junto con la deficiencia de G-6-PD clase I constituye la causa más frecuente de hemólisis crónica (47).

Al revisar la literatura internacional encontramos que en otros países la anemia hemolítica por deficiencia de glucosa fosfato isomerasa es la segunda causa de hemólisis crónica congénita más frecuente de la vía glicolítica, después de la piruvato quinasa. La anemia hemolítica puede ser la única manifestación de un desorden multisistémico aunque miopatía y retardo mental pueden algunas veces acompañar a ésta anemia. Esta enzima se ha caracterizado en varios pacientes por ser muy inestable. Cuando el paciente homocigoto

para la deficiencia de glucosa fosfato isomerasa presenta la anemia hemolítica tenemos que ambos padres son heterocigotos bioquímicamente para dicha deficiencia con la mitad de la actividad de glucosa fosfato isomerasa. Aunque algunos pacientes homocigotos para la deficiencia de GPI son realmente dobles heterocigotos para dos diferentes mutantes de GPI. El resultado es que la combinación de dos enzimas anormales de GPI produce un cuadro hemolítico muy severo indistinguible del estado de homocigocidad que ocurre en el cuadro hemolítico clásico de deficiencia de GPI cuando ambos padres son heterocigotos (3, 48). En este estudio que representa el más completo hasta los momentos realizado en nuestro país no se detectó ningún paciente deficiente en glucosa fosfato isomerasa.

La segunda causa de anemia hemolítica congénita por deficiencia de enzimas en este estudio fue la deficiencia de piruvato quinasa, lo cual concuerda con la literatura al respecto (49, 50).

Los neonatos con deficiencia de piruvato quinasa presentaron ictericia en el 100% de los casos que fue tratada con fototerapia o exanguinotransfusión. Esto reflejó el grado de hemólisis de los neonatos deficientes en piruvato quinasa, ya que cuando el grado de hemólisis fue más severo requirió exanguinotransfusión. La hiperbilirrubinemia ha sido detectada por otros autores frecuentemente en los neonatos deficientes en piruvato quinasa y puede requerir exanguinotransfusión, como en éstos casos (50,51).

La ictericia neonatal en estos pacientes se extendió durante toda su vida, presentando aumento de la bilirrubina indirecta por debajo 6mg/dl como ha sido descrito (Tabla la y Ib)(55).

Uno de los pacientes estudiados que pertenecía a la familia Dia (fig. 13) fue tratado con exanguinotransfusión en las primeras horas de vida y requirió múltiples transfusiones de concentrado globular durante el período de lactante menor, por lo cual ameritó una esplenectomía precoz a los 9 meses de edad. Este fue el niño más joven con anemia hemolítica por deficiencia de piruvato quinasa de esta serie que se está reportando que fue tratado con esplenectomía. Esta anemia profunda a tan temprana edad ha sido reportada anteriormente (50,51).

En líneas generales las esplenectomías se realizan después de los 6 años de edad debido a que el hipoesplenismo causa una depresión inmunológica que está asociada con

un aumento de infecciones bacterianas severas, las cuales en algunos casos resultan fatales sobretodo en lactantes y niños pequeños (53). El riesgo de infección es mayor cuando la esplenectomía se realizó en un paciente con talasemia mayor, drepanocitosis, enfermedad de Hodgkin (54). El riesgo de sepsis está relacionado con la causa o severidad del hipoesplenismo, enfermedad subyacente y edad del paciente. El riesgo de infección severa y muerte es más alto dentro de los 2 a 3 años postesplenectomía (53,54).

Una de las pacientes femeninas deficiente en piruvato quinasa de la familia Gue (Fig. 10) tuvo un embarazo cuyo feto presentó retardo de crecimiento intrauterino y la paciente requirió la administración de concentrados globulares durante el embarazo, como fue descrito por Fanning y col. (50). El recién nacido presentó solo la ictericia fisiológica del recién nacido.

La anemia de estos pacientes en líneas generales permaneció estable, variando poco en su intensidad durante los años de observación clínica, pero se agravó cuando el paciente presentó infecciones bacterianas como amigdalitis o infecciones virales, requiriendo concentrados globulares, probablemente por períodos de hipoplasia medular transitoria secundaria a las infecciones.

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

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

En este estudio se detectaron pacientes deficientes en piruvato quinasa con úlceras en miembros inferiores, lo cual fué reportado por Muller y col en 1976, Curiel y col. en 1978, y por Vives-Corróns y col. en 1980 (56). En otras anemias hemolíticas congénitas como drepanocitosis y esferocitosis también puede asociarse úlceras en miembros inferiores (57).

Los pacientes deficientes en piruvato quinasa de este estudio presentaron niveles de hierro sérico que variaron desde valores normales hasta valores por arriba del rango normal, reflejando el grado de hemólisis. La ferritina siempre estuvo aumentada en estos pacientes.

Los valores de hierro séricos más altos y de ferritina más elevados se observaron en los pacientes ya adultos con varias transfusiones.

