

DEFICIENCIA DE PIRUVATO QUINASA Y HEMOGLOBINA C. ESTUDIO FAMILIAR

Mario Chaves*, Walter E. Rodríguez*, Jaime Briceño**, German F. Sáenz*

RESUMEN

En una familia del Cantón de Santa Cruz de Guanacaste, Costa Rica, fue posible demostrar la existencia de los dos primeros casos homocigotos reportados de deficiencia de piruvato quinasa, que se correspondieron con un cuadro de anemia hemolítica crónica no esferocítica. Los dos embarazos que ha tenido la propositus han resultado en una exacerbación de su problema hemolítico. El perfil enzimático, y en especial la razón PK/Hx, logró demostrar el carácter heterocigoto de los padres. En el padre y otro hijo no afectado enzimáticamente, se logró demostrar la coexistencia con Hb AC. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1988; 9 (4): 00-00]

INTRODUCCION

La deficiencia de la piruvato quinasa (PK) eritrocítica ocupa el segundo lugar en frecuencia entre las enzimas eritrocíticas después de la G6PD, y fue la primera deficiencia enzimática descrita que se asoció

con la vía del ciclo glucolítico de Embden-Meyerhoff (29, 30). Hasta la fecha, se han descrito en el mundo varios centenares de pacientes con este trastorno, siendo la gravedad del proceso muy variable, pues depende de si el sujeto es homocigoto o heterocigoto, también varía de acuerdo a la existencia de mutantes cualitativamente anormales de la enzima (15, 28, 31, 34), tal y como ocurre en la deficiencia de la G6PD. La primera descripción sobre la existencia de este trastorno en Costa Rica se halla en el reporte de Chaves et. al. (4), parte del cual se ha tomado para elaborar este informe. Como no existe en la literatura señalamiento alguno sobre la asociación de esta eritroenzimopatía con hemoglobinas anormales, parece interesante reportar en este trabajo la coexistencia de Hb C y deficiencia de PK en una familia costarricense de Guanacaste. La existencia de Hb C en esa región ya había sido indicada en trabajos previos (19, 22).

MATERIAL Y METODOS

El estudio familiar permitió analizar al padre y madre de la propositus, quienes no tenían relación alguna de consanguinidad, así como a dos de sus hermanos. Los análisis hematológicos básicos fueron realizados mediante los métodos estándar (5, 20, 23). Los estudios electroforéticos de la hemoglobina se realizaron sobre cintas de acetato de celulosa (Titán III, Helena Labora-

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

** Laboratorio Clínico, Clínica de la C.C.S.S., Santa Cruz, Guanacaste, Costa Rica.

tories, Texas) a pH 8,6 según el método de Schneider et. al. (25). La electroforesis a pH ácido se realizó mediante el método descrito por Robinson (18). La Hb A₂ se dosificó mediante columnas de DEAE-celulose según el método descrito por Sáenz et. al. (21). Los niveles de Hb F se determinaron por el método de desnaturalización alcalina de Singer et. al. (26). La dosificación de la PPZn se realizó mediante un hematofluorómetro (AVIV, AVL Instrument, Lakewood, N.J.). Los niveles de haptoglobinas séricas se determinaron por el método de gel filtración de Lionetti et. al. (11).

Los estudios enzimáticos se efectuaron en muestras tomadas con heparina sódica y ACD. Para los efectos, se eliminaron los leucocitos mediante filtración de celulosa microcristalina y alfa celulosa en solución de NaCl 0,15 M, según el método de Beutler (2). Los niveles enzimáticos se determinaron por el método de Beutler (2) y recomendados por el ICSH (8). Todas las mediciones se realizaron a 37°C en un espectrofotómetro UVIKON 860 (Kontron Instrument). Las concentraciones de los metabolitos intermediarios fueron determinados por el método de Minakmi et. al. (13). Los niveles de 2,3 DPG fueron analizados espectrofotométricamente de acuerdo con el método de Sigma (Catálogo N-35 UV). Los estudios enzimáticos de escrutinio fueron realizados mediante los métodos de reducción del azul de metileno (5, 20, 23), y el del cianuro ascorbato de Jacob y Jandl (9, 23).

