

1991 B

COD. 84478091

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS

DIVISION CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AMBIENTALES



ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA ENZIMA  
ADENOSINA DESAMINASA  
EN PACIENTES CON ANEMIA DE  
DIVERSA ETIOLOGÍA

---

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

MARINA MARIA DE JESUS ROMERO PRADO  
GUADALAJARA, JAL., AGOSTO 1994

---

ESTUDIO BIOQUIMICO  
DE LA  
ENZIMA ADENOSINA DESAMINASA  
EN PACIENTES  
CON ANEMIA DE  
DIVERSA ETIOLOGIA

AUTOR:  
MARINA MARIA DE JESUS  
ROMERO PRADO

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN  
EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA GENÉTICA  
EN LA DIVISION DE GENÉTICA

CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE

C. I. B. O.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

I. M. S. S.

BAJO LA DIRECCION DE:

M. EN C. CLAUDINA MEDINA LOZANO

---

*AGRADECIMIENTOS*

M. EN C. CLAUDINA MEDINA LOZANO  
Por su paciencia, ayuda, asesoría  
y amistad

DR. GERARDO VACA PACHECO y DR. CARLOS ANDRADE MENA  
Por su valiosa colaboración en mi  
proceso formativo.

DRA. AMPARO ESPARZA FLORES  
Por su experiencia, por su enorme apoyo,  
ayuda y paciencia.

M. EN C. MA. DOLORES MEDINA SOTELO  
Por su gran ayuda y amistad.

M. EN C. REBECA JALOMA CRUZ y M. EN C. LUCINA BOBADILLA MORALES  
Por su valiosa amistad y su gran apoyo

ING. FRANCISCO CUELLAR HERNANDEZ  
Por su paciencia, amistad y apoyo

A todos los que han contribuído en mi formación  
personal y profesional

G R A C I A S

---

*DEDICATORIAS*

CON TODO MI CARINO, AMOR Y RESPETO

A tí ALBERTO, amor de mi vida  
Por tu paciencia, apoyo y cariño

A mis padres JULIO Y MARINA  
Por ayudarme, con su ejemplo y apoyo,  
a ser quien soy

A mis hermanos SUSANA, VERONICA y JULIO  
Por todo lo que hemos compartido  
y por lo que nos falta por vivir

A todos mis AMIGOS, por su ayuda,  
apoyo y confianza

*INDICE*

---



# I N D I C E

1. INTRODUCCION .....	1
1.1. DIAGRAMA 1. Vía de Transmetilación mostrando las relaciones entre el metabolismo de la metionina, homocisteína y adenosina .....	3
1.2. DIAGRAMA 2. Desaminación de adenosina por ADA, donde se muestran los aminoácidos del sitio activo que estan implicados en la reacción .....	4
1.3. DIAGRAMA 3. Gen de ADA .....	8
1.4. DIAGRAMA 4. Metabolismo de Purinas en humanos: Vías de recuperación, Síntesis <u>de Novo</u> y Degradación de (desoxi)ribonucleótidos, nucleósidos y bases .....	12
2. ANTECEDENTES .....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
4. HIPOTESIS .....	22
5. OBJETIVOS .....	24
6. MATERIAL Y METODOS .....	26
7. RESULTADOS .....	37
8. GRAFICAS Y TABLAS .....	43
9. DISCUSION .....	59
10. CONCLUSIONES .....	72
11. BIBLIOGRAFIA .....	74

---

*INTRODUCCION*

## I N T R O D U C C I O N

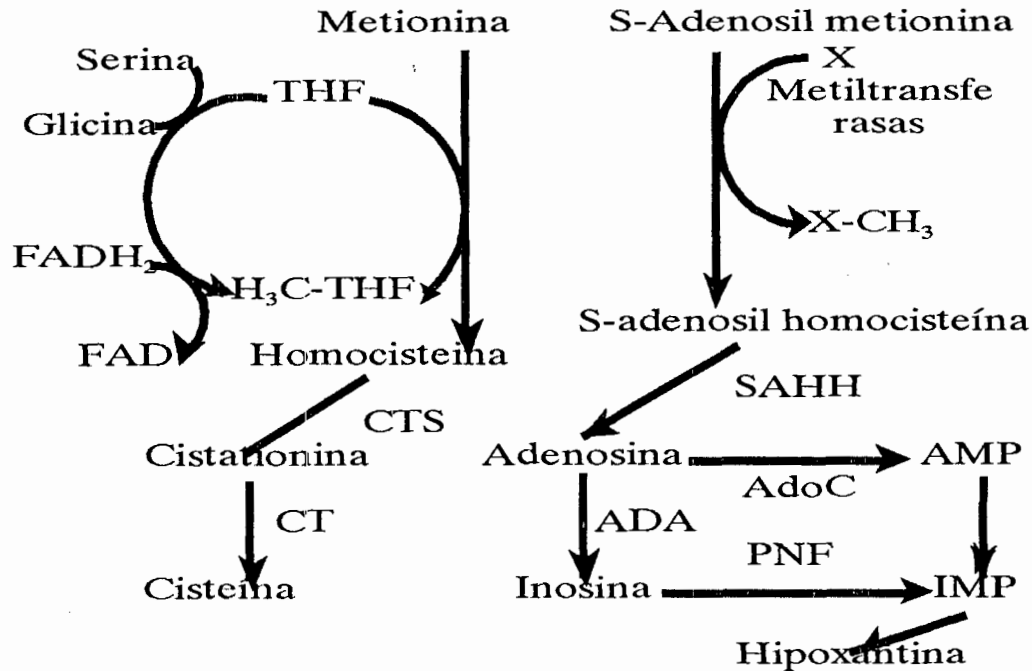
I. LA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASA

La enzima adenosina desaminasa (Adenosina Aminohidrolasa, E.C.3.4.5.5.) (ADA) cataliza la desaminación de adenosina (Ado) y desoxiadenosina (dAdo) a inosina (Ino) y desoxinosina (dIno) respectivamente, tanto en la vía catabólica como de salvamento de purinas (Diagrama 1).

La enzima adenosina desaminasa contiene dos tipos de dominios polipeptídicos:  $\alpha/\beta$ ; la proteína activa está constituida por 8 cadenas  $\beta$  centrales y 8 cadenas  $\alpha$  periféricas, además de 5 hélices adicionales. Se ha demostrado que ADA requiere del ión zinc en su sitio catalítico (2, 3). Los aminoácidos implicados en el sitio activo de la enzima son Asp 295, Asp 296, His 214, His 15, His 17, His 238 (involucrados en el mecanismo de desaminación hidrolítica) y Cys 262 (2-5) (Diagrama 2).

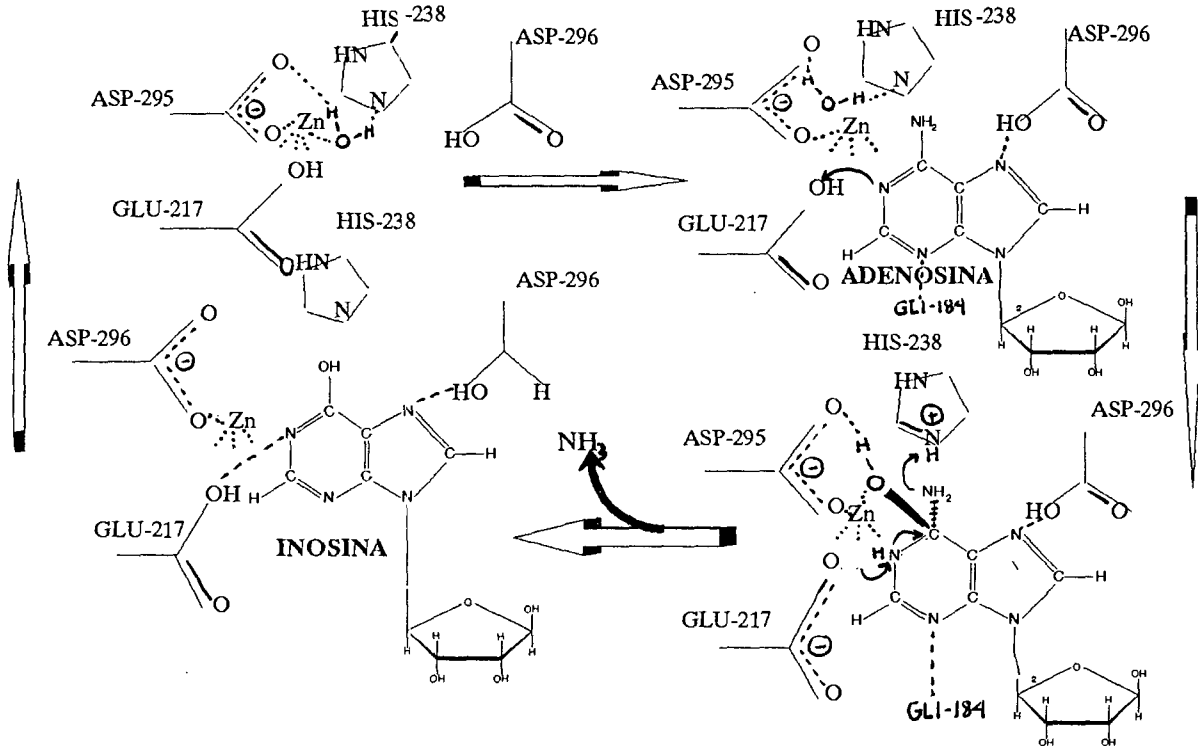
Adenosina desaminasa (ADA) existe como 2 formas moleculares: una forma A de PM 210,000-215,000 D llamada tejido-específica, generalmente asociada a membrana y una forma C o citosólica de PM 35,000, la forma más sencilla. Ambas tienen propiedades catalíticas similares. La forma A es susceptible de disociarse en la forma C más pequeña y, cuando 2 moléculas de la forma C de la enzima se agregan a una glicoproteína, el complejo se convierte en la forma A. Dicha glicoproteína recibe el nombre de "Proteína formadora de Complejo de ADA" ó "Factor de conversión" (ADCP) (1); ésta última tiene 2 sitios, uno para cada subunidad pequeña de ADA (forma C). La ADCP -que ha sido aislada de riñón de bovino- presenta 2 formas moleculares diferentes (CP-II con PM=70,000 y CP-I con PM= 110,000) (6). La ADCP asociada a membrana puede desempeñar las siguientes funciones:

# DIAGRAMA 1: Vía de Transmetilación mostrando las relaciones entre el metabolismo de la metionina, homocisteína y adenosina



THF = Tetrahidrofolato, X= cualquier aceptor de grupos metilos, SAHH= S-adenosil homocisteína hidrolasa, ADA= Adenosina desaminasa, AdoC= Adenilato cina sa, PNF = purina nucleosido fosforilasa, CTS = cistationina sintetasa, CT = Cistationasa

DIAGRAMA 2. Desaminación de adenosina por ADA, donde se muestran los aminoácidos del sitio activo que están implicados en la reacción.



- a) Regular la actividad enzimática de ADA (6,7);
- b) Regulación del metabolismo de Ado y dAdo a nivel de membrana (7);
- c) Actuar como receptor de superficie de membrana para la enzima ADA (7).

Por otro lado, las concentraciones séricas de ADCP pueden servir como indicador de diversas patologías como son falla renal (concentraciones elevadas) y linfomas o úlcera péptica (concentraciones disminuídas) (1).

Se concluye que, para la presencia tisular de ADA se requiere de por lo menos, la expresión de 2 genes:

1. Un gen estructural -constitutivo- que codifica para la proteína ADA, localizado en el cromosoma 20 región 20q12-q13.11 (8) ;
2. Un segundo gen que codifica para la ADCP, localizado en el cromosoma 2 en la región comprendida entre q11-qter (9).

## II. GENETICA DE ADA

La enzima ADA existe en muchas formas físicas diferentes las cuales se explican como resultado de una combinación de polimorfismo alélico y un sistema de isoenzimas generadas por modificaciones post-traduccionales.

El estudio electroforético de ADA de diferentes tejidos muestra diferentes patrones de bandas isoenzimáticas con movilidad anódica:

- A) El patrón electroforético más simple es el designado ADA eritrocitaria que representa la forma citosólica de la enzima; consta de una banda mayor y 2 bandas menores (isoenzimas I,II,III), con las mismas características bioquímicas: Km 35  $\mu$ M, pH óptimo 7.0 y PM similares (30,000-35,000) (10,11). Estudios realizados sobre el patrón electroforético más

simple, han demostrado, por un lado, el polimorfismo alélico del gen de ADA, y han determinado, por otro, la frecuencia de sus variantes en diversas poblaciones conociéndose que los alelos ADA<sup>1</sup> y ADA<sup>2</sup> son los más frecuentes en la población general (10-15).

- B) Los patrones tejido-específico más complejos presentan, además del patrón más simple, una serie de isoenzimas tejido-específicas (15) las cuales muestran diferente reactividad de grupos sulfhidrilos y diversos PM (200,000-440,000) (10).

El gen estructural de ADA, incluye 32 kb y contiene 12 exones separados por 11 intrones (10,16) y presenta, dentro de la región flanqueadora 5' del exón 1, 6 secuencias de decanucleótidos ricas en GC las cuales son altamente homólogas a aquellas identificadas como sitios de unión funcional para el factor de transcripción Sp1, el cual es capaz de activar la unión y transcripción de varios promotores celulares y virales (10,13). Además, el gen de ADA tiene 23 elementos repetitivos de tipo Alu (Diagrama 3). Estas secuencias pueden proporcionar sitios potenciales para eventos de recombinación (13,17,18).