Aunque existe una gran cantidad de evidencia que indica que el hierro es un elemento importante para el normal funcionamiento de las células del sistema inmune, es conocido que la deficiencia de hierro afecta la respuesta inmune en humanos y animales experimentales. Pero por otro el exceso de hierro es tóxico y la sobrecarga de hierro en hemocromatosis, anemia sideroblástica, anemias hemolíticas congénitas por talasemia y drepanocitosis puede conducir a disminución de la respuesta inmune y a infecciones. Las alteraciones de la respuesta inmune cuando el hierro y la ferritina están elevados que han sido descritas son la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos, anormalidades de la función de fagocitosis, expresión de los marcadores de superficie de los linfocitos, alteraciones de las subpoblaciones de los linfocitos T (58).

En este grupo de pacientes deficientes en piruvato quinasa con hemólisis crónica severa no pudimos detectar deficiencias de las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, o de los niveles de complemento CH50, C3, C4 ó de las subpoblaciones de linfocitos T y B estudiados con anticuerpos monoclonales a pesar de que la ferritina estuvo elevada en todos estos pacientes. Sin embargo se notó una disminución de la respuesta proliferativa a la phytohemaglutinina y a la concanavalina A de las células mononucleares separadas de la sangre de 4 pacientes deficientes en piruvato quinasa con niveles de hierro sérico por arriba del límite superior del rango normal y niveles elevados de ferritina. Esto quizás podría atribuirse a la sobrecarga de hierro liberada en la hemólisis crónica, aunque es una muestra muy pequeña para hacer una conclusión definitiva, por lo tanto se requeriría medir esta respuesta proliferativa en mayor número de pacientes.

Los familiares de los pacientes clasificados como heterocigotos, clínicamente eran asintomáticos como ha sido descrito en esta enfermedad (3)

Los niveles de piruvato quinasa intraeritrocíticos medidos por espectrofotometría mostraron poca correlación con la severidad de la anemia, como ha sido reportado previamente (41).

El valor absoluto de PK intraeritrocítico en U/lit medido por espectrofotometría varió según se aprecia en la tabla V. Esto podría explicarse porque el estudio fue realizado en el

transcurso de varios años variando las marcas y lotes de reactivos utilizados, por lo cual ha sido una practica internacional reportar estos valores de enzimas como un porcentaje del valor enzimático del control del día utilizado (2).

La herencia de la piruvato quinasa en todos estos pacientes con anemia hemolítica fue autosómica recesiva y en todos los casos los padres eran heterocigotos para la deficiencia. Ha sido descrita en esta enfermedad que pacientes con anemia hemolítica severa que clínicamente se comportan como homocigotos son realmente dobles heterocigotos y esto puede comprobarse por el grado de reticulocitosis, la acumulación de glucosa-6-fosfato y las propiedades in vitro de la PK mutante residual intraeritrocítica (41). En este estudio no determinamos la acumulación de glucosa-6-fosfato y con solo el estudio de la PK intraeritrocítica residual no pudimos detectar dobles heterocigotos. Asumimos que en el caso de que los padres fuesen primos hermanos, los hijos de ambos con la anemia hemolítica por deficiencia de PK fueron catalogados como homocigotos obligados.

Los 18 pacientes con anemia hemolítica congénita por deficiencia de piruvato quinasa y sin úlceras en miembros inferiores presentaron la enzima PK intraeritrocítica disminuida en relación a los controles, pero la actividad cinética de la enzima PK residual del eritrocito y la curva de termoestabilidad fueron normales, indicándonos que aunque la enzima PK intraeritrocítica estaba disminuida, la actividad de PK residual era normal. Se conoce que las variantes de PK con características cinéticas desfavorables se asocian a una enfermedad hemolítica más severa, lo cual no ocurrió en estos 18 pacientes estudiados, ya que su PK intraeritrocítica era cinéticamente igual a la PK de donantes de sangre controles (Tabla VI, Fig. 17, Fig.18).

Los pacientes con úlceras en miembros inferiores además de presentar deficiencia de la piruvato quinasa intraeritrocítica, se caracterizaron porque la enzima residual intraeritrocítica presentó una disminución de la afinidad para su sustrato PEP, no respondía a la estimulación con Fructosa difosfato, es decir no era alostérica, presentó un aumento de la afinidad para su sustrato ADP y era inestable al calor.). Los pacientes de éste estudio con dicha variante de PK se caracterizaron por presentar clínicamente anemia hemolítica severa crónica asociada a úlceras en miembros inferiores (Fig. 10, Fig. 11, Fig. 17, Tabla VI) Se han descrito variantes de piruvato quinasa con el KM normal, elevado o disminuido

para el osfoenolpirúvico. Cada grupo de variantes puede presentar el K_m para el ADP elevado, normal o disminuido. Es conocido que las variantes de PK con disminución de la afinidad a su sustrato PEP y disminución de la estabilidad térmica llevan asociado un cuadro de hemólisis más severo (59,60,61,62).

El contenido de Na y K intraeritrocítico de los eritrocitos de seis de los pacientes deficientes en piruvato quinasa, con reticulocitosis marcada, y sin úlceras en miembros estuvo aumentado discretamente a 134 meq/lt/gl. rojos en relación a eritrocitos controles (Na+K: 106,2 meq/lt/gl. rojos), mientras que en el caso de los eritrocitos de pacientes drepanocíticos que también sirvieron de controles se observó que el contenido de Na y K total permaneció sin modificaciones en relación a los eritrocitos controles. Pero el contenido intraeritrocítico de K de estos eritrocitos drepanocíticos estuvo disminuido a $81,8 \pm 6$ meq/lt/gl. (K intraeritrocítico de los controles: $97,2 \pm 7,7$ meq/lt/gl.) mientras que el contenido de Na intraeritrocítico aumentó a $22,9 \pm 4,5$ meq/lt/gl. (Na intraeritrocítico de los controles: $9 \pm 2,5$). De manera tal que la pérdida de K fue compensada por la ganancia de Na. Los eritrocitos de tres pacientes con la variante de PK presentaron un contenido de Na y K aumentado como los eritrocitos deficientes en PK con anemia hemolítica y sin úlceras en miembros inferiores, es decir el contenido de cationes de los eritrocitos era similar en los pacientes deficientes en PK sin y con úlceras en miembros inferiores.