La proposita es una mujer mestiza de 27 años (1988), oriunda de Santa Cruz, Guanacaste, que en los últimos 10 años se ha venido estudiando por ictericia y anemia de moderada a severa (Hb 6.8 - 8.6 g/dl) sin que se pudiera efectuar el diagnóstico de certeza de su padecimiento. Con un intervalo de 3 años (1982-1985), la paciente dio a luz dos niños sanos con ligera prematuridad, haciéndose evidente la exacerbación de su cuadro anémico tras cada embarazo, con necesidad de transfusiones. Luego de su segundo parto, requirió colecistectomía por litiasis biliar. Como dato interesante, se destaca el antecedente patológico de icte-

ria neonatal, al igual que uno de sus hermanos, también poseedor de un cuadro hemolítico importante. Tanto en éste como en la proposita, se señalan crisis hemolíticas mal consignadas en el respectivo historial clínico, que en ocasiones requirieron de tratamiento transfusional, particularmente en ella, aun fuera de su período gestacional. A la hora del estudio enzimático global, la paciente y su hermano anémico se constituyeron en los proposita.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se indican los resultados de los últimos análisis hematológicos practicados a los 5 miembros de la familia. Tanto en la paciente como en su hermano también enfermo, se destaca la presencia de un síndrome hemolítico importante, con un cuadro macrocítico normocrómico, con excepcionales codocitos y equinocitos y marcada reticulocitosis (Cuadro 1). En otro hijo de la familia y en el padre, se logró demostrar la existencia de hemoglobinopatía C heterocigota. En la madre, hubo un cuadro sideropénico revelado en su hemograma y por el valor de la PP-Zn (8,1 ug/g de Hb). En ninguno de los sujetos se logró demostrar algún trastorno enzimático en el ciclo de las pentosas fosforadas, ni en el metabolismo del glutatión y de los nucleótidos.

El escrutinio inicial ya había indicado normalidad para la G6PD, salvo una positividad llamativa de la prueba del cianuroascorbato en los proposita. Esta prueba inicialmente descrita para investigar G6PD, puede ser positiva en otras eritropatías, incluida la deficiencia de PK (21, 23). Con esta idea se enfiló el interés en el estudio analítico cuidadoso del ciclo de EmbdenMeyerhoff. En el cuadro 2 se indican los niveles, de PK en la familia, demostrándose la deficiencia de esa enzima en los proposita, con valores intermedios en el otro hijo poseedor de Hb C y en los padres. El bloqueo metabólico por este déficit enzimático, se puso en evidencia al encontrarse disminución de ATP y piruvato, con aumento de

CUADRO 1

**DATOS HEMATOLOGICOS DE LOS PROPOSITA
CON DEFICIENCIA DE P.K. Y DE SU FAMILIA**

| | Propositus | Hermano enfermo | Hermano sano | Padre | Madre |
|--|------------|--------------------|-----------------|-------|-------|
| Hematocrito (L/l) | 0,28 | 0,25 | 0,45 | 0,45 | 0,31 |
| Hemoglobina (g/L) | 89 | 82 | 162 | 164 | 93 |
| CHCM (g/L) | 317 | 329 | 361 | 366 | 300 |
| VCM (fl) | 107,8 | 103,4 | 85,3 | 85,1 | 87,0 |
| HCM (pg) | 32,2 | 30,9 | 28,9 | 29,9 | 25,1 |
| Eritrocitos (10 ⁹ /L) | 2,92 | 2,65 | 5,77 | 5,69 | 4,01 |
| Leucocitos (10 ⁹ /L) | 8,42 | 6,47 | 9,01 | | 7,04 |
| Plaquetas (10 ⁹ /L) | 240 | 350 | 330 | 310 | 230 |
| Reticulocitos (%) | 12,0 | 16,3 | 1,2 | 1,5 | 1,0 |
| Haptoglobinas (g/L) (VR= 0, 5-1,50)** | 0,0 | 0,0 | 1,35 | 0,77 | 0,95 |
| Bilirrubina total (mg/dl) | 12,0 | 9,5 | 0,40 | 0,40 | 0,84 |
| Bilirrubina conjugada (mg/dl) | 11,2 | 8,7 | 0,35 | 0,30 | 0,54 |
| Electroforesis de Hb (pH 8.6) | AA | AA | AC | AC | AA |
| Hb A ₂ (%) | 3,2 | 3,1 | NE | NE | 2,9 |
| Hb F (%) | <1 | <1,8 | <1 | <1 | <1 |

NE = No efectuada

**VR = valores de referencia

2,3 DPG, PEP, 2 PG, 3 PG, Lactato, AMP y ADP. En estudios anteriores al diagnóstico final de certeza, la madre no evidenció cuadro anémico. En esta oportunidad, se puso en evidencia un estado anémico moderado, de carácter ferroprivo.