El análisis molecular de genes mutantes de ADA ha permitido identificar los siguientes tipos de mutaciones que causan deficiencia en la actividad específica de ADA:

- 1) Mutaciones puntuales o deleciones que alteran la transcripción ó maduración del ARNm (13,17,18).
- 2) Mutaciones puntuales que alteran la estructura y/o estabilidad de la proteína (posibles defectos postraduccionales) (13,17-19).
- 3) Mutaciones aún no definidas, las cuales causan deficiencia

parcial de ADA y que afectan la estabilidad de la proteína (13,17).

Existen, por otro lado, mutaciones conservativas en las cuales cambia la tercera base de los codones sin alterar los aminoácidos codificados. Estas mutaciones conservativas son útiles en la identificación de variantes alélicas de ADA (13).

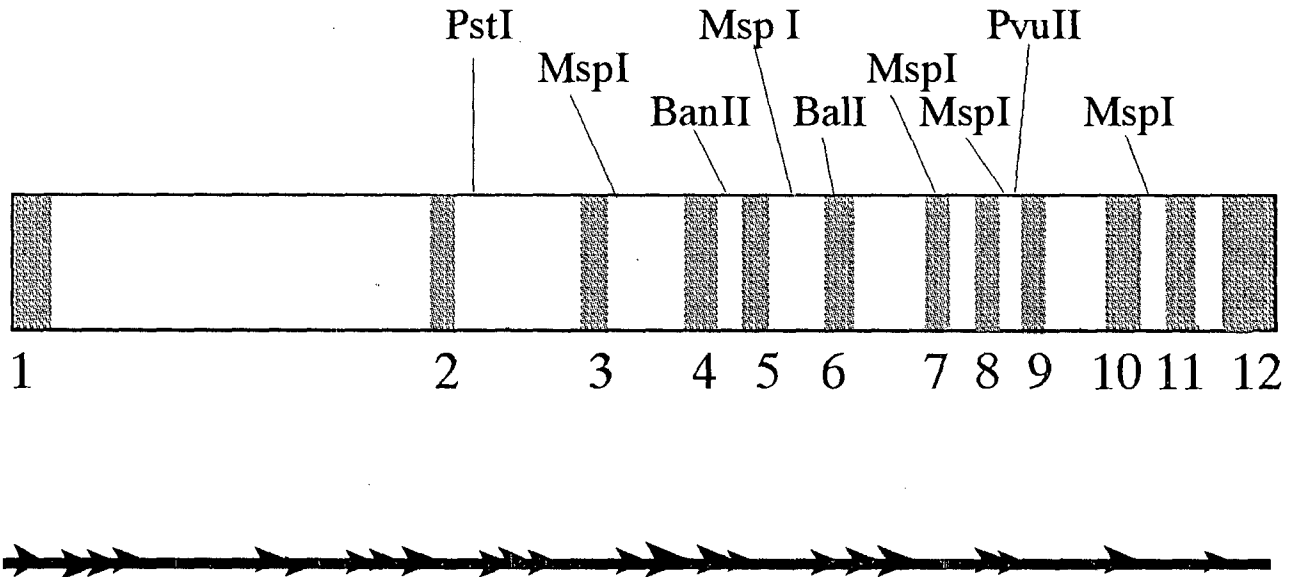
Se han identificado y caracterizado 9 Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs) en el locus de ADA, 5 de los cuales son reconocidos por la misma enzima (MspI), y los restantes por las enzimas BanII, PstI, BalI, y PvuII (Diagrama 3) (19).

### III. TRASTORNOS METABOLICOS GENETICAMENTE DETERMINADOS POR ADA

- A) La deficiencia hereditaria de la enzima ADA causa anomalías en el metabolismo de desoxinucleótidos y de S-Adenosil-homocisteína con toxicidad secundaria para linfocitos y precursores linfoides (20); en consecuencia, la respuesta inmune humoral y celular resulta afectada. Estos desoxinucleótidos (principalmente desoxi-ATP) pueden elevar su concentración de 45 a 100 veces en eritrocitos (21) y hasta 300 veces en orina de estos pacientes (22). A esta enfermedad autosómica recesiva se le denomina "Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa" (SICS) (19-26).
- B) La producción incrementada de ADA eritrocitaria de 45-100 veces los niveles normales reduce las concentraciones de ATP por debajo de lo normal (27-33) y niveles bajos de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BFG) (28); la enzima presenta  $K_m$  por Adenosina y desoxiadenosina normal (27-29) y patrones electroforéticos normales (28-30).



DIAGRAMA 3. Gen de ADA: los exones (área sombreada), los intrones (área clara) y sus sitios polimórficos. En la parte inferior se muestran las posiciones de las secuencias Alu. Ver texto.



Este trastorno autosómico dominante, conocido como Anemia Hemolítica No Esferocítica, cursa con niveles normales de ADA en linfocito y función inmunológica normal (31-33). Actualmente se ha demostrado que la calidad del ARNm correspondiente a esta enzima, así como la secuencia aminoacídica de la proteína son normales (31,32).

Debido a que la viabilidad del eritrocito depende, en gran parte, de concentraciones adecuadas de ATP, la generación disminuída de este nucleótido de purina puede causar la lisis prematura de estas células (10,34).

#### IV. METABOLISMO DE LA ADENOSINA

Es importante destacar el papel que posee la Adenosina (Ado) como regulador metabólico de múltiples procesos celulares. Se ha encontrado, a través de entidades patológicas en las que ADA se encuentra alterada, un desbalance en las concentraciones de los correspondientes intermediarios en metabolismo de purinas, lo que a su vez puede alterar otras vías metabólicas (35).

La Ado puede ser formada tanto extracelular como intracelularmente:

1. Una fuente extracelular (dietética) la cual está dada por la degradación de nucleótidos de purina, principalmente ATP, y ácidos nucleicos de células hematopoyéticas senescentes en la superficie de células endoteliales y de algunos tipos celulares pues poseen actividades de ectonucleotidasa y ectoATPasa capaces de degradar nucleótidos a nucleósidos extracelulares (10,36). Los nucleósidos entran y salen de la célula muy rápidamente por medio de transportadores  $\text{Na}^+$ -dependientes y  $\text{Na}^+$ -independientes localizados en la membrana plasmática; esto da lugar a la salida de inosina y entrada de adenosina contra gradientes de concentración (36).

2. Fuentes intracelulares entre las cuales pueden ser:

- a) Síntesis de novo de purinas
- b) Vía de recuperación de purinas
- c) Vía indirecta a partir de adenina
- d) A partir de la hidrólisis de S-adenosilhomocisteína por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH) (Diagramas 1 y 4) (10,37) .

La adenosina, una vez dentro de la célula, puede seguir 2 vías metabólicas distintas:

- i) Fosforilación de Ado por Adenosina quinasa (AdoC), o bien
- ii) Desaminación de Ado por Adenosina desaminasa (ADA).

Además, aunque existe un transportador  $\text{Na}^+$ -dependiente, específico para adenosina, la inosina extracelular producida por una ecto-adenosina desaminasa puede ser transportada por otros acarreadores  $\text{Na}^+$ -dependientes y  $\text{Na}^+$ -independientes, los cuales también traslocan adenosina (31).

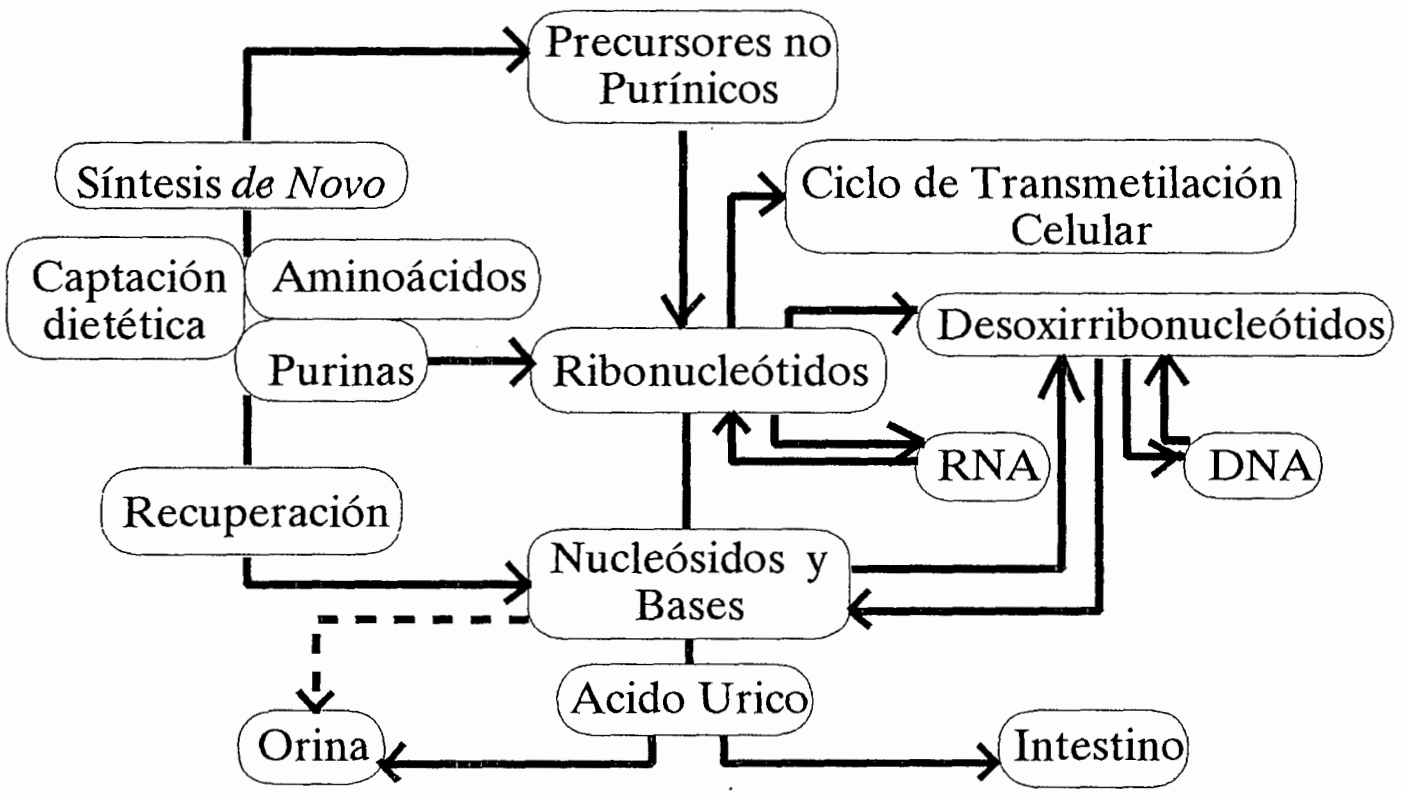
Cuando los niveles de Ado disminuyen hasta un rango de 0.5 a 5  $\mu\text{M}$ , la actividad de AdoC (Km por Ado y dAdo, 0.5-5  $\mu\text{M}$  y 135-540  $\mu\text{M}$  respectivamente) predomina sobre la de ADA (Km por Ado y dAdo, 25-74  $\mu\text{M}$  y 7-40  $\mu\text{M}$  respectivamente); más cuando se elevan las concentraciones de Ado, la AdoC se satura y es susceptible a la inhibición tanto por el sustrato como por el producto (10,37).

La Ado y la dAdo causan toxicidad en células de mamífero en vitro y en sistemas in vivo (21). Los mecanismos de toxicidad son:

- 1) Altas concentraciones de Ado que son capaces de inhibir la síntesis de pirimidinas a nivel de inhibición de Fosforribosilpirofosfato sintetasa (PRPP-S). Esto bloquea la síntesis de novo de nucleótidos de pirimidina a nivel de la conversión de ácido orótico a ácido oritidílico (10,21,35,37).

- 2) Altas concentraciones de dAdo son capaces de inhibir la enzima ribonucleótido reductasa, inhibiendo de esta manera la síntesis de ácidos nucleicos lo que puede, a su vez, producir rotura parcial en la moléculas de ADN. Por otro lado, pueden activar el catabolismo de ATP y producir disminución de los niveles de NAD (10,21) De hecho, este es el mecanismo propuesto para explicar la citotoxicidad de la dAdo como inhibidor de crecimiento de cultivos celulares (17).
  
- 3) Altas concentraciones de dAdo y Ado pueden causar tanto reversión de la reacción de hidrólisis de S-adenosilhomocisteína (S-AdoHcy) como inhibición de la S-adenosilhomocisteína-hidrolasa (SAHH). Esto a su vez produce inhibición de las reacciones de metilación dependientes de S-adenosilmetionina (S-AdoMet) (Diagrama 1) (30,38)
  
- 4) Elevación de los niveles de Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC) producidos por Adenilato ciclasa ante altas concentraciones de Ado (39). Esto conduce a alteraciones en múltiples procesos celulares:
  - ▶ Inhibición en la primera etapa del estallido respiratorio y alteración de metabolismo en neutrófilos (27,30).
  - ▶ Inducción del fragmentación del DNA intranucleosomal por activación de endonucleasas, vía AMPC, en linfocitos T periféricos y timocitos (40).

DIAGRAMA 4: Metabolismo de Purinas en humanos: Vías de Recuperación, Síntesis *de Novo* y Degradación de (desoxi)ribonucleótidos, nucleósidos y bases



## V. ANEMIAS: GENERALIDADES Y CLASIFICACION

Las enfermedades eritrocitarias son tradicionalmente divididas en 2 grupos:

- (1) **ANEMIAS:** Se caracterizan por presentar concentraciones de Hemoglobina (Hb) por debajo de lo normal, lo cual se traduce como un deterioro en la competencia de la sangre para transportar  $O_2$  a los tejidos causando de este modo hipoxia celular (41,42).
- (2) **POLICITEMIAS:** caracterizadas por un incremento considerable de la masa eritrocitaria lo cual incrementa la viscosidad y el volúmen sanguíneo (41,42).