El contenido de ATP de los eritrocitos deficientes en piruvato quinasa estuvo disminuido tanto en los pacientes con la deficiencia clásica como en los pacientes con la variante de PK asociada a úlceras en miembros inferiores a $1,5 \text{ mM}/10^{13}$ glóbulos rojos (ATP de controles: $2 \text{ mM}/10^{13}$ glóbulos rojos). El contenido de calcio de los eritrocitos de los pacientes deficientes en PK estuvo aumentado a $138 \pm 12,1$ mM/mi cel. en relación a los eritrocitos de donantes del Banco de Sangre que sirvieron de controles, éstos tuvieron niveles de $91,4 \pm 27$ mM/mi cel. Los eritrocitos de los pacientes con drepanocitosis se caracterizaron por niveles aún más altos de calcio de $223,7 \pm 23,8$ mM/mi cel., que los eritrocitos de los pacientes deficientes en PK.

Glader ha realizado experimentos m vitro que demuestran que el eritrocito depletado

de ATP, pierde K, pierde de agua, se deshidrata, acumula calcio en su membrana y se hace rígido. (63). También se ha demostrado que éstos eritrocitos deshidratados atraviesan con dificultad filtros milipore de 8 micras y la suspensión de estos eritrocitos demuestra un aumento de la viscosidad en el viscosímetro Wells-Brookfield(64). Por lo tanto, estos eritrocitos deshidratados y rígidos van a ser atrapados en los sinusoides esplénicos y fagocitados por los macrófagos. Esto ha llevado a pensar que el defecto metabólico de los eritrocitos deficientes en piruvato quinasa se exagera en el ambiente esplénico, donde existe menor cantidad de glucosa para alimentar la vía glicolítica y estos eritrocitos pierden K y agua, se deshidratan, se hacen rígidos y son atrapados en los cordones esplénicos y fagocitados por los macrófagos (65,66). En este trabajo encontramos que los eritrocitos deficientes en piruvato quinasa presentan disminución de la cantidad de ATP y un aumento del calcio, pero no encontramos la disminución de K. Es posible que las condiciones in vitro llevaran a un discreto aumento de la permeabilidad de los reticulocitos con aumento discreto de Na y K intraeritrocítico, ya que en el caso de los eritrocitos normales controles sin reticulocitosis, los valores de Na y K intraeritrocíticos permanecieron en el rango normal, por lo cual no hubo cambios en el contenido de Na y K del eritrocito. Cuando examinamos los eritrocitos de los pacientes con drepanocitosis encontramos que éstos presentaron el contenido de K intraeritrocíticos disminuido, pero con un aumento del contenido intraeritrocítico de Na que llevo a conservar el contenido de cationes sin alteraciones. Estos eritrocitos presentaron niveles de calcio más elevados que los deficientes en piruvato quinasa. Podríamos asumir al igual que con los eritrocitos deficientes en PK, que las condiciones in vitro con las cuales trabajamos, que, aunque tratamos de hacerlas parecidas a las in vivo, no fueron las fisiológicas, y no observamos la disminución del contenido total de cationes intraeritrocíticos del eritrocito drepanocítico que esperábamos si fuesen eritrocitos deshidratados según Gardos (67).

Cuando incubamos eritrocitos con 60% de reticulocitos provenientes de pacientes deficientes en piruvato quinasa con el bloqueador de la fosforilización oxidativa KCN presentaron disminución marcada de K desde 136,5 a 52 meq/10¹³ glóbulos rojos, caída del ATP de 1,5 a 0,2 meq/10¹³ glóbulos rojos y disminución del VCM de 124 a 96 μ ³ mientras que los eritrocitos con 40% de reticulocitos provenientes de un paciente con anemia hemolítica

no presentaron los cambios descritos. Estos cambios que se producen bajo incubación, son similares a los descritos en drepanocitosis, y junto con la alteración de la viscosidad que se producen pueden ser eventos fisiopatológicos importantes en la destrucción del eritrocito en el ambiente esplénico ya que también han sido observados a medida que el eritrocito envejece. En eritrocitos viejos que van a ser fagocitados por el sistema macrofágico del bazo presentan cambios en el contenido de K y agua que predicen un trastorno en la permeabilidad de la membrana de dichos eritrocitos. Son eritrocitos que por su trastorno en la permeabilidad sufren cambios en el contenido de cationes, ATP, calcio, los cuales se exageran en el ambiente esplénico y van a ser reconocidos como eritrocitos defectuosos o anormales por las células macrofágicas del bazo y lo tanto fagocitado (68). Podiéramos asumir con los resultados que aquí se presentan que la hemólisis del eritrocito deficiente en PK se debe en una gran parte a trastornos en la permeabilidad de la membrana y no directamente a la deficiencia de la enzima.