DISCUSION

Presentamos en este trabajo la existencia de una familia híbrida guanacasteca de dos alteraciones hereditarias del eritrocito, déficit de PK y hemoglobinopatía C. La historia clínica de los proposita, en especial el de la hija, pone en evidencia la severidad del cuadro hemolítico provocado por la deficiencia de PK, en especial durante los períodos de gestación, época en donde el embarazo actúa como factor precipitante (7). En la literatura se hace ver la considerable variación en la presentación, seve-

ridad y respuesta al tratamiento en los pacientes con esta eritroenzimopatía, dependiendo de los síntomas del grado de anemia y de la ictericia (16). Un 50 por ciento de los pacientes aparecen icterícos y anémicos en el período neonatal o en los primeros meses de vida, un 30 por ciento lo es en la infancia y un 20 por ciento en la edad adolescente (24), siendo usual encontrarse casos con un síndrome hemolítico compensado (16,24). La ictericia neonatal no es infrecuente, por lo que en las familias afectadas, los recién nacidos deben ser cuidadosamente observados a fin de que la anemia y el icterus sean tratados lo más rápidamente posible (17). Por lo general el cuadro anémico es de moderado a severo (Hb entre 4 y 10 g/dl), y debido a la baja afinidad de la sangre por el ² (dados los altos niveles de 2,3 DPG), los síntomas de anemia suelen ser menores de lo esperado (6).

CUADRO 2

NIVELES DE P. K. EN LOS PROPOSITA Y SU FAMILIA

| | Actividad de P.K. (U/g Hb) | Razón PK/Hx |
|---------------|----------------------------|----------------|
| Propositus I | 1,7 | 0,73 |
| Propositus II | 1,1 | 0,34 |
| Hermano | 3,9 | 4,6 |
| Padre | 5,2 | 5,3 |
| Madre | 8,1 | 6,3 |
| Control | 7,5 | 7,6 (7,2-15,3) |

La litiasis biliar es frecuente como resultado de la hiperbilirrubinemia, con todas las complicaciones inherentes, tales como cólico biliar, colecistitis, carcinoma de la vesícula y fístula del ducto biliar (6). En los pacientes es común la esplenomegalia, y en los casos seleccionados, la esplenectomía mejora los requerimientos transfusionales (1, 32), sobreviniendo un alza considerable de los reticulocitos (16).

La deficiencia de la PK puede ser fatal en el recién nacido o en la infancia temprana (1). Por ejemplo, el gene prevalente en los Amish de Pennsylvania produce una enfermedad particularmente severa, y a menos que los niños homocigotos afectados sean esplenectomizados, el desenlace usualmente es fatal (3). Aunque el sujeto heterocigoto es asintomático, ocasionalmente pueden verse signos clínicos de hemólisis (10), pudiendo ello estar relacionado con el tipo anormal de enzima mutante (16). Desde el punto de vista fisiopatológico, la deficiencia de PK limita la habilidad de los eritrocitos para metabolizar la glucosa, con la consecuente producción de energías en forma de ATP, cuyo déficit trastorna el transporte de Na⁺ y K⁺, aunque la causa de la hemólisis puede estar asociada con otro defecto localizado en la membrana (33). Los reticulocitos deficientes en PK presentan una sobrevivencia (T1/2) más baja que los eritrocitos de la población general (14), como si esta eritroenzimopatía originara un cuadro anémico por "hemólisis de reti-

culocitos". El mecanismo de hemólisis de estas células podría explicarse por la sugestiva hipótesis de Mentzer et. al. (12), al proponer que los reticulocitos de este trastorno dependen de una fosforilización oxidativa mitocondrial que mantenga un nivel adecuado de ATP.