La ANEMIA, uno de los problemas mas comunes en la medicina clínica, no es considerada como una enfermedad primaria sino mas bien como la expresión de un trastorno o enfermedad subyacente (por ej.: insuficiencia renal crónica); es un mecanismo compensatorio para prevenir o disminuir la anoxia tisular destructiva. Este marcador clínico puede ser básico (anemia ferropénica, hemosiderosis pulmonar) o en ocasiones mas complejo (deficiencia de enzimas eritrocitarias, defectos en la síntesis de hemoglobina, etc) (41). Ahora bien, la anemia puede presentarse si:

- (1) la pérdida o destrucción de eritrocitos excede la capacidad maxima de producción medular eritrocitaria o
- (2) la producción de eritrocitos en la medula osea esta alterada (35).

## VI. CLASIFICACION DE LAS ANEMIAS

La anemia puede ser clasificada como:

- A) **Relativa** la cual se caracteriza por que la masa eritrocitaria total es normal, o bien
- B) **Absoluta** que se caracteriza por una disminución en la masa eritrocitaria y que a su vez se clasifica de acuerdo a criterios morfológicos y fisiopatológicos (41,42).

Dentro de la clasificación Morfológica se incluyen 3 categorías (41-43):

- a) A. Macrocítica-normocrómica
- b) A. Normocítica-normocrómica
- c) A. Microcítica-hipocrómica.

Dentro de la clasificación Funcional (41,42) se incluyen, a su vez, 2 subclasificaciones:

- a) Anemia por defectos en la producción, que a su vez pueden deberse a defectos en la proliferación, diferenciación y madurez de los eritrocitos.
- b) Anemia por defectos en la supervivencia.

#### **A) DEFECTOS EN LA PRODUCCION**

**PROLIFERACION:** Se caracterizan por índices anormales o disminuidos de proliferación maduración, y liberación de eritrocitos; esto puede ser causado por:

- ▶ Producción impropia de eritropoyetina: alteración en la diferenciación de precursores eritroides (A. aplásica pura de células rojas, A. por IRC, A. por alteraciones endócrinas).
- ▶ Alteración en la proliferación y diferenciación de precursores en la médula (A. Aplásica, A. Mielodisplásica).
- ▶ Acción de productos químicos, fármacos y radiaciones.
- ▶ Infiltración en la médula ósea de tejido linfóide, granulomatoso o neoplásico.

**MADURACION:** Estos defectos están dados por la alteración en la síntesis de ácidos nucleicos (eritrocitos macrocíticos) o en la síntesis de globinas (eritrocitos microcíticos) produciendo células cualitativamente anormales.

#### **1) Defectos en síntesis de Hb (Anemia hipocrómica) por:**

- ▶ suministro limitado de hierro (deficiencia alimenticia),
- ▶ uso defectivo del hierro (atransferrinemia, hemosiderosis pulmonar idiopática)

► síntesis nula o escasa de globina o porfirina (talasemias).

2) **Defectos a nivel nuclear:** pueden afectar a todas o varias líneas celulares hematopoyéticas. Se puede producir, como consecuencia, pancitopenia en sangre periférica con cambios morfológicos que, cuando son generalizados, producen trastornos Megaloblásticos. La megaloblastosis eritroide incluye:

- eritroblastos grandes con núcleos grandes y cromatina difusa
- asincronía nuclear/citoplásmica con producción progresiva de Hb pero madurez nuclear retrasada
- eritrocitos macrocíticos con valores normales de Hb.

#### B) DEFECTOS DE SUPERVIVENCIA

Son resultado de la pérdida prematura de eritrocitos circulantes por hemorragia o hemólisis. Las causas son muy variadas:

##### 1. Anormalidades intrínsecas:

- a) Defectos de membrana, por alteración de sus proteínas estructurales (espectrina, anquirina)
  - b) Deficiencias enzimáticas, que a su vez pueden ser de 3 tipos:
    - defectos que causan disfunción clínicamente significativa del eritrocito (Aldolasa, Enolasa, ADA);
    - defectos diagnosticables en eritrocito pero cuyas manifestaciones son ejercidas en otros tejidos (Transcetolasa, UDPG-galactosa 4-epimerasa) y
    - defectos que no producen desorden clínico alguno, en las cuales la asociación entre el defecto enzimático y el estado clínico es incierta (Adenilato quinasa, AMP desaminasa, Fosfoglucomutasa)
- (43).

2. **Anormalidades extrínsecas:** Dadas por factores mecánicos, químicos, físicos, infecciones, mediados por anticuerpos, hiperactividad del sistema monocito-macrófago o bien, por pérdida sanguínea (42).



---

*ANTECEDENTES*

## A N T E C E D E N T E S

## ADENOSINA DESAMINASA Y ANEMIAS

Desde 1977 se han reportado casos de familias o bien de individuos que presentan el Síndrome de Anemia Hemolítica no Esferocítica. Estos pacientes cursan, como se mencionó anteriormente, con niveles elevados de ADA desde 40 hasta 100 veces los niveles normales (27-33). Como parte de sus síntomas clínicos, pueden presentar esplenomegalia y reticulocitosis considerable (hasta del 22%) e incluso, en un caso reportado, con estomatocitos y equinocitos (28).

A nivel bioquímico, las principales características de este síndrome son: bajas concentraciones de ATP, de lactato, de 2,3-BFG y degradación anormalmente elevada de AMP, siendo lo primero de mayor importancia como posible explicación en el mecanismo de hemólisis (28,29).

La enzima, por otro lado, presenta Km por Ado y dAdo normal, actividad específica, termoestabilidad, y Ki por EHNA ([eritro-9-hidroxi-3-nonil]-adenina) similares a las de los individuos normales (31,32). Posteriormente se ha demostrado que la secuencia del gen estructural de ADA, la secuencia de su ARNm (transcrito primario y ARN maduro) y secuencia de aminoácidos son normales (27,28).

En cuanto a anemias no Hemolíticas, la información existente sobre la enzima ADA en este tipo de padecimientos se relaciona con trastornos proliferativos como es el caso de la Anemia Hipoplásica Congénita, conocida como Síndrome de Diamond-Blackfan (SDB), la cual se presenta como anemia macrocítica hipoplásica en el primer año de vida, asociada a una anomalía bioquímica en el metabolismo de purinas. En comparación con otros trastornos hematológicos como anemia de Fanconi, Anemia aplásica pura

adquirida, Anemia aplásica adquirida, eritroblastopenia transitoria infantil, el Síndrome de Diamond-Blackfan demostró tener niveles más altos de la enzima (45). En base a lo anterior y a estudios posteriores, se ha sugerido que la actividad de ADA puede ser un reflejo bioquímico de alguna perturbación en la eritropoiesis normal. Sin embargo, como esta perturbación es expresada en casi todos los pacientes con SDB, esta anormalidad enzimática puede reflejar el defecto de diferenciación del tronco de células eritroides responsable para esta enfermedad, si bien no es parámetro exclusivo para este síndrome (46).

Un incremento en la actividad de la enzima también ha sido relacionado con anemia primaria sideroblástica adquirida en un hombre de 85 años, japonés, el cual presentaba sideroblastos anillados y una deleción cromosómica (46XY, 11q-). Aunque el paciente mostró tener una actividad enzimática incrementada de 17 veces los niveles normales, atribuido esto a una acumulación masiva de proteína normal, esto no fue suficiente para causar hemólisis; la concentración de nucleótidos de purina era normal (47).

Existen también otros trastornos hemotológicos, en casos aislados, también asociados con actividades elevadas de ADA como son el Síndrome mielodisplásico en cuyo caso presentó elevación de ADA de hasta 8 veces los niveles normales (48).

Estudios recientes en anémicos de población seleccionada derechohabiente del IMSS en Guadalajara, Jalisco, han mostrado que la actividad específica de ADA es dependiente de la edad. No obstante, dicha actividad se muestra como un indicador sensible de disfunción metabólica, su alteración en la actividad específica de

ADA tiene, en algunos, componente genético (S.Down) y en otros parece ser efecto de un proceso adquirido (49).

Por otro lado, también se ha encontrado asociación entre ADA elevada y personas infectadas con el retrovirus de HIV. Dado que el gen de ADA presenta regiones promotoras Sp1, similares a los promotores virales, una infección viral podría causar niveles inapropiados de ADA (50).

*PLANTEAMIENTO  
DEL PROBLEMA*

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No existe un estudio que relacione la morfología celular eritrocitaria y un perfil hematológico completo con niveles de ATP, ADP y AMP y la actividad específica de ADA en diferentes tipos de anemias cuya etiología es diferente a las ya estudiadas, como son algunos tipos de anemia (Síndrome de Diamond-Blackfan, A. de Fanconi, A. Sideroblástica Adquirida, Eritroblastopenia infantil, Síndrome Mielodisplásico) en los que la elevación de ADA no es la causa primaria aparente del trastorno y en los cuales existe asociación entre los niveles moderadamente elevados de ADA y la presencia de enfermedad.

---

*HIPOTESIS*

## H I P O T E S I S

En individuos con anemia y elevación moderada de la enzima ADA, los niveles de ATP, ADP y AMP se encuentran lo suficientemente alterados para producir anormalidades morfológicas en el eritrocito.



---

*OBJETIVOS*

### O B J E T I V O S

1. Identificar pacientes con anemia y niveles elevados de ADA en eritrocito.
2. Descartar que la elevación de ADA sea debida a una proteína electroforéticamente anormal.
3. Obtener los valores, de las concentraciones eritrocitarias de nucleótidos de purina (ATP, ADP y AMP) en controles y pacientes anémicos respectivamente.
4. Identificar las alteraciones morfológicas más comunes en los eritrocitos de estos pacientes.

*MATERIAL  
Y  
METODOS*

---

## M A T E R I A L

### MATERIAL BIOLÓGICO

Se obtuvieron 112 muestras de sangre total con EDTA provenientes del Hospital de Pediatría, Centro Médico de Occidente, I.M.S.S., las cuales fueron clasificadas en dos grupos de acuerdo a parámetros hematológicos en:

I) **CONTROLES:** 30 muestras de controles cuyas edades estaban comprendidas entre los 0.5 a los 18 años de edad, clasificadas en los siguientes subgrupos:

- 0 a 2 años,
- 3 a 6 años,
- 7 a 12 años,
- 13 a 18 años.

II) **PACIENTES:** 82 muestras de pacientes dentro de los mismos subgrupos de edades que cursaban con anemias de diferente etiología:

- \* 32 con insuficiencia renal crónica
- \* 10 con anemia en estudio (etiología desconocida)
- \* 30 con anemia por etiología diversa (por infección bacteriana, viral; anomalías en sistemas circulatorio-pulmonar)
- \* 5 con anemia por trastornos proliferativos (síndromes mieloproliferativos)
- \* 5 con anemia asociada a leucemia (LLA).

### EQUIPO DE LABORATORIO

- Espectrofotómetro Spectronic D21 con baño adicional de temperatura regulable.
- Equipo de electroforésis
- Centrífuga
- lámpara manual de luz UV de onda larga
- estufa de incubación a 37 C.
- Analizador hematológico electrónico.
- Microscopio de luz visible.

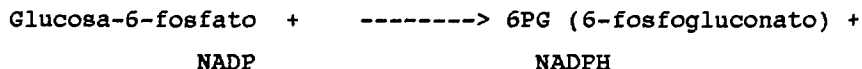
M E T O D O S

## CUANTIFICACION DE NUCLEOTIDOS DE PURINA (51)

## I. A T P

A) PRINCIPIO: El ATP fosforila glucosa en la reacción de Hexoquinasa (Hx):  
 Glucosa + ATP -----> Glucosa-6-fosfato + ADP

La glucosa-6-fosfato formada es medida en la reacción de G6PD (Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa):



El cambio en densidad óptica a 340 nm, resultado de la reducción de NADP a NADPH, es cuantificado y, en la presencia de un exceso de glucosa, representa la cantidad de ATP en la mezcla de reacción.

PROCEDIMIENTO: La estimación puede ser efectuada en extractos preparados de sangre total puesto que casi todo el ATP sanguíneo esta presente en eritrocitos.

## B) OBTENCION DE EXTRACTOS

Los extractos se preparan como sigue:

1. Por cada volumen de sangre total (mínimo 1 ml.) se utiliza 0.5 volúmenes de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) al 20 % frío; se adiciona éste último en la muestra lentamente conforme se va agitando hasta lograr una mezcla homogénea color café.
2. Se procede a centrifugar a 3,400 rpm durante 30' en frío.
3. Se retira el sobrenadante, el cual deberá ser totalmente transparente, se cuantifica cuidadosamente y se coloca en un tubo de vidrio graduado.
4. Se le añaden 50 µl de anaranjado de metilo, como indicador y se procede a la neutralización con carbonato de potasio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

3 M hasta que la muestra vire hacia un color amarillo claro. Una vez hecho esto, el extracto puede ser almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Este mismo extracto puede ser utilizado para la cuantificación de ADP y AMP.

### C) HEMOGLOBINA EN SANGRE TOTAL

La cuantificación del contenido de Hemoglobina se realiza en sangre total por el método de Drabkin (g%).