La deficiencia de PK fué traída a Venezuela según estos estudios por nuestros inmigrantes caucásicos a la región de los Andes de donde se ha expandido a otras regiones, ya que la mayoría de los pacientes pertenecen a los Andes venezolanos y los indígenas venezolanos estudiados no presentan dicha deficiencia.

En este estudio se confirma que los perros Basenji deficientes en PK se comportan clínicamente como los pacientes deficientes en PK, ya que los homocigotos padecen la anemia hemolítica congénita severa mientras que los heterocigotos son clínicamente asintomáticos, pero presentan el 50% de la actividad enzimática. La deficiencia de la PK no solamente ha sido descrita en perros Basenji sino también en los perros Beagle (69).

Los niveles de piruvato quinasa de los eritrocitos jóvenes del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de PK fueron más elevados que el de los eritrocitos maduros o viejos, como sucede en los eritrocitos humanos, que a medida que envejecen van disminuyendo los niveles intraeritrocíticos de algunas de las enzimas de la vía glicolítica y del ciclo de la hexosa monofosfato tales como G-6-PD, HX, PK, etc. (70).

Las propiedades bioquímicas encontradas en la piruvato quinasa intraeritrocítica canina de perros normales que sirvieron de controles y la piruvato quinasa intraeritrocítica de perros Basenji deficientes en piruvato quinasa con la anemia hemolítica son similares a las

reportadas por Black y col. y Stander y col. (71, 72).

Al comparar la piruvato quinasa intraeritrocítica residual de los eritrocitos del perro Basenji homocigoto para la deficiencia de piruvato quinasa con la PK intraeritrocítica residual de pacientes deficientes en PK con la variante de PK encontramos que ambas enzimas son cinéticamente similares ya que ambas presentaron un $KM[PEP]$ disminuido, no respondieron a su activador alostérico FDP, presentaron un $Km [ADP]$ elevado y la termoestabilidad disminuida. Es posible que las características de la enzima PK residual tenga influencia en la severidad del proceso hemolítico de los humanos y de los perros. Pocos estudios de este tipo han sido realizados en perros por lo cual puede pensarse que la misma heterogeneidad bioquímica encontrada en la piruvato quinasa humana podría encontrarse en la canina y afectar el cuadro hemolítico.

Cuando comparamos el contenido de cationes de los eritrocitos humanos provenientes de pacientes con deficiencia de piruvato quinasa con los eritrocitos caninos deficientes en PK encontramos que el eritrocito humano tiene niveles altos de K ($119 \pm 4,9$ meq./Lt/ glóbulos rojos) y bajos de Na ($15 \pm 1,9$) mientras que el canino tiene niveles bajos de K ($19,9 \pm 2,2$ meq./Lt/ glóbulos rojos) y elevados de Na ($66,6 \pm 4$ meq./Lt/ glóbulos rojos). Al usar KCN se observa que los reticulocitos deficientes en PK humanos presentan caída de los niveles de ATP (de $1,5$ a $0,2$ mM/ 10^{13} glóbulos rojos) y pérdida de K importante (desde $136,5$ a 52 meq./Lt/ glóbulos rojos) con la consiguiente deshidratación celular mientras que los eritrocitos caninos deficientes en PK aunque presentan caída de los niveles de ATP ($0,6$ a $0,1$ mM/ 10^{13} glóbulos rojos) y pérdida de K intracelular (32 a 9 meq./Lt/ glóbulos rojos) sufren una ganancia de Na compensadora (desde 65 a 87 meq./Lt/ glóbulos rojos) y el eritrocito canino no se deshidrata, permaneciendo su volumen corpuscular medio igual en las 4 horas de incubación con KCN.

Los datos que aquí se presentan demuestran que los eritrocitos deficientes en PK humanos y caninos son sensibles al cianuro, el cual induce inhibición mitocondrial y produce caída del ATP, disminuyendo la cantidad de sustrato para que el transporte activo de cationes se produzca.

En el caso de los eritrocitos humanos al caer los niveles de ATP, se inhibe la bomba de sodio y potasio o sea el transporte activo de cationes, predominando solamente el transporte

pasivo de cationes y debería al perderse el K, aumentar la cantidad de Na intracelular, pero esto no ocurre en los eritrocitos humanos deficientes en piruvato quinasa. Podemos asumir que simultáneamente debe haber cambios en la permeabilidad de la membrana de los eritrocitos humanos deficientes en PK, ya que se produce una pérdida masiva de K, sin ganancia de Na, la cual no puede ser explicada solamente por la disminución del transporte activo de Na y K, ya que en este caso habría pérdida de K con ganancia de Na. La pérdida de K se acompaña de pérdida de agua y deshidratación celular. Estas células deshidratadas tienen poca capacidad de deformación y de atravesar los sinusoides esplénicos, donde la disminución de oxígeno va a llevar a disminución del funcionamiento del ciclo de Krebs, disminuyendo la cantidad de ATP que produce este ciclo y por lo cual exacerbándose el problema de depleción de ATP que posee el eritrocito deficiente en PK. Solamente va a trabajar la vía glicolítica, la cual está ya comprometida por la disminución de la piruvato quinasa. El defecto metabólico del eritrocito deficiente en PK se agrava, la célula pierde aún más K y agua, disminuye su volumen, se deshidrata y va a ser fagocitada por el sistema de macrófagos esplénicos.