La condición heterocigota de los padres de los proposita y del hijo no afectado, se pudo obtener gracias al uso de la relación PK/Hx (piruvato quinasa/hexoquinasa), tal y como ha sido preconizado (27), lo cual permite inferir que los proposita resultan ser homocigotos para el defecto (Cuadro 2). Los análisis de una serie de intermediarios metabólicos, en especial del 2,3 DPG, confirman el bloqueo metabólico causado por la enzimopatía. El padre de los proposita y uno de sus hijos presentaron, además de su carácter heterocigota para la deficiencia de PK, una hemoglobinopatía AC. No parece evidente que esta coexistencia provoque problema hematológico alguno, aunque resulta interesante este hallazgo hasta ahora no reportado en la literatura, y que para Costa Rica resulta ser un aporte más sobre su constitución genética y antropológica en torno a hemoglobinopatías y eritroenzimopatías.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el Grant Research RG-BC-38 de la Third

World Academic Science y la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica.

BIBLIOGRAFIA

1. Beutler, E. Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia-pyruvate kinase deficiency and other abnormalities. In: *Hematology*, 3rd. ed. (Williams W. J. et. al. 1983; 575-582.
2. Beutler E. Red Cell Metabolism. *A manual of Biomedical Methods*. 3rd. edition. London, Grune & Stratton, 1984.
3. Bowman, H. S., Mckusick, V. A. & Dronamraju, K. R. Pyruvate kinase deficient hemolytic anemia in an Amish isolate. *A. J. Hum. Genet.* 1965; 17:1-3.
4. Chaves, M., Sáenz, G. F., Briceño, J., Vives-Corróns, J. L., Colomer, D. Anemia hemolítica crónica no esferocítica asociada con deficiencia de piruvato quinasa. *Primeros casos en Costa Rica*. (En prensa: SANGRE).
5. Dacie, J. V., Lewis, S. M. *Practical Haematology*. Sixth edition, London. Churchill Livingstone, 1984
6. Gordon-Smith, E. C. Inherited haemolytic anaemias. In *Postgraduate Haematology*, 2nd. Edit. William Heinemann *Medical Books Ltd.*, London 1981; 159-166.
7. Hirono, A., Forman L. & Beutler, E. Enzymatic diagnosis in non-spherocytic hemolytic anemia. *Medicine* 1978; 67: 110-117.
8. ICSH Recommended methods for the characterization of red cell pyruvate variants. *Brit. J. Haemat.* 1979; 43: 275-286.
9. Jacob, H. S. and Jandl J. H. A simple visual screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency employing ascorbate and cyanide. *N. Engl. J. Med.* 1966; 274: 1162-1170.
10. Kahn, A., Marie, J., Galand, C. & Boivin, P. Chronic haemolysis anaemia in two patients heterozygous for erythrocyte kinase deficiency. *Scand. J. Haemat.* 1976; 16: 250-257.
11. Lionetti, F. J., Valeri, C.R., Bond, J. C., Fortier, N. L. Measurement of hemoglobin binding capacity of human serum or plasma by means of dextrans. *J. Lab. Clin. Med.* 1964; 64:519-523.
12. Mentzer, W. C., Baehner, R. L., Schmidt-Schronbein, H. H., Robinson, S. H. & Nathan D. G. selective reticulocyte destruction in erythrocyte pyruvate kinase deficiency. *J. Clin. Invest.* 1971; 50: 588-699.
13. Minakami, S., Suzuki, C., Saito, T. Yoshikawa. Studies on erythrocyte glycolysis. I. Determination of the Glycolytic intermediates in Human Erythrocytes. *J. Biochem.* 1965; 58: 543-545.
14. Miwa, S., Nishima, T. Studies on pyruvate kinase (PK) deficiency. I. Clinical Hematological and erythrocyte enzyme studies. *Acta. Haemat. Jap.* 1974; 37:1-16.
15. Miwa, S., Fujii, H. Takegawa, S., Nakatsuji, T., Yamato, K, Ishida Y., Ninamiya, S. Seven pyruvate kinase variants characterized by ICSH recommended methods. *Brit. J. Haemat.* 1980; 45: 575-583.
16. Miwa, S. Pyruvate kinase deficiency and other enzymopathies of the EmbdenMeyerhoff pathway. *Clinics in haematology (enzymopathies)*. W. B. Saunders, Co. Ltd. London. 1981; 19(1):57-80.
17. Reich, P.R. *Hematology* 2nd Edit. Little, Brown and Co., Boston, 1984; 195-196.
18. Robinson, A. R. A. new technique for differentiation of hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 1957; 50:745-749.
19. Sáenz, G. F., Alvarado, M. A., Atmetlla, F., Arroyo, G., Jiménez, R. y Valenciano, E. Investigación de hemoglobinas anormales en población de raza negra costarricense. *Rev. Biol. Trop.* 1971; 19: 251-256.
20. Sáenz, G. F., Moreira, J. M. *Manual Latinoamericano*. Ministerio de Salud, Costa Rica, 1980.
21. Sáenz, G. F., Barrantes, A., Jiménez, J., Montero, A. G., Schosinsky, K., Grant, S., Alfaro, E., Valenciano, E., Chaves, M. Estudios de la hemoglobina A por microcromatografía en DEAE-Celulosa (DE52). *Sangre* 1981; 26: 1083-1090.