### D) ESQUEMA GENERAL DEL SISTEMA DE REACCION.

	<u>PROBLEMA (<math>\mu\text{l}</math>)</u>	<u>BLANCO (<math>\mu\text{l}</math>)</u>
Buffer Tris-HCl 1 M, EDTA 5 mM, pH 8.0 .....	100	100
MgCl <sub>2</sub> 100 mM .....	20	20
NADP 2 mM.....	200	200
Glucosa 20 mM.....	50	50
Extracto PCA .....	200	----
H <sub>2</sub> O destilada.....	415	615
G6PD 60 u/ml. (diluída en $\beta$ -mercaptoetanol 0.7mM, EDTA 0.27 M neutralizado).....	5	5
Lectura basal a 340 nm a 37° C		
Hexoquinasa 400 u/ml .....	10	10
Leer D.O. hasta alcanzar valores constantes		

E) CALCULOS: La concentración de ATP como nmoles / gHb =

$$[\text{ATP}] (\text{nmol/gHb}) = \frac{(\text{D.O. Problema}) 0.313}{(\text{D.O.}_{540} \text{Problema}) \text{FHb}}$$

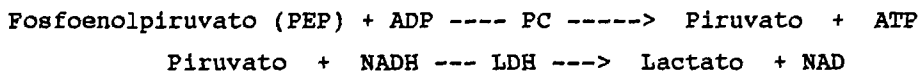
en donde:

D.O. = cambio en la densidad optica a 340 nm después de adicionar Hx

- D.O.540 = densidad óptica a 540 nm cuando 0.005 ml. de sangre total son adicionados a 2.5 ml de reactivo de Drabkin
- 0.313 = factor obtenido del coeficiente de extinción molar del NADPH, la dilución del extracto en la cuveta, la conversión de Hb de g/100 a g/ml y de la dilución de la muestra original.
- F Hb = factor obtenido a partir de una curva de calibración para Hb y es igual a 0.142857.

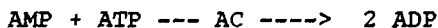
## II. ADP Y AMP

A) PRINCIPIO: El ADP es cuantificado en un extracto de ác. perclórico de eritrocito a través de la reacción:



La cantidad de piruvato formado sostiene una relación estequiométrica para la cantidad de ADP disponible y aquí, la oxidación de NADH a NAD medida a 340 nm corresponde a la cantidad de ADP en el filtrado.

La adición de Adenilato quinasa (AC) convierte AMP a ADP en la reacción:



El ADP formado se integra a la reacción de PC y puede ser medido a través de la oxidación de NADH a NAD a una D.O. de 340 nm.

## B) ESQUEMA GENERAL DEL SISTEMA DE REACCION

	<u>BLANCO (<math>\mu</math>l)</u>	<u>PROBLEMA</u>
<u>(<math>\mu</math>l)</u>		
Tris HCl 1M, EDTA 5 mM, pH 8.0 .....	50	50
MgCl <sub>2</sub> 0.1 M .....	20	20
Extracto PCA .....	--	700

		31
H <sub>2</sub> O .....	705	5
PEP 15 mM .....	50	50
NADH 2 mM .....	100	100
Lactato deshidrogenasa (LDH) 240 u/ml .....	50	50
ATP neutralizado, 20 mM .....	5	5
Leer D.O. a 340 nm		
Piruvato quinasa (PC) 140 u/ml .....	10	10
Leer D.O. a 340 nm hasta alcanzar valores constantes		
Adenilato quinasa (AC) 725 u/ml .....	10	10

**C) CALCULOS**

El decremento en D.O. después de la adición de PC representa la oxidación de 1 mol de NADH por cada mol de ADP en el sistema. Por otro lado, el decremento en la D.O. después de la adición de AC representa la oxidación de 2 moles de NADH por cada mol de AMP. Tenemos así que:

$$[ADP] \text{ (nmol/gHb)} = \frac{(D.O. \text{ problema}) 0.0896}{(D.O._{540} \text{ problema}) F H b}$$

$$[AMP] \text{ (nmol/gHb)} = \frac{(D.O. \text{ Problema}) 0.0447}{(D.O._{540} \text{ Problema}) F H b}$$

Donde:

D.O. = cambio en la D.O. a 340 nm. después de la adición de PK y AC respectivamente.

F Hb = Factor de Hb (obtenido a partir de curva de calibración, donde F Hb = 0.142857.

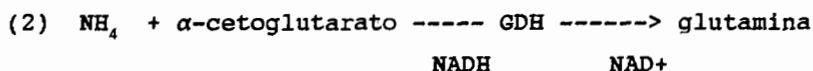
D.O.<sub>540</sub> = Densidad óptica obtenida cuando 0.005 ml. de sangre total son adicionados a 2.5 ml. de reactivo de Drabkin.



0.0896 y 0.0447 = factores respectivos (ADP y AMP) obtenidos del coeficiente de extinción del NADH , dilución del filtrado en la cuveta, dilución de la sangre para determinaciones de Hb, conversión de Hb de g/100 a g/ml. y de la dilución de la muestra original, donde se asume que el contenido de agua de la sangre es del 80 %.

### III. ELECTROFORESIS DE ADENOSINA DESAMINASA EN GEL DE ALMIDON

A) PRINCIPIO: Adenosina desaminasa cataliza la desaminación de adenosina para producir inosina y amonio de tal forma que se cumple la reacción:



Así, el amonio liberado en la reacción (1) reacciona con el  $\alpha$ -cetoglutarat produciendo glutamina (reacción de transaminación); ésta última se realiza por la enzima glutamato deshidrogenasa. Durante la reacción, el NADH utilizado por la enzima se oxida a su forma NAD+, observándose bandas oscuras donde ello ocurra.

#### B) PROCEDIMIENTO:

##### 1. PREPARACION DEL GEL

El gel es de almidón hidrolizado al 12-13 % el cual se disuelve en buffer fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.01 M, pH 6.5, y se calienta a fuego lento hasta ebullición 3 veces. Se retira del fuego y se vacía sobre una placa de 21.0 x 11.0 x 0.6 cm. y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Una vez listo el gel, se procede a hacerle unos pequeños cortes a manera de pozos aproximadamente a 6 cm. de un extremo del gel y conservando una distancia entre un pozo y otro de aprox. 0.8 a 1.0 cm. En este lugar se procederá a aplicar la muestra.

## 2. PREPARACION DE LOS HEMOLISADOS

Partiendo de sangre total se retira la capa de leucocitos y el plasma; se hacen lavados de los eritrocitos 3 veces con solución salina fisiológica y centrifugación a 2,500 rmp, cuidando eliminar todos los leucocitos remanentes. Después del tercer lavado, se retira el sobrenadante y se deja sólo el paquete celular al cual se somete a cambios bruscos de temperatura (hielo seco-acetona y agua caliente) para provocar la lisis del eritrocito. Es importante señalar que las muestras, una vez hemolisadas, deberán procesarse dentro de las 2-3 horas siguientes.

## 3. CORRIMIENTO ELECTROFORETICO

Las condiciones del corrimiento se basaron en el método descrito por Herbscheleb-Voogt (6).

## 4. SISTEMA DE REVELADO

El principio se explicó anteriormente. Para ello se utilizó el siguiente sistema de revelado:

Buffer fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

0.1 M, pH 6.5 .....	10.0 ml
Adenosina .....	6.0 g.
$\alpha$ -cetoglutaratato 30 mM (neutralizado).....	0.4 ml
NADH / $\text{NaHCO}_3$ (15 mg / 10 mg) / ml .....	0.4 ml
Glutamato Deshidrogenasa (12.5 mg/ml) .....	0.2 ml
Agarosa 2% .....	10.0 ml

## 5. PROCEDIMIENTO DE REVELADO

Una vez terminado el corrimiento, se hace un corte horizontal a la placa electroforada, se separan las 2 partes, y sobre la sección inferior se vierte el sistema de reacción, se coloca en una cámara húmeda y se incuba a 37° C durante 60 minutos.

## 6. INTERPRETACION

Las isoenzimas de ADA eritrocitaria aparecen como bancas opacas sobre un fondo fluorescente cuando se observa la placa bajo luz UV de onda larga.

## IV. CUANTIFICACION DE ADENOSINA DESAMINASA ERITROCITARIA

### A) PRINCIPIO

Al considerar que la adenosina presenta una absorción molar máxima a una longitud de onda de 265 nm, el método espectrofotométrico se basa en la cuantificación de la disminución en la densidad óptica (DO) a 265 nm de un sistema de reacción a 37° C por unidad de tiempo, que representa el consumo de adenosina al ser desaminada a inosina y amonio por ADA:



### B) CUANTIFICACION DE ADA EN ERITROCITO

1. **Obtención de eritrocitos:** Se lava tres veces con solución salina fisiológica 1.0 ml de sangre total, eliminando leucocitos y plaquetas, y dejando al final un paquete de eritrocitos.
2. **Preparación del hemolisado:** El hemolisado deberá ir en una dilución 1:20 para lo cual se diluyen 50  $\mu$ l de paquete de eritrocitos en 950  $\mu$ l de solución estabilizadora (EDTA 0.27 M neutralizado,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.7 mM). La dilución se congela y descongela tres veces en baño de hielo seco-acetona.
3. **Cuantificación de Hemoglobina (Hb):** Se procedió a su cuantificación en el hemolisado 1:20 por el método de Drabkin (g %).

## C) ESQUEMA GENERAL DE LA REACCION

	<u>BLANCO(<math>\mu</math>l)</u>	<u>PROBLEMA(<math>\mu</math>l)</u>
Buffer Tris-HCl 1 M,		
EDTA 5 mM, pH 8.0 .....	200	200
Hemolisado 1:20 .....	40	40
Agua destilada .....	1,720	1,720
Pre-incubación durante 10 min/ 37° C		
Adenosina 4 mM .....	40	40
Medir decremento en DO a 265 nm a 37°C cada 5 minutos durante media hora.		

## D) CALCULOS: ACTIVIDAD ESPECÍFICA (AE) COMO UI/ G Hb =

$$ADA (UI/gHb) = \frac{(D.O._{265} Problema - D.O. blanco) \times 100 \times 2}{(8.1 \times Hb (g\%) \times 0.04)}$$

Donde:

DO/min. = cambio en DO por minuto de la parte más lineal en la reacción enzimática

2 = volumen final en ml del SR

0.04 = volumen del hemolisado 1:20 en el SR

8.1 = Coeficiente de extinción molar de una solución 1 mM de adenosina, a 265 nm.

Hb(g%) = D.O. 540 nm problema x Fhb = 0.142857

## V. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Con los valores obtenidos de la Actividad Específica (AE) de ADA, concentraciones de nucleótidos de purina y morfología eritrocitaria, así como la etiología de la anemia de los individuos afectados, se formó una base de datos los cuales fueron procesados de acuerdo al programa EPI-INFO; según la distribución de las muestras, la homogeneidad de la varianza y las diferencias entre los cuadrados de las medias con respecto a la media para cada grupo se utilizaron la prueba estadística no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis), la Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan y la Prueba de Newman-Keuls para comparación de medias de tratamientos independientes con muestras pequeñas.

---

*RESULTADOS*

## R E S U L T A D O S

Se analizaron 82 muestras de sangre periférica de pacientes anémicos y 30 muestras de controles no anémicos procedentes del Hospital de Pediatría, IMSS, CMO.

Los resultados(\*) se muestran en los siguientes apartados:

- I. Resultados de los valores hematológicos, la AE de ADA y concentración de nucleótidos de purina en eritrocitos de pacientes en grupos por edades.
- II. Resultados de los valores hematológicos, la AE de ADA y concentración de nucleótidos de purina en eritrocitos de pacientes por etiología.
- III. Resultados de los valores hematológicos, la AE de ADA y concentración de nucleótidos de purina en eritrocitos de pacientes por morfología.
- IV. Resultados de los fenotipos electroforéticos.

(\*) En las gráficas se presentan los valores promedio para las variables en cada caso especificadas; en tablas se muestran los valores de la media ( $\bar{x}$ ) y desviación estándar ( $s$ ) señalando los niveles de significancia para cada caso.

- I. En la FIGURA 1 y TABLA 1 se muestra que la AE de ADA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre testigos y grupos por edades de pacientes (análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis); al hacer la comparación de medias entre grupos de controles (Pruebas de Duncan y Newman-Keuls) hubo diferencias significativas entre los 0-2

años vs. los 13-18 años ( $p < 0.05$ ) hecho que no sucedió entre grupos de pacientes por edades. Con respecto a las concentraciones de nucleótidos de purina en grupos por edades, se puede apreciar que la concentración de ATP eritrocitario (FIG 2, TABLA 2) no mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar cada grupo con su respectivo control, ni al comparar los grupos entre sí. En la FIGURA 3 y TABLA 3 puede apreciarse que no hubo diferencias significativas de la concentración de ADP eritrocitario entre controles vs anémicos, ni al hacer las comparaciones entre grupos. En la FIGURA 4 y TABLA 4 se muestra que las diferencias en la concentración de AMP eritrocitario no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los casos. Los valores hematológicos considerados en grupos por edades se presentan en la TABLA 5; se observa, como era esperado, que la diferencia es significativa entre grupos de pacientes y sus respectivos controles a excepción del VCM para el cual no hubo diferencias significativas. Los valores hematológicos considerados fueron concentración eritrocitaria ( $RBC = 1 \times 10^6$  células por  $mm^3$ ), concentración de Hemoglobina ( $HB = g / dl$ ), Hematocrito ( $HT = \%$ ) y Volúmen Corpuscular Medio ( $VCM = fl$ ).

II. En la FIGURA 5 Y TABLA 6 se muestran los valores de AE de ADA por grupos según la etiología de la anemia entre los cuales no hubo diferencias significativas con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y  $p < 0.05$ ; al aplicar las



Pruebas de Duncan y de Newman-Keuls para comparar medias entre grupos, las diferencias fueron significativas entre el grupo de aquellos pacientes cuya anemia esta asociada a leucemia y el resto de los grupos (otras etiologías y controles); los pacientes con anemia en estudio mostraron, asimismo diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

En las TABLAS 7, 8 y 9, y en las FIGURAS 6, 7 Y 8 se muestran las concentraciones de nucleótidos por etiología de la anemia. Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis para comparación entre grupos, los eritrocitos de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) presentaron una ligera elevación tanto de ATP como de ADP aunque este hecho no fue significativo. La concentración de ADP, asimismo, se mostró significativamente elevada en pacientes anémicos con relación a los testigos para todos los grupos por etiología excepto para los casos de anemia en estudio. El AMP no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos por etiología.