En este trabajo los eritrocitos caninos deficientes en PK con altas concentraciones intracelulares de Na y bajas de K, al incubarse con cianuro también pierden K masivamente, pero éste es compensado por ganancia de Na y el eritrocito canino deficiente en PK no disminuye de volumen y no se deshidrata, lo cual no podría explicarse por inhibición del transporte activo, producida por caída de los niveles de ATP, ya que en este caso se perdería Na y se ganaría K. También podría explicar los cambios vistos en los cationes de los eritrocitos caninos deficientes en PK por trastornos en la permeabilidad de la membrana, pero que en este caso no conducen a una deshidratación del eritrocito canino y por lo tanto el mecanismo de hemólisis de los eritrocitos caninos deficientes en PK es diferente al de los eritrocitos humanos deficientes en PK.

Se detectaron a lo largo de este estudio solo tres familias deficientes en la hexoquinasa, lo cual demuestra la baja frecuencia de esta enzimopatía como causante de anemia hemolítica congénita. Solo 22 casos de anemia hemolítica congénita han sido atribuidas a la deficiencia de hexoquinasa a nivel internacional y esto explica que solamente tres familias hayan sido detectadas (75). Pero con este estudio se demuestra que la deficiencia

de hexoquinasa está presente en Venezuela en dos familias procedentes del estado Aragua y en una familia procedente del Estado Sucre. Podríamos asumir que al igual que la deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa y la piruvato quinasa, la anemia hemolítica congénita por deficiencia de hexoquinasa fue traída a Venezuela por inmigrantes portadores de dichos genes para las deficiencias respectivas basados en que se conoce que la raza venezolana es una mezcla de indígenas, caucásicos y poblaciones negroides y que los indígenas venezolanos estudiados no presentan deficiencias de otras enzimopatías de la vía glicolítica como PK y de la vía de la glicólisis. (75).

Los tres pacientes detectados con deficiencia de hexoquinasa presentaban un cuadro de anemia hemolítica, siendo más severo en la paciente LL con anemia, reticulocitosis y bilirrubina indirecta elevada (Fig.24, Fig.25, Fig.26, Fig. 27). Llama la atención que el paciente propósito de la familia G.G presentaba una hemólisis bien compensada ya que los niveles de hemoglobina y hematocrito permanecían normales con una hiperbilirrubinemia indirecta (Fig. 27). Este espectro en la severidad de la hemólisis desde hemólisis bien compensada a hemólisis muy severa ha sido observado en pacientes deficientes en hexoquinasa. (41) y en G-6-PD (73).

No se observaron episodios de hiperhemólisis en estos pacientes a lo largo de los años de este estudio, como ha sido observado en la hemólisis por deficiencia de G-6-PD (73). Ningún paciente presentó aplasia de médula ósea como ha sido reportado por Lohn en 4 pacientes deficientes en hexoquinasa que presentaron un síndrome de Fanconi asociado (41).

Los niveles de hexoquinasa intraeritrocíticos estuvieron disminuidos en los propósitos de las tres familias estudiadas, pero persistía una actividad de hexoquinasa residual del 41%, 41%, y 50% (Fig. 24, 26, 27) respectivamente cuando la comparamos con la actividad de hexoquinasa de los controles. Es de hacer notar que la actividad de hexoquinasa de los eritrocitos controles no es muy alta cuando la comparamos con la actividad de otras enzimas intraeritrocíticas como Glucosa fosfato isomerasa, Glucosa-6-fosfato dehidrogenasafosfofructoquinasa, etc (Tabla XVIII). La actividad máxima de la hexoquinasa intraeritrocítica de pacientes deficientes reportados en la literatura internacional ha variado de 13 a 91% de lo normal. Esto coincide con los niveles de hexoquinasa

intraeritrocíticos de los tres propósitos de las tres familias que estamos reportando en este estudio como deficientes en la hexoquinasa. Otros estudios demuestran que la hexoquinasa es la enzima glicolítica con la actividad más baja en los eritrocitos normales, pero ella juega un papel en la regulación de la glicólisis del eritrocito (70, 74).

Los pacientes deficientes en hexoquinasa, que estamos reportando pertenecientes a las tres familias presentaron niveles intraeritrocíticos de hexoquinasa intermedios entre los de los controles y los propósitos, lo cual también coincide con lo reportado al respecto (75).

Se encontró que la actividad de hexoquinasa era más alta en eritrocitos jóvenes controles (1,5 UllgHb) que en eritrocitos maduros (0,334 UllgHb) y que la actividad de hexoquinasa es más alta cuando hay reticulocitosis. Así mismo fue más alta en los eritrocitos jóvenes en relación a las de los eritrocitos maduros del propósito LL (Tabla XIX), lo cual demuestra que la actividad de hexoquinasa declina con la edad del eritrocito y dicha actividad se pierde durante la maduración de los reticulocitos. Esta disminución de actividad de hexoquinasa de los eritrocitos debe de acortarle la sobrevida y aún más de los eritrocitos jóvenes que tienen unas necesidades metabólicas más grandes.