22. Sáenz, G. F., Chaves, M., Briceño, J., Quintana, E., Arroyo, G., Valenciano, E. y Montero, A. Polimorfismo de la hemoglobina y de la G6PD eritrocítica en población pre-escolar de Santa Cruz, Guanacaste. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1985; 6: 126-130.
23. Sáenz, G. F., Barrantes, A., Chaves, M. *Hematología Analítica*. Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 1987.
24. Saviano, A., Vetrella, M., Caniglia, A., Catera, P. Il deficit di piruvato chinasi associato ad anemia homolítica non eferocítica. Studio biochimico ematologico di 3 casi. *Pediatria* 1976;84: 84-93.
25. Schneider, R. G. Identification of hemoglobin and hemoglobinopathies by electrophoresis on cellulose acetate plates impregnated with citrate agar. *Clin Chem.* 1974;20: 74-83.
26. Singer, K., Chernoff, A. I., Singer, L. Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. *Blood* 1951; 6: 413-428.
27. Sprenger, E. D., Marie, J., Kahn, A., Runt, K., Staal, G. E. J. Humanerythrocytic piruvate kinase deficiency: the use of a kinetic study of mutants enzymes for the detection of heterocytotes. *Human Genetics* 1978;41:61-72.
28. Takegawa, S., Fujii, H., Takahashi, K., Morisaki, T., Hiromo, A., Takizawa, T., Kanno, H., Tsujino, G., Miwa, S. Two casis of piruvate kinase deficiency: PK Kamakura and PK Naniwa. *Acta Haemat. Jap.* 1985; 48: 1332-1336.
29. Tanaka, K. R., Valentine, W. N., Miwa, S. Piruvate kinase (PK) deficiency. Hereditary nonspherocytic anemia. *Blood* 1962; 19:267-295.
30. Valentino, W. N., Tanaka. K. R., Miwa, S. Specific glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital nonspherocytic hemolytic anemia. *Trnas. Assoc. Am. Phys.* 1961; 74:100-110.
31. Valentine, W. N., Tanaka. K. R. Piruvate kinase and other enzyme deficiency hereditary hemolytic anemias. En: (Stanbury, J. B., Wingarden, J. B. & Fredrickson, D. S., ed.). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. N. Y. *Mc Graw Hill*, 1978: 1410-1429.
32. Woodliff, H. J. & Hermann, P. P. *Hematología Clínica. El Mamual Moderno S.A.*, 1981; 75-76.
33. Zanella, A., Rebulli, P., Viello, C., Izzo, C., Tedesco, F. & Sirchia, G. Hereditary pyruvate kinase deficiency: role of abnormal enzyme in red cell pathophysiology. *Brit. J. Haemat.* 1978;40:551-562.
34. Zenella, A., Colombo, M. B., Miniero, R., Perroni, L., Meloni, T., Sirchia, G. Erythrocyte piruvate kinase deficiency: 11 new cases. *Brit, J. Haemat.* 1988: 69: 399-404.