Los valores hematológicos de los pacientes por etiología se muestran en la TABLA 10. Considerando las variables hematológicas estudiadas, las diferencias significativas para RBC fueron entre los controles vs. los demás grupos, excepto controles vs. anemias de diversa etiología; también, entre anemias en estudio vs. IRC y vs. asociadas a trastornos proliferativos ( $p < 0.05$ ); entre los pertenecientes a anemias de diversa etiología vs. el resto de los grupos excepto vs. en estudio; asimismo, hubo diferencias significativas entre anemias por

trastornos proliferativos vs. anemias asociadas a leucemias. La HB mostró ser significativamente diferente al comparar, mediante las Pruebas de Duncan y de Newman-Keuls, al grupo control vs. los demás grupos; además, hubo diferencias significativas tanto entre leucémicos vs. IRC y vs. asociadas a trastornos proliferativos y entre los pacientes con IRC vs. en estudio y vs. diferente etiología; cabe señalar también que los pacientes con IRC presentaron menor concentración de RBC, HB y menor % de HT (TABLA 10). El HT presentó diferencias entre controles vs. el resto de los grupos solamente mas no así entre los grupos de pacientes entre sí. Finalmente, para VCM, el único grupo que presentó diferencias vs. el resto de los grupos fue el de los pacientes con anemia en estudio.

III. El promedio de la AE de ADA por Alteración Morfológica (AM) se muestra en la FIG 9 y TABLA 11; con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y  $p < 0.05$ , no hubo diferencias significativas para ningún grupo. El ATP tampoco mostró diferencias significativas para cada grupo por morfología tanto entre testigos vs. anémicos con AM (p(1)), entre testigos vs. anémicos sin AM (p(2)) (FIG 10, TABLA 12), ni entre anémicos con AM vs. anémicos sin AM (p(3)). Por su parte, el ADP no mostró diferencias significativas para ninguno de los grupos entre controles vs. anémicos con AM, entre controles vs. anémicos sin AM (FIG 11, TABLA 13), ni entre anémicos con AM vs. anémicos sin AM. El mismo caso fue

para el AMP el cual no mostró diferencias significativas entre cada grupo con respecto a su control ni entre anémicos con AM vs. anémicos sin AM (FIG 12, TABLA 14). Los valores hematológicos para pacientes con / sin alteración morfológica (AM) se muestran en las TABLAS 15A y 15B en donde se indican las diferencias entre cada grupo de pacientes por morfología y sus respectivos controles (p(1)).

IV. Los fenotipos electroforéticos obtenidos de eritrocitos de pacientes fueron:

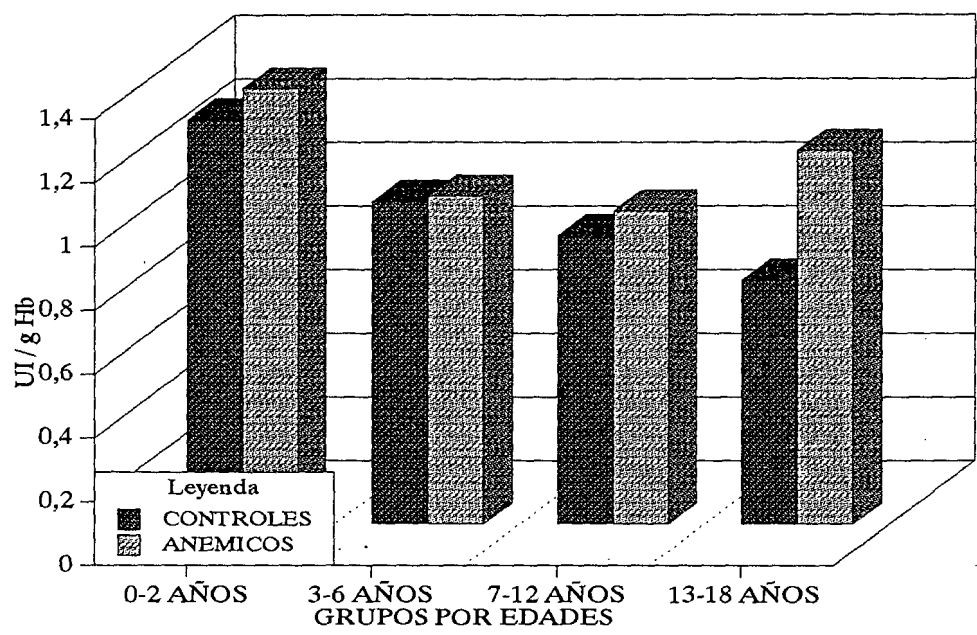
ADA 1 (92.8 %), ADA 2 (4.3 %) y ADA 1-2 (2.9 %) los cuales exhibieron un patrón de corrimiento correspondiente al patrón mas simple (el eritrocitario) sin mostrar alteración en su movilidad.

*GRAFICAS*  
*Y*  
*TABLAS*

---

# FIGURA 1

## AE de ADA Eritrocitaria en Pacientes Anémicos por Edades

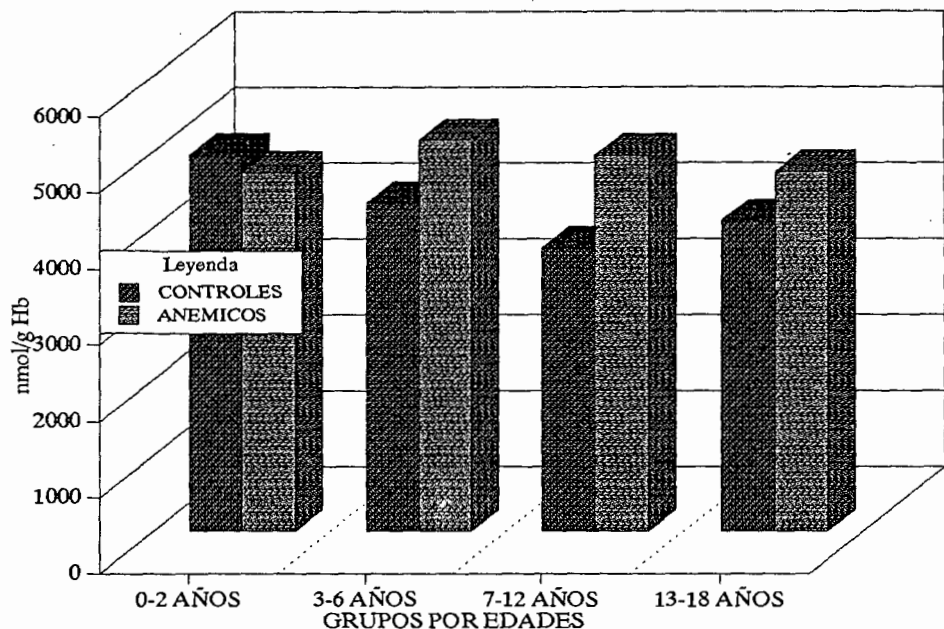


# TABLA 1

## Actividad Específica de ADA Eritrocitaria en Pacientes Anémicos por Edades

CONTROL	0-2 AÑOS	3-6 AÑOS	7-12 AÑOS	13-18 AÑOS
x	1,269	1,012	0,905	0,765
s	0,378	0,234	0,264	0,231
n	2	10	12	6
<b>ANEMICOS</b>				
x	1,387	1,029	0,981	1,171
s	0,712	0,317	0,41	0,88
n	18	18	23	23
p	NS	NS	NS	NS

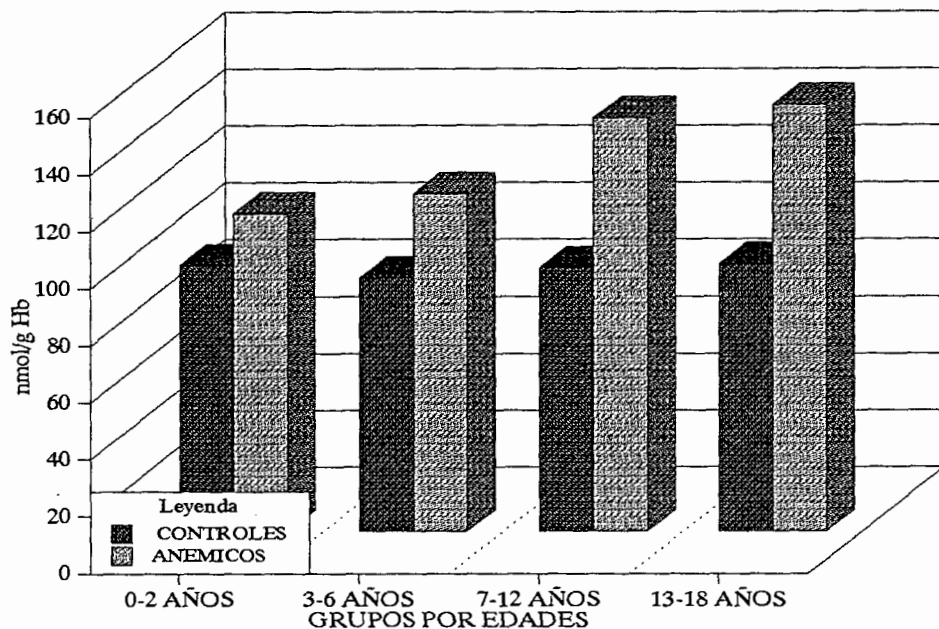
**FIGURA 2**  
**[ATP] Eritrocitario en Pacientes**  
**Anémicos por Edades**



**TABLA 2**  
**Concentración de ATP Eritrocitario en**  
**Pacientes Anémicos por Edades**

CONTROL	0-2 AÑOS	3-6 AÑOS	7-12 AÑOS	13-18 AÑOS
x	4949,5	4316,6	3723,8	4078,8
s	2075,4	830,4	1583	1614,6
n	2	10	12	6
<b>ANEMICOS</b>				
x	4717,7	5143,8	4943	4722,8
s	1705,4	2126,6	1213,8	1570,9
n	18	18	23	23
p	NS	NS	NS	NS

**FIGURA 3**  
**[ADP] Eritrocitario en Pacientes**  
**Anémicos por Edades**



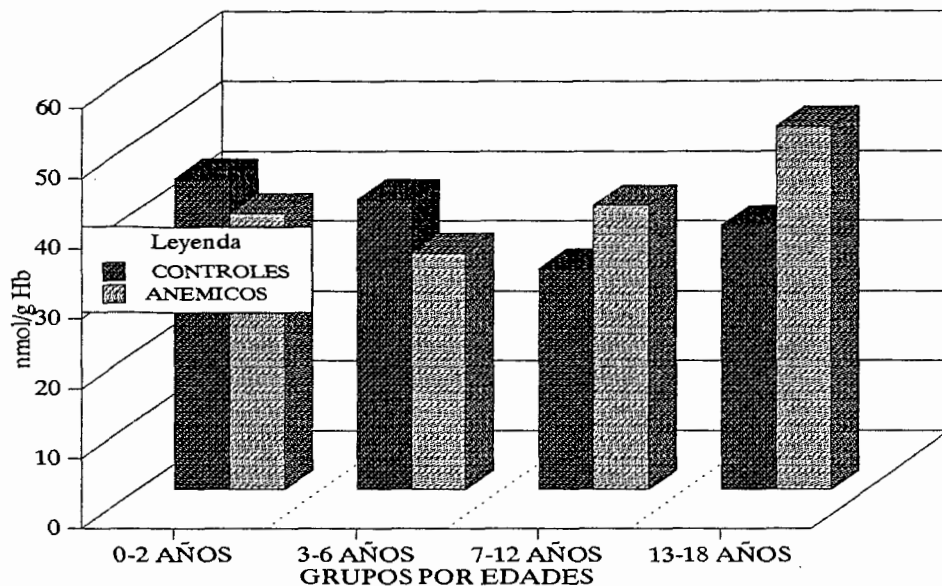
**TABLA 3**

**Concentración de ADP Eritrocitario en**  
**Pacientes Anémicos por Edades**

CONTROL	0-2 AÑOS	3-6 AÑOS	7-12 AÑOS	13-18 AÑOS
x	93,5	89,1	92,5	94
s	27,6	20,7	40,3	30,3
n	2	10	12	6
<b>ANEMICO</b>				
x	111,5	118,5	145,1	149,8
s	58,3	56,3	57,8	66,2
n	18	18	23	23
p	NS	NS	NS	NS

## FIGURA 4

### [AMP] Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Edades



**TABLA 4**  
Concentración de AMP Eritrocitario en  
Pacientes Anémicos por Edades

CONTROL	0-2 AÑOS	3-6 AÑOS	7-12 AÑOS	13-18 AÑOS
x	44,5	41,5	31,6	37,8
s	13,4	11,4	13,8	14
n	2	10	12	6
<b>ANEMICO</b>				
x	39,5	33,9	40,7	51,3
s	17,7	16,1	18,1	25,7
n	18	18	23	23
p	NS	NS	NS	NS