La variante de hexoquinasa de los eritrocitos de la paciente LL mostraron como característica que era una enzima sumamente inestable a la diálisis y al calor con un Km bajo para el ATP (Fig.25). Esta constituye la primera familia venezolana con una variante de hexoquinasa detectada en nuestro país. A nivel mundial se han reportado tres pacientes con variantes de hexoquinasa intraeritrocíticas con disminución de la estabilidad de la enzima in vitro, pero con cinéticas normales. Estas fueron reportas por Magnani y col., Board y col., Newman y col (76, 77, 78) Así mismo Keitt reportó un paciente con una variantes de hexoquinasa con disminución de la estabilidad de la enzima in vitro y con anormalidades de la cinética, parecida a la que estamos describiendo en este estudio.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Arya, A., Layton, D.M, Bellingham, A.J. Hereditary Red Cell Enzymopathies. Blood Reviews. 9: 165, 1995.
- 2 Beutler, E.: *Hemolytic Anemia* en Disorders of Red Cell Metabolism. Plenum Medical Book Co. New York, 1978.
- 3 Beutler, E.: *Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia pyruvate kinase deficiency and other anomalies*. Capítulo 58, pag. 574. En Williams W.J, Beutler E, Erslev A, Lichtman M (Eds) Hematology, McGraw Hill.
- 4 Beutler E.: *Red cell enzyme defects as no diseases and as diseases*. Blood 54: 1, 1979.
- 5 Müller-Soyano, A.: *Anemias hemolíticas por defectos enzimáticos*. En Lopez Borrasca, Arocha-Piñango C.L, Celso, Campos, Parreira, Pavlowsky, Ruiz-Arguelles, San Miguel (Eds) Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Ediciones Universidad de Salamanca, 1992.
6. Dacie, J.N.: *The congenital anaemias*. Pag. 171. Grune & Stratton, New York, 1960.
- 7 Acquatella, G., Müller-Soyano A., Franceschi. A.: *Deficiencia de piruvato quinasa en una familia venezolana. Primer caso estudiado en Latinoamérica*. Acta Med. Ven. 18: 1, 1971.
- 8 Searcy, G.P., Miller, D. R, y col.: *Congenital hemolytic anemia in the Basenji dog due to erythrocyte pyruvate kinase deficiency*. Can. J. Comp. Med. 35:67, 1971
- 9 Müller-Soyano, A.: *Anemias hemolíticas por deficiencias de las enzimas del ciclo glicolítico*. Capítulo 10, pag. 210. En Perez-Requejo J.L (Ed) Hematología. Editorial Disinlimed, C.A, 1995.
- 10 Paglia, D.E., Valentine, W.N., y col: *Defective erythrocyte pyruvate kinase with impaired kinetics and reduced optimal activity*. Br.J. Haematol. 221: 651, 1972.
- 11 Glader, B.: *Salicylate-induced injured of pyruvate kinase deficient erythrocyte*. N.E.J.M 294:916, 1976.
- 12 Bossu, M., Dacha, M. y col.: *Neonatal hemolysis due to transient severity of inherited pyruvate kinase deficiency*. Acta Haematol. 40:166, 1968.
- 13 Mohrenweiser, H.W.: *Frequency of enzyme deficiency variants in erythrocyte of newborn infants*. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:5046, 1981.
- 14 Miwa, S: *Recommended methods for the characterization of red cell pyruvate kinase variant*. Br. J. Haematol. 43: 375, 1979.
- 15 Takegawa S., Fujii, H., y col.: *Change of pyruvate kinase isozymes from M2 to L-type during development of the red cell*. Br. J. Haematol. 54:467, 1987.
- 16 Ibsen, K.H., Schiller, K.W., y col.: *Interconvertible kinetic and physical forms of human erythrocyte pyruvate kinase*. J. Biol. Chem. 246:1233, 1971.

- 17 Peterson, J.S, Chem, C.J., y col.: *The subunit structure of human muscle and human erythrocyte pyruvate kinase isozymes*. FEBS. Lett. 49:73, 1974.
- 18 Valentine, W.N, Oski, F.A, Baughan, M.A, Schneider, A.S, Naiman, J.L.: *Erythrocyte hexoquinase and hereditary hemolytic anemia*. Capítulo 4, pag. 288. En Beutler, E.(Ed). Hereditary disorders of erythrocyte metabolism. New York. Grune & Stratton, 1968.
- 19 Necheles, T.F, Rai U.S, Cameron, D.: *Congenital nonspherocytic hemolytic anemia associated with an unusual erythrocyte hexokinase abnormality*. J. Lab. Clin. Med. 76: 593, 1970.
- 20 Magnani, M., Rossi, L., et al: *Improved metabolic properties of hexoquinase-overloaded human erythrocyte*. Biochem. Biophys. Acta. 155: 423, 1988.
- 21 Me Morris, F.A., Chen, T.R., y col.: *A point mutation increasing the stability of human phosphoglicero isomerasa*. J. Biol. Chem. 249: 4571, 1974.
- 22 Matthay, K.K., Mentzer, W.C.: *Erythrocyte enzymopathies in the newborn*. *Clín. Haematol.* 10: 31, 1981.
- 23 Whitelaw, A.G.L., Rogers, P.A., y col.: *Congenital haemolytic anaemia resulting from glucose phosphate isomerase deficiency: genetics, clinical picture, and prenatal diagnosis*. J. Med. Genet. 16: 189, 1979.
- 24 Ravindranath, Y., Paglia, D.E., y col.: *Glucose phosphate isomerase deficiency as a cause of hydrops fetalis*. N.E.J.M. 316: 258, 1987.
- 25 Hutton, J.J. and Chicote, R.R: *Glucose phosphate isomerase deficiency with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia*. J. Pediatr. 85: 494, 1974.
- 26 Boulard, M.R, Meienhofer, M.C. y col. *Red cell phosphofructokinase deficiency*. N.E.J.M. 291: 978, 1974.
- 27 Tarui, S, Okuno, G. y col. *Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle: a new type of glycogenolysis*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 19: 517, 1965.
- 28 Danon, M.J., Serenella, S., y col.: *Late onset muscle phosphofructokinase deficiency*. Neurology. 38: 956, 1988.
- 29 .Etiemble, J., Piat, C, y col.: *Inherited erythrocyte phosphofructokinase deficiency: molecular mechanism*. Human Genet. 55: 383, 1981.
- 30 Beutler, E., Scott, S., y col. *Red cell aldolase deficiency and hemolytic anemia: a new syndrome*. Trans. Assoc. Am. Physicians. 86: 154, 1973.
- 31 Schneider, A. S., Valentine, W., N., y col.: *Triosephosphate isomerase deficiency. A multisystem inherited enzyme disorder: clinical and genetic aspects*. In Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism. Beutler, E. (Ed). New York, Grune & Stratton. 1968. pag. 265.
- 32 Valentine, W.N., Hsieh, H.S., y col.: *Hereditary hemolytic anemia associated with phosphoglycerate kinase deficiency in erythrocyte and leukocyte*. N.E.J.M. 280: 528, 1969.