# TABLA 5

## Valores Hematológicos de Pacientes por Grupos de Edades

		C	P	C	P	C	P	C	P
EDAD		0-2	0-2	3-6	3-6	7-12	7-12 a	13-18	13-18
RBC	x	5,32	4,18	4,59	3,6	4,81	2,89	4,87	2,62
	ds	0,06	0,75	0,42	0,75	0,41	0,83	0,39	0,91
	n	2	18	10	18	12	23	6	23
p(1)			p<0.05		NS		p<0.05		p<0.05
HB	x	14,9	11,17	13,08	9,737	14,09	8,58	13,93	7,83
	ds	0,14	1,83	1,04	2,22	1,2	2,98	1,85	2,36
	n	2	18	10	18	12	23	6	23
p(1)			p<0.05		p<0.05		p<0.05		p<0.05
HT	x	43,75	30,06	39,17	31,54	40,86	25,08	41,22	23,35
	ds	1,77	5,38	2,48	6,18	3,81	9,3	3,98	6,9
	n	2	18	10	18	12	23	6	23
p(1)			p<0.05		NS		p<0.05		p<0.05
VCM	x	84,2	75,56	83,31	79,42	84,81	83,98	85	86,25
	ds	0,42	9	3,73	7,79	3,65	11,65	2,89	7,8
	n	2	18	10	18	12	23	6	23
p(1)			NS		NS		NS		NS

p(1) = pacientes vs. controles respectivos

FIGURA 5

AE de ADA eritrocitaria en Pacientes  
Anémicos por Etiología

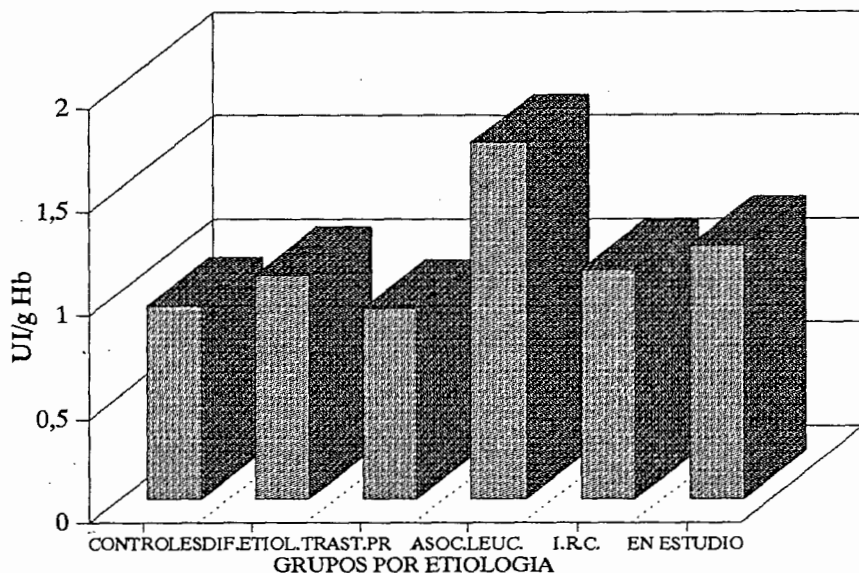


TABLA 6

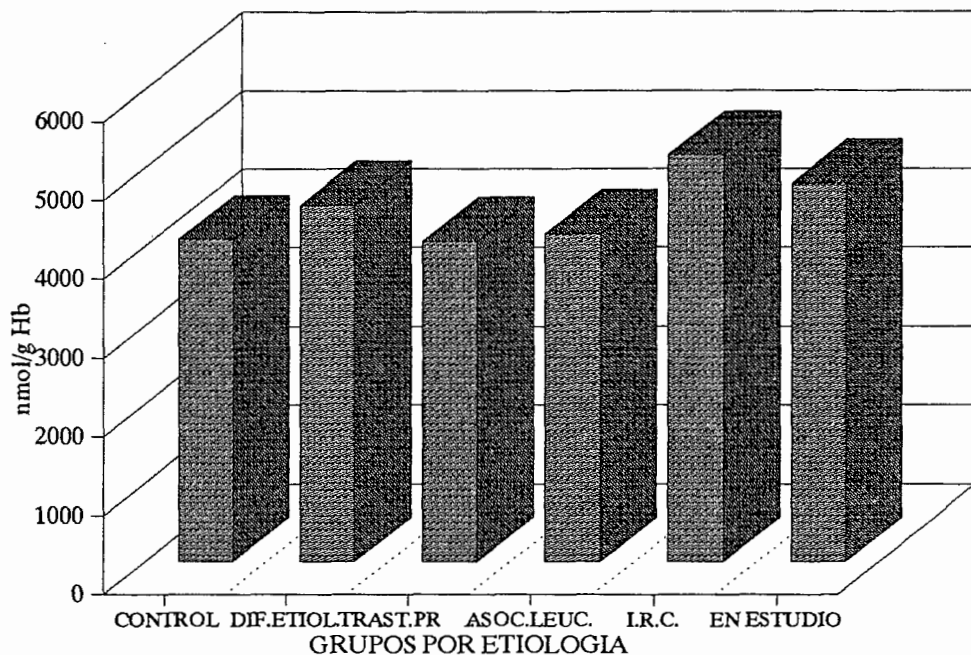
Actividad Específica de ADA Eritrocitaria en  
Pacientes Anémicos por Etiología

ADA	CONTROL	DIF. ETIOL.	TRAST. PR.	ASOC. LEUC.	I.R.C.	EN ESTUDI
x	0,932	1,081	0,92	1,72	1,107	1,223
s	0,281	0,558	0,12	1,359	0,589	0,553
n	30	30	5	5	32	10
p		NS	NS	P<0.05	NS	p<0.05

(\*) con tratamiento

## FIGURA 6

### [ATP] Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Etiología



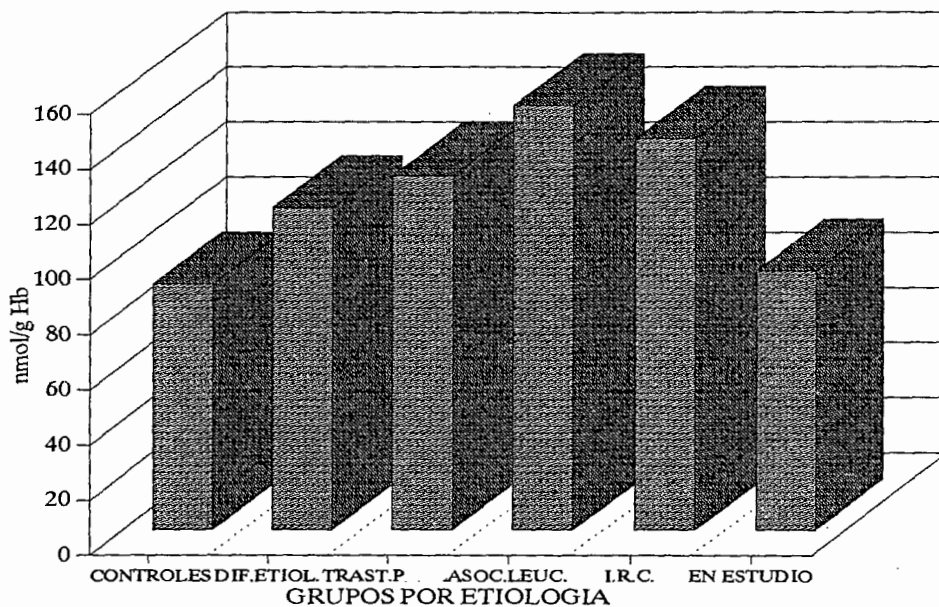
## TABLA 7

### Concentración de ATP Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Etiología

ATP	CONTR	DIF.ETI	TRAST.PR.	ASOC.L	I.R.C.	EN EST
x	4183,2	4522,8	4069,8	4163,8	5160,5	4800
s	895,3	1584,2	693,4	1438,1	1941,6	1269
n	30	30	5	5	32	10
p		NS	NS	NS	NS	NS

## FIGURA 7

### [ADP] Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Etiología



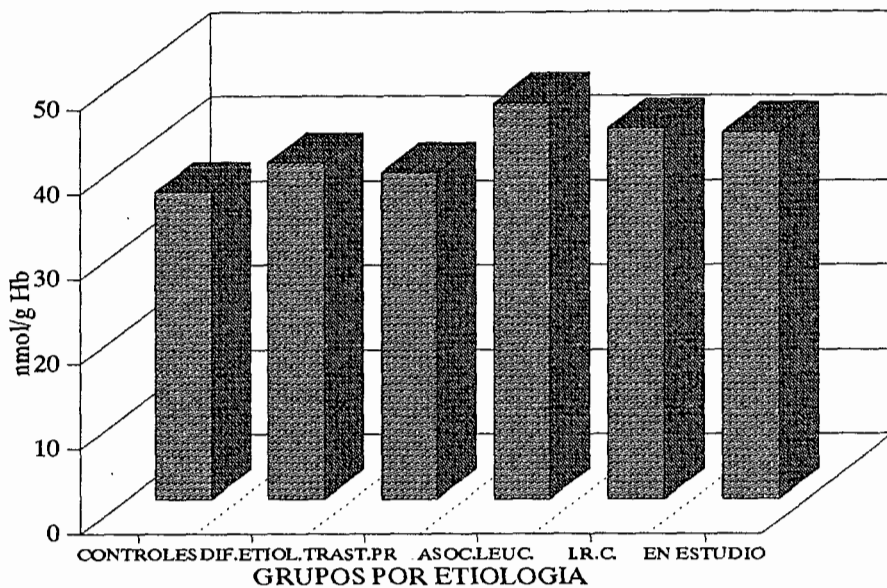
## TABLA 8

### Concentración de ADP Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Etiología

ADP	CONT	DIF. ETI	TRAST. P.	ASOC. L	I. R. C.	EN EST
x	89,2	117,1	128,8	154,2	142,2	94
s	38,1	41,9	43,2	48,8	55,2	43,7
n	30	30	5	5	32	10
p		p<0.05	p<0.05	P<0.05	P<0.05	NS

## FIGURA 8

### [AMP] Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Etiología



## TABLA 9

### Concentración de AMP Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Etiología

AMP	CONTR	DIF. ETI	TRAST. P	ASOC. L	I. R. C.	EN EST
x	36,3	39,7	38,6	46,8	43,7	34,5
s	13,3	17,7	13,1	39,5	24,5	16,8
n	30	30	5	5	32	10
p		NS	NS	NS	NS	NS

## TABLA 10

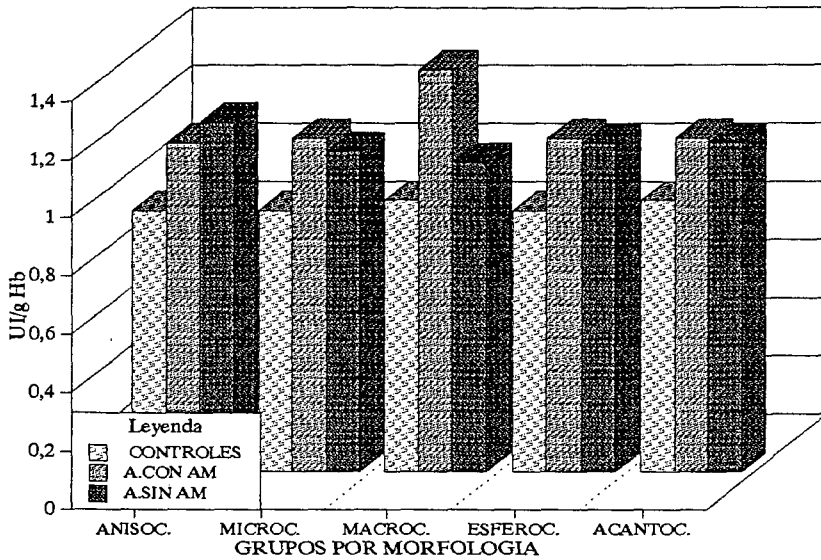
### Valores Hematológicos de Pacientes por Etiología

ETIOL		CONTR	DIF.ETI	EN EST	TRAST.	ASOC.L	IRC
RBC	x	4,746	4,004	4,324	2,864	3,82	2,853
	ds	0,466	0,916	0,953	1,208	1,03	1,208
	n	30	30	10	5	5	32
			NS	NS	p<0.05		
HB	x	13,657	10,417	10,35	8,46	11,68	7,661
	ds	1,334	2,259	2,07	2,23	2,6	2,027
	n	30	30	10	5	5	32
HT	x	40,253	31,243	30,51	25,404	26,14	23,322
	ds	3,377	5,888	5,985	6,773	17,114	7,266
	n	30	30	10	5	5	32
VCM	x	84,16	79,36	72,11	89,2	83,06	86,747
		3,491	8,504	15,251	5,69	4,043	5,953
		30	30	10	5	5	10

p = pacientes vs. controles respectivos

# FIGURA 9

## AE de ADA Eritrocitaria en Pacientes Anémicos por Morfología de Eritrocito

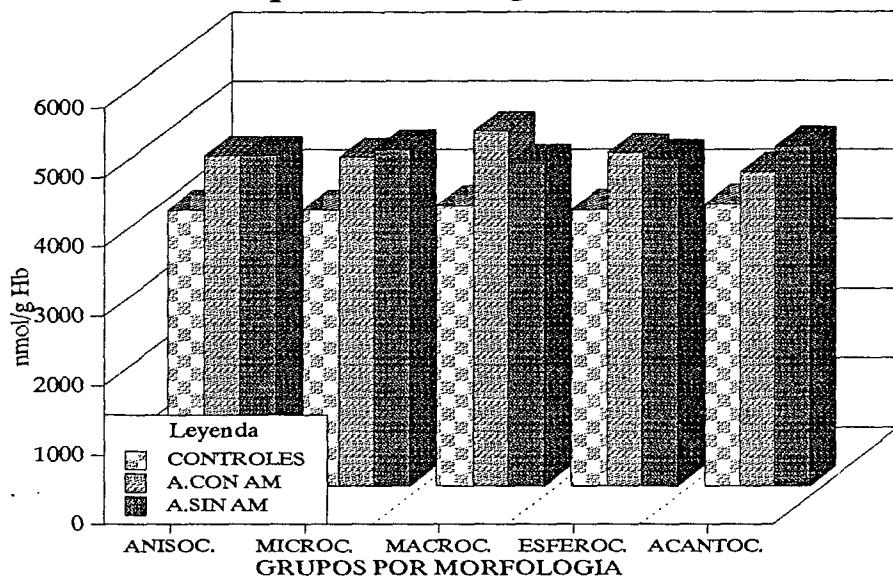


**TABLA 11**  
Actividad Específica de ADA Eritrocitaria en  
Pacientes Anémicos por Morfología de Eritrocito

CONTR	ALT.MO		ANISOC.	MICROC	MACRO	ESFERO	ACANT
	NO	x	0,897	0,897	0,932	0,897	0,932
		s	0,255	0,255	0,281	0,255	0,281
		n	28	28	30	28	30
ANEMIC							
	SI	x	1,139	1,146	1,382	1,147	1,146
		s	0,65	0,657	0,95	0,65	0,547
		n	73	70	19	39	32
	NO	x	1,202	1,102	1,064	1,13	1,133
		s	0,48	0,46	483	0,62	0,683
		n	9	12	63	43	50
		p(1)	NS	NS	NS	NS	NS
		p(2)	NS	NS	NS	NS	NS
		p(3)	NS	NS	NS	NS	NS

## FIGURA 10

### [ATP] Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Morfología de Eritrocito



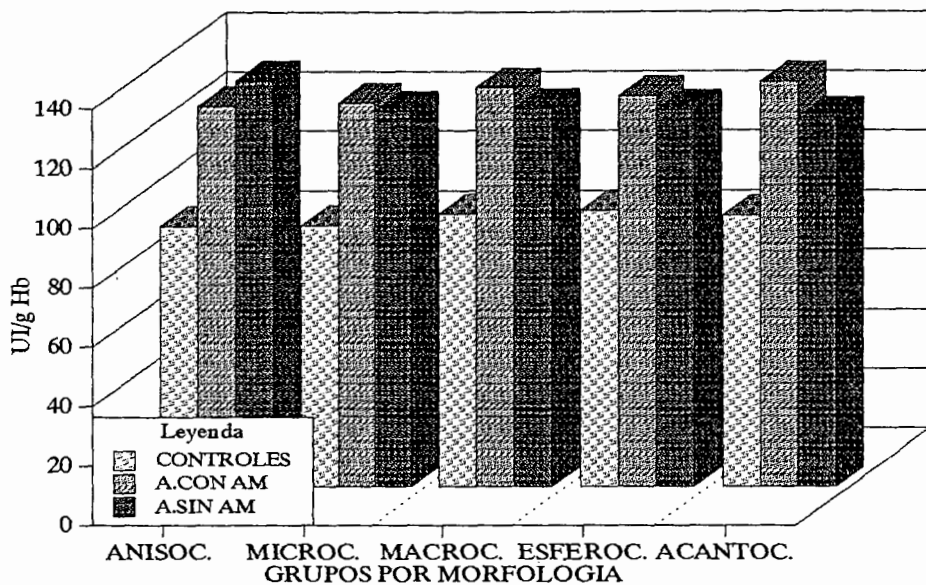
### TABLA 12

#### Concentración de ATP Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Morfología

	ALT.MO		ANISOC	MICRO	MACRO	ESFERO	ACANT
CONTR	NO	x	3982	3982	4183	3982	4183
		s	678	678	895	678	895
		n	28	28	30	28	30
ANEMI	SI	x	4765	4739	5119	4831	4524
		s	1713	1725	1608,7	1958	1902
		n	73	70	19	39	32
	NO	x	4762	4854	4646	4714	4904
		s	1327	1343	1682	1375	1500
		n	9	12	63	43	50
		p(1)	NS	NS	NS	NS	NS
		p(2)	NS	NS	NS	NS	NS
		p(3)	NS	NS	NS	NS	NS



**FIGURA 11**  
[ADP] Eritrocitario en Pacientes  
Anémicos por Morfología de Eritrocito

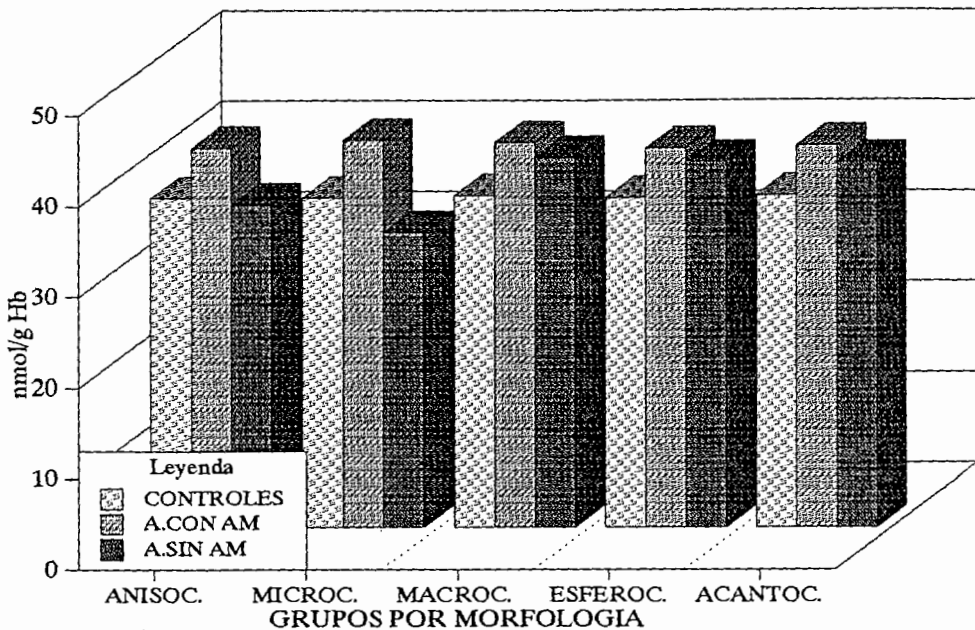


**TABLA 13**  
Concentración de ADP Eritrocitario en  
Pacientes Anémicos por Morfología

CONTR	ALT.MO		ANISOC	MICROC	MACRO	ESFERO	ACANTO
	NO	x	90	90	89,2	93	91,2
		s	34,8	34,8	38,1	42,9	41,4
		n	28	28	30	28	30
ANEMIC							
	SI	x	128,2	129,3	134,4	131,4	136,2
		s	70,3	71,9	68,9	71	75,5
		n	73	70	19	39	32
	NO	x	136,8	126,5	127,4	126,8	124,32
		s	43,5	43	48,3	45	45,1
		n	9	12	63	43	50
		p(1)	NS	NS	NS	NS	NS
		p(2)	NS	NS	NS	NS	NS
		p(3)	NS	NS	NS	NS	NS

## FIGURA 12

### [AMP] Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Morfología de Eritrocito



## TABLA 14

### Concentración de AMP Eritrocitario en Pacientes Anémicos por Morfología

CONTR	ALT.M		ANISOC	MICRO	MACRO	ESFER	ACANT
	NO	x	36,3	36,3	36,6	36,3	36,3
		s	13,6	13,6	13,3	13,6	13,33
		n	28	28	30	28	33
ANEMI							
	SI	x	41,6	42,4	42,4	41,8	42,1
		s	22,5	21,7	24,2	18,8	19,7
		n	73	70	19	39	32
	NO	x	37,6	32,5	40,5	40,3	40,8
		s	14,6	13,8	21,3	24,2	23,1
		n	9	12	63	43	50
		p(1)	NS	NS	NS	NS	NS
		p(2)	NS	NS	NS	NS	NS
		p(3)	NS	NS	NS	NS	NS

TABLA 15A  
Valores Hematológicos de Pacientes con AM Eritrocitaria

		RBC	HB	HT	VCM
CONTROLE	x	4,76	13,66	40,48	84,16
	ds	0,46	1,33	3,37	3,49
	n	30	30	30	30
MICRO	x	3,49	9,28	27,11	81,23
	ds	1,03	2,49	8,01	9,88
	n	70	70	70	70
p(1)		p<0.05	p<0.05	p<0.05	NS
MACRO	x	3,42	9,35	27,95	83,67
	ds	1,19	2,85	8,6	11,14
	n	19	19	19	19
p(1)		NS	p<0.05	p<0.05	NS
ANISOC	x	3,49	9,28	27,11	81,23
	ds	1,03	2,49	8,01	9,88
	n	70	70	70	70
p(1)		p<0.05	p<0.05	p<0.05	NS
ESFERO	x	3,53	9,53	28,43	82,72
	ds	1,06	2,5	7,18	9,21
	n	39	39	39	39
p(1)		p<0.05	p<0.05	p<0.05	NS
ACANTO	x	3,7	9,78	28,96	80,62
	ds	1,4	2,62	7,61	9,84
	n	32	32	32	32
p(1)		NS	p<0.05	p<0.05	NS

TABLA 15B  
Valores Hematológicos de Pacientes sin AM Eritrocitaria

		RBC	HB	HT	VCM
CONTRO	x	4,76	13,66	40,48	84,16
	ds	0,46	1,33	3,37	3,49
	n	30	30	30	30
MICRO	x	3,63	9,37	29,05	87,76
	ds	1,59	4,16	9,32	6,62
	n	12	12	12	12
p(1)		NS	p<0.05	p<0.05	NS
MACRO	x	3,54	9,27	27,23	81,74
	ds	1,2	2,76	8,11	10,25
	n	63	63	63	63
p(1)		p<0.05	p<0.05	p<0.05	NS
ANISOC	x	3,63	9,37	29,05	87,76
	ds	1,59	4,16	9,32	6,62
	n	12	12	12	12
p(1)		NS	NS	p<0.05	NS
ESFERO	x	3,49	9,07	26,45	81,7
	ds	1,31	3	8,97	9,84
	n	43	43	43	43
p(1)		p<0.05	p<0.05	p<0.05	NS
ACANTO	x	3,11	8,98	26,4	83,19
	ds	1,23	2,84	8,45	9,61
	n	50	50	50	50
p(1)		p<0.05	p<0.05	p<0.05	NS

---

*DISCUSSION*

## D I S C U S I O N

ATP

En contra de lo que se esperaba, parece ser que, independientemente de la etiología de la anemia, edad de los individuos y morfología eritrocitaria, las concentraciones de nucleótidos en general fueron ligeramente más elevados en los pacientes que en los testigos.

Al analizar los resultados de la concentración de ATP en grupos por edades, éstos no mostraron diferencias significativas de nucleótidos de purina entre pacientes anémicos vs. controles. No obstante, al hacer la comparación entre grupos por edades hay una tendencia que muestra una ligera disminución de dicho nucleótido conforme aumenta la edad del individuo (ver controles, FIG. 1). Los datos existentes en cuanto a los cambios metabólicos en eritrocitos de individuos jóvenes (18-40 años) vs. individuos viejos (mayores de 70 años) muestran una disminución considerable de este nucleótido (59). En este caso, aunque la diferencia de edades no es equiparable a dicho estudio, es posible que, un fenómeno similar ocurra en individuos cercanos a la edad adulta en comparación con niños menores de 2 años de edad.

Los valores de referencia reportados para población normal adulta son de  $4,050 \pm 105$  nm / g Hb (51, 58).

El ATP puede ser formado a partir de fosforilación de ADP en otras vías metabólicas como son los pasos iniciales de vía glicolítica y en la fosforilación oxidativa; aunque todas las reacciones para síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina ocurren en precursores eritroides, el eritrocito maduro depende únicamente de la vía de recuperación, la cual está dada a través de 2 maneras:

a) Una a partir de nucleósidos los cuales son convertidos a la base correspondiente y ribosa-1-fosfato por medio de la enzima Purina

Nucleósido Fosforilasa (PNF).

b) A partir de la acción de fosforribosil transferasas en las cuales la base reacciona con el PRPP formando nucleótidos de un solo paso; las enzimas encargadas de este proceso son: Adenina fosforribosil transferasa (APRT) e Hipoxantina-Guanina fosforribosil transferasa (HPRT) (56, 60).

Estudios previos hechos en pacientes deficientes de APRT han mostrado que la concentración de nucleótidos de adenina eritrocitario no se ven muy alterados a pesar de dicha deficiencia (56). Si partimos de esta observación y, conociendo que la vía en que participa esta enzima es la más importante para eritrocitos maduros, entonces resulta no ser tan obvia la relación que guardan entre sí los nucleótidos de purina aún conociendo las enzimas que participan en dicho proceso. El ATP eritrocitario tiene una vida media de aproximadamente 9 días en condiciones normales de almacenamiento (61) por lo que, en ausencia de otras vías de síntesis, dichas concentraciones deben ser mantenidas a partir de la vía de recuperación, como se mencionó anteriormente. Por otro lado, el eritrocito maduro no puede utilizar IMP sintetizado vía Hipoxantina-Guanina fosforribosil transferasa (HPRT) pues carece de la enzima adenilsuccinato liasa. Así, el eritrocito maduro mantiene su ATP intracelular vía Adenosina kinasa (vía biosintética) y/o APRT (vía de recuperación); una deficiencia de ésta última no muestra un incremento en la vía alterna (mediada por adenosina kinasa) (52, 56). En los pacientes estudiados, una posible alteración o desbalance en el metabolismo de nucleótidos debido a un posible incremento en la AE de ADA, no se vió reflejado en sus concentraciones como consecuencia directa inmediata dada la existencia de estas otras vías que, de alguna manera, buscan mantener estables los niveles de los nucleótidos en general.

Existe una tercera vía, llamada "Ciclo de la Adenosina" en la cual el AMP es convertido en Adenosina por la acción de la enzima 5'-Nucleotidasa (ver más adelante). La adenosina así formada puede ser refosforilada a AMP por Adenosina Cinasa. El ATP es donador de fosfatos en esta reacción y el ADP es generado como resultado de esta reacción. Otra enzima involucrada es la AMP desaminasa (AMPDA) la cual desamina AMP para producir IMP en los procesos de interconversión y catabolismo de nucleótidos de purina (10, 60).