- 33 *Simple Electrophoretic System for presumptive identification of abnormal hemoglobins* by The International Comitee for Standarization in Hematology. Blood. 52: 1058, 1978.
- 34 Bemini, L. R.,: *Rapid determination of hemoglobin A2 by DEAE cellulose chromatography*. Biochem. Genet. 2: 305, 1969.
- 35 Beutler, E. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. 2³ edición.. New York. Grune & Stratton. 1975.
- 36 *Intemational Comitee for Standarization in Haematology: Recommended Methods for the Characterization of Red Cell Pyruvate Kinasa Variants*. Br. J. Haem. 43: 275, 1979.
- 37 Romero, P.J. *Role of membrane-bound Ca in ghost permeability toNa y K*. J. Membrane Biol. 29: 329, 1976.
- 38 Milford-Ward A. *Immunoprecipitation in the evaluation of the proteins in plasma and body jluids*. En Thompson, R.A.(Ed), *Technique in Clinical Immunology*, 2a edición, Blackwell Scientific Publication, 1981.
- 39 Brown, D., Hobart, M.J. *Complement and complement fixation*. En Thompson, R.A.(Ed), *Technique in Clinical Immunology*, 2a edición, Blackwell Scientific Publication, 1981.
- 40 Boyum, A. *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from normal human blood*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 21: 77, 1968.
- 41 Mentzer, W. *Pyruvate kinase deficiency and disorders of glycolisis*. Capítulo 18, pag. 634. En Nathan & Oski (Eds) *Hematology of Infancy and Childhood*. 4a edición. W.B. Saunders Co, 1993.
- 42 Baronciani, L., Magalhaes, I.Q. y col. *Study of the molecular defects in pyruvate kinase deficient patient affected by nonspherocytic hemolytic Anemia*. Blood Cells, Molecules, and Diseases. 31: 49, 1995.
- 43 Arends, T. *El problema de las hemoglobinopatías en Venezuela*. Rev. Venez. de Sanidad y Asistencia Social. 26: 61, 1961.
- 44 Arends T. *Estado actual del estudio de las hemoglobinas anormales en Venezuela*. Sangre 8: 1, 1963
- 45 Arends T., Perez Bandez O., Anchustegui M y col. *Características hematológicas de la población del estado Falcón (Venezuela). Comparación de las variantes hemoglobínicas de cuatro poblaciones*. Invest Clin. 26(2):87, 1985
- 46 Beutler, E. *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other enzyme abnormalities*. In Williams Hematology. Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller B. S., Kipps T.J.(Eds). Mac Graw-Hill. 5a Ed, 1995.
- 47 Paglia, D.E. *Disorders of erythrocyte glycolisis and nucleotide metabolism*. In Blood. Principies and Practice of Hematology. Handin, R.I., Luz, S.E., Stossel, T.(Eds). J.B. Lippincott Co. 1995.

- 48 Blume, K. G., Hyrniuk, W., Powers, D., Trinidad, F., West, C. y Beutler E. *Characterization of two new variants of glucose-phosphate isomerase deficiency hereditary non-spherocytic hemolytic anemia*. Journal of Laboratory and Medicine, 79, 942, 1972.
- 49 Valentine WN, Tanaka KR, Miwa S. *A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subject with congenital non-spherocytic hemolytic anemia*. Trans Assoc. Am. Physician 74:100, 1961.
- 50 Fanning, J., y Hinkle, R. S. *Pyruvate kinase deficiency hemolytic anemia: two successful pregnancy outcomes*. Am. J. Obstet. Gynecol. 153: 313, 1985.
- 51 Tanaka KR, Valentine WN, Miwa S. *Pyruvate kinase (PK) deficiency hereditary non-spherocytic hemolytic anemia*. Blood: 19, 267, 1962.
- 52 Matthay, K. K., y Mentzer, W.C.: *Erythrocytes enzymopathies in the newborn*. Clin. Haematol. 10: 31, 1981.
- 53 Krivey, N., y Tatarski, I. *Infections and splenectomy*. N. Engl. J. Med. 298: 165, 1978.
- 54 Singer, D. B *Postsplenectomy sepsis*. Perspect. Pediatr. Pathol. 1: 285, 1973.
- 55 Morisaki, T., Tani, K., y col. *Ten cases of pyruvate kinase (PK) deficiency found in Japan: enzymatic characterization of patient' PK*. Acta Hematol. Jpn. 51: 1080, 1988
- 56 Muller-Soyano A., Roura E y col. *Pyruvate kinase deficiency and leg ulcers*. Blood 47: 807, 1976
- 57 Vives- Corrons, J.L., Marie J., y col. *Hereditary erythrocyte pyruvate kinase deficiency and chronic hemolytic anemia: clinical, genetic and molecular studies in six new Spanish patients*. Hum. Genet. 53: 401, 1980
- 58 Soyano A., Pons H., Montaña R. y col. *Effect of iron compounds on the immune response in vitro* en Recent advances in pharmacology and therapeutics. Velasco M., Israel A., Romero. H, Silva (eds) Elsevier Science Publisher B.V (Biomedical Division), 1989
- 59 Staal, G.E.J., Rijksen, G., y col. *Extreme deficiency of L type pyruvate kinase with moderate clinical expression*. Clin. Chim. Acta 118: 241, 1982
- 60 Ishida, Y., Miwa, S., y col. *Thirteen cases of pyruvate kinase deficiency found in Japan*. Am J. Hematol, 10: 239, 1981
- 61 Kahn, A., Marie J., y col. *Search for a relationship between molecular anomalies the mutant erythrocyte pyruvate kinase variants and their pathological expression*. Hum. Genet. 57:172, 1981
- 62 Miwa, S., Fujii, H., y col. *Seven pyruvate kinase variants characterized by the ICSH recommended methods*. Br. J. Haematol. 45: 575, 1980
- 63 Glader B. E., Lux S.E., Müller-Soyano A, Platt O.S, y col. *Energy reserve and cation composition of irreversible sickle cells in vivo*. Br. J. Haematol. 40: 527, 1978

- 64 Mentzer, W. C., Baehner, R. L., y col. *Selective reticulocyte destruction in erythrocyte pyruvate kinase deficiency*. J. Clin. Invest. 50: 688, 1971
- 65 Keitt AB: *Pyruvate kinase deficiency and related disorders of red cell glycolysis*. Am. J. Med 41: 762, 1966.
- 66 Glader BE: *Salicylate-induced injured of pyruvate kinase deficient erythrocytes*. N. Engl. J. Med. 294: 016, 1976
- 67 Gardos G, Straub FB: *Über die rolle der ATP in der K- permeabilität der menschlichen roten blutkörperchen*. Acta Physiol. Acad. Sci. 12: 1, 1957.
- 68 Staal, G., E., Sybesma, H.B., y col. *Familial hemolytic anaemia due to pyruvate kinase deficiency*. Folia Med. Neerl. 14: 685, 1972
- 69 Searcy, G. P., Tasker J.B and Miller D.R *Animal model: Pyruvate kinase deficiency in dogs*: Am. J. Pathol. 94: 689, 1979
- 70 Oski F., Naiman J. L. *Disorders of red cell metabolism* Vol IV in the series Major Problems in Clinical Pediatrics M. Markowitz (ed). W.B. Saunders Co. 1983.
- 71 Black J.A., Chern C.J. and Rittenberg M.B. *Canine Erythrocyte pyruvate kinase I. Properties of the normal enzyme*: Biochemical Genetics 13:331,1975.
- 72 Standerfer R. J., Rittenberg M.B., y col. *Canine Erythrocyte pyruvate kinase II. Properties of the abnormal enzyme associated with hemolytic anemia in the Basenji dog*. Biochemical Genetic 13: 341, 1975
- 73 Müller A. *Anemias hemolíticas por deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa*. Capítulo 11, pag. 225. En Perez Requejo J.L(ED) Hematología. Desinlimed, C.A. Caracas, 1995
- 74 Fornani, G., Dacha, M y col. *Role of hexokinase in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes*. Ital. J, Biochem. 35:316, 1986
- 75 Müller A. *Anemias hemolíticas por deficiencia enzima del ciclo glicolítico*. Capítulo 10, pag. 205. En Perez Requejo J.L(ED) Hematología. Desinlimed, C.A. Caracas, 1995
- 76 Magnani, M., Stocchi, V., y col. *Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia due to a new hexokinase variant with reduce stability*. Blood 66: 690, 1985.
- 77 Newman, P., Muir, A., y col. *Non spherocytic hemolytic anemia in mother and son associated with hexokinase deficiency*. Br. J. Haematol. 46: 537, 1980.
- 78 Board, P. G., Trueworthy, R., y col. *Congenital nonspherocytic anemia with an unstable hexokinase variant*. Blood 51: 111, 1978.
- 79 Keitt, A.S: *Hemolytic anemia with impaired hexokinase activity*. J. Clin.Invest. 48: 1997, 1969.