Se han establecido, además, en incubaciones in vitro, que las relaciones entre los nucleótidos ATP:ADP:AMP son de 10:1:0.1 lo cual in vivo parece no ser así; además, los valores reportados han sido en población adulta y no en individuos menores de 18 años clasificados en grupos por edades, clasificación que se manejó en el presente trabajo.

Existen otros datos, sin embargo, que mencionan la elevación temporal de ATP posiblemente debido a la pérdida de actividad enzimática de ADA, enzima considerada como limitante en la regulación de niveles de ATP, más no hay evidencia de que la pérdida de una porción crítica de la maquinaria metabólica del eritrocito sea responsable para el proceso normal de envejecimiento (59).

Al analizar el comportamiento del ATP por etiología de la anemia, éste se encontró ligeramente elevado en los pacientes cuya anemia es debida a IRC; aunque las diferencias no fueron significativas al hacer el análisis grupal, a nivel individual hubo pacientes que presentaban hasta 2 o 2.5 veces un incremento en las concentraciones de ATP; esto coincide con información previa (53) la cual indica que estos pacientes cursan con niveles elevados de fosfatos en suero lo que puede incrementar a su vez la concentración de nucleótidos de purina, principalmente ATP. Por otro lado existe información

también de que en estados de uremia severa, el paciente puede sufrir estados de Hipofosfatemia lo que puede causar bajas concentraciones de fósforo orgánico intracelular (53); asimismo, en el presente trabajo, aunque los pacientes estudiados no tenían antecedente de estos urémicos, no existe la certeza que no hubiera tal estado pues algunos presentaron, a nivel individual, niveles bajos en ATP, lo que tampoco puede apreciarse al hacer el análisis global.

Lo anterior da una idea de lo compleja que es la regulación en síntesis, recuperación y catabolismo del ATP pues existen varios factores que influyen en dichos procesos.

En lo que respecta a la morfología eritrocitaria los mecanismos que, en un momento dado pudieran dar lugar a alteraciones morfológicas que estuvieran relacionadas con alteraciones en niveles de nucleótidos no son tan obvias pues, considerando que ambos aspectos pueden o no estar presentes en pacientes de una determinada patología, esto no demuestra, por sí mismo que un fenómeno como lo es alteración morfológica, se desprenda forzosamente de alteraciones en concentración de nucleótidos. Existe, sin embargo, el antecedente de que puede haber células con cuerpos de Heinz adheridos a membrana lo cual conduce a pérdida de agua y potasio, ganancia de sodio y pérdida de ATP (43), esto último más por mecanismos físico-químicos de permeabilidad membranal que a mecanismos bioquímicos de degradación-formación de ATP y, en este estudio no se detectó formación de cuerpos de Heinz a excepción de 2-3 pacientes.

#### ADP

Aún cuando las concentraciones de ADP fueron mayores en los pacientes que en los controles, en general fueron menores a las reportadas para población normal adulta ( $635 \pm 105$  nmol / g Hb)



(51,58) lo cual puede ser debido a mecanismos de regulación de nucleótidos, específicamente a nivel de interconversión de AMP a ADP por medio de la enzima Adenilato kinasa; puesto que ésta puede interconvertir nucleótidos  $AMP + ATP$  hacia  $2 ADP$  y viceversa, una inclinación hacia la izquierda de la reacción puede producir un incremento en la concentración de AMP y ATP con la correspondiente disminución de ADP lo que, ante un consumo constante de ATP como fuente energética inmediata dentro del eritrocito maduro, inclinaría todavía más dicha orientación de la reacción. Por otro lado, se desconoce la concentración de adenosina inicial con la que contaba la célula, por lo que es difícil saber hasta dónde la concentración de dicho nucleósido fue o no lo suficientemente alta como para causar inhibición de la enzima adenosina cinasa y esto a su vez producir la correspondiente disminución de AMP y por consecuencia, de ADP. Aun así, como ya se mencionó, las concentraciones de ADP fueron levemente mayores en pacientes que en controles en grupos por etiología cuando lo esperado era encontrar concentraciones disminuídas de dicho nucleótido; además, pudo observarse que, conforme aumenta la edad del individuo, tanto controles como pacientes por etiología, la concentración de ADP aumentó ligeramente. Existe el reporte de un paciente (29) el cual, aunque presentó incorporación pobre de radiactividad en biosíntesis de nucleótidos en general además de mostrar catabolismo acelerado de AMP y ATP, mostró, en un balance total, un ligero incremento de ADP en comparación con los controles respectivos; el paciente presentaba un caso de anemia hemolítica con incremento de 85 veces de ADA, lo cual explica un descenso en la concentración de nucleótidos mas no un incremento de los mismos. En otro caso (47), un paciente con anemia sideroblástica primaria adquirida, los niveles de nucleótidos fueron ligeramente diferentes de los normales; esto se

puede atribuir a que los niveles de ADA estuvieron solamente 17 veces arriba de lo normal, lo cual pudo no ser determinante como para producir una disminución de nucleótidos. Cabe señalar que el grupo de etiología manejado y las edades, no corresponden a las que han aparecido reportadas pues la gran mayoría se refieren a casos aislados y a individuos adultos.

Nuevamente, la relación en la interconversión y metabolismo de nucleótidos no es tan obvia pues, hay otras vías metabólicas en las que la interconversión ATP <-----> ADP varía dependiendo incluso de las demandas metabólicas de la célula misma (57, 60).

Dada la complejidad de los mecanismos que regulan la concentración de nucleótidos de purina intracelulares, es difícil saber, a parte de las explicaciones ya expuestas, de qué forma se produjo un incremento de ADP eritrocitario en los pacientes estudiados. Así, se pudo observar que, independientemente de los grupos por edad, por etiología de la anemia y por morfología eritrocitaria, el ADP se encontró significativamente más elevado, desconociéndose, como ya se mencionó, el mecanismo que dió lugar a este fenómeno.

#### AMP

La ausencia de diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de AMP entre pacientes anémicos y no anémicos por edades, por etiología y por morfología eritrocitaria puede deberse posiblemente a:

- \* la interconversión constante de este metabolito en otros nucleótidos y nucleósidos de purina ya que su fuente no es exclusivamente adenosina sino también puede ser formado a partir de Adenina como precursor más inmediato (10, 56).
- \* la cantidad, relativamente baja, de AMP en condiciones normales,

lo que no mostraría una diferencia significativa en comparación con un estado patológico que presentara catabolismo o acumulación de AMP, como se mencionó anteriormente (29).

Ahora bien, como se puede apreciar en la tabla 9, los pacientes que mostraron una ligera elevación de AMP, aunque no significativa, fueron aquellos con anemia asociada a leucemia y con anemia por IRC, lo cual en algunos de estos últimos pudo ser debido a concentraciones elevadas de fosfato sérico. La mayoría de los pacientes que, individualmente presentaron concentraciones elevadas de AMP fueron los pertenecientes al grupo de anemias por IRC.

#### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ADA

Por edades, la AE de ADA, no mostró diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo de pacientes vs. testigos por edades, aunque sí muestra que, conforme aumenta la edad (en el caso de los testigos) del individuo, la AE de ADA es cada vez menor; ésto coincide con datos ya reportados (49). Sin embargo, esto no pudo observarse para los sujetos sanos de 0 a 2 años de edad, debido posiblemente a que la población estudiada era muy pequeña (n=2).

La morfología eritrocitaria y el curso clínico de la anemia rara vez pueden proporcionar, por sí mismos, claves con respecto a la naturaleza del defecto causante de la anemia, como es el caso para las anemias hemolíticas debidas a deficiencias enzimáticas (52). En el caso de los pacientes anémicos estudiados cuya etiología es tan diversa, no parece haber relación entre etiología de la anemia y alteración morfológica en eritrocito. No obstante, es interesante notar que, en anemias hemolíticas debidas a deficiencias enzimáticas, ADA ha mostrado estar elevada 2-3 veces los niveles normales, mientras que, cuando la anemia es debida a una excesiva cantidad de

proteína ADA, existen otras enzimas que llegan a elevarse hasta en 2-3 veces los niveles normales (47).

Así, la alteración morfológica puede obedecer a otros mecanismos más que a una alteración en niveles de nucleótidos de purina.

Por etiología, la AE de ADA eritrocitaria mostró elevación significativa en pacientes cuya anemia estaba asociada a procesos leucémicos; información existente muestra que la AE de ADA eritrocitaria en niños con LLA y ante la presencia de anemia, parece estar relacionada al grado de leucemia en que ésta es diagnosticada, siendo la relación inversamente proporcional, es decir, a menor cantidad de Hb, mayor la elevación de la AE de ADA (46). Además, los pacientes leucémicos del presente estudio fueron significativamente diferentes en comparación con los demás grupos por etiología e incluso, con respecto a los pacientes cuya anemia estaba asociada a trastornos proliferativos; aún cuando los trastornos leucémicos forman parte de los proliferativos, hay una clara distinción cuando se trata de un trastorno bien diferenciado como son las leucemias en comparación con una alteración relativamente inespecífica como son los trastornos proliferativos en general. En el caso de los pacientes con IRC, hubo 3 de los 30 estudiados que presentaron niveles de ADA arriba de lo normal (1.59 - 2.52 UI / g Hb); de éstos, 2 presentaron concentraciones elevadas de ATP y ADP más no de AMP; es decir, aunque la AE de ADA estaba elevada los nucleótidos de purina también lo estaban. En este sentido, ADA no resultó ser la enzima limitante de ATP como sucede en eritrocitos senescentes normales pues, aunque puede haber consumo de adenosina, el ATP también puede ser formado como resultado de otras causas, como se explicó anteriormente.

En el caso de pacientes con anemias de diversa etiología, cabe

recordar que, como se mencionó en la sección de Material y Métodos, las causas de anemia incluídas en el presente estudio fueron alteraciones que afectarían el sistema cardio-respiratorio. A este respecto, la información existente para anemias ocasionadas por múltiples mecanismos, las cuales se caracterizan por tener eritrocitos cuya vida media es ligeramente menor de lo normal, por alteraciones en el metabolismo del hierro y un incremento compensatorio en la producción de eritrocitos en médula, pueden ser debidas a infecciones (neumonía, tuberculosis, sífilis y fiebre tifoidea) crónicas, medicamentos o bien factores desconocidos) o bien por mecanismos desconocidos (54). Considerando los casos particulares dentro de este grupo, el rango de elevación de AE de ADA fue desde 1.488 para un problema de fístula alveolar, hasta 3.35 en el caso de una tetralogía Fallot.

Finalmente, para las anemias en estudio, cuya etiología se desconoce, sólo 2 presentaron niveles elevados de AE de ADA (2.112 y 2.127 UI / g Hb), valores que se aproximan más a un trastorno de tipo leucémico; puesto que un trastorno leucémico se ubica dentro de las anormalidades proliferativas como ya se mencionó anteriormente, una anemia de causa desconocida con niveles de ADA elevados podría, en un momento dado, anticipar una alteración preleucémica (trastorno proliferativo que altera el desarrollo citoplasmático / nuclear) que posteriormente daría lugar a una anomalía leucémica (48, 55). Aún así, en el presente trabajo no fue apreciable pues los pacientes con alteraciones proliferativas estaban bajo tratamiento y, no era objetivo de este trabajo manejar un grupo más amplio de estos pacientes que estuvieran con o sin tratamiento. De cualquier modo, aún faltan más estudios por realizarse para confirmar o desechar esta hipótesis.

## VALORES HEMATOLOGICOS

En general, las diferencias esperadas fueron significativas pues la selección de los pacientes anémicos y de los controles fue en base a sus parámetros hematológicos de los cuales, los principales considerados fueron la concentración de eritrocitos (RBC), la concentración de hemoglobina (HB), el hematócrito (HT) y el volumen corpuscular medio (VCM).

1. La concentración de eritrocitos (RBC) permite saber la cantidad de eritrocitos por  $\mu$ l. presentes en el individuo. Una cantidad considerablemente menor se manifiesta en un decremento en la capacidad de la sangre para transportar oxígeno con la consecuente hipoxia tisular dicha disminución en número de eritrocitos puede producirse por falta de formación producción y/o diferenciación de los precursores eritroides (anemias aplásicas e hipoplásicas, o trastornos en médula ósea) debidos a medicamentos, sustancias químicas o ausencia de factores de crecimiento célula-específicos; o bien, por destrucción incrementada de eritrocitos (anemias hemolíticas).

En el presente estudio, los valores obtenidos para RBC en grupos por edades muestran una diferencia significativa entre los pacientes y los controles respectivos. Se puede apreciar en estos grupos que los pacientes de menor edad (0-2 años) fueron los que presentaron mayor cantidad de eritrocitos en comparación con los pacientes de 13-18 años; esto coincide con los datos reportados en la literatura para individuos de esas edades (58). Por etiología, los principales grupos que manifestaron dichas diferencias fueron aquellos con IRC, trastornos proliferativos y trastornos asociados a leucemias. Este tipo de anomalías, como ya se mencionó, pueden ser causadas por diversos factores. Un crecimiento desordenado de células blásticas como en el caso de las leucemias, causado por radiaciones, exposición prolongada

a agentes químicos (benceno, tolueno o agentes alquilantes) o bien por factores genéticos, suprime la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas normales (eritrocitos, granulocitos y plaquetas) (61). Dentro de los trastornos proliferativos, una falla en la estimulación de precursores eritroides o de otras líneas celulares por ausencia o defecto en factores estimuladores de colonias, por medicamentos o radiaciones, pueden causar este tipo de daños. En el caso de insuficiencia renal, la ausencia de tejido funcional productor de la principal hormona hematopoyética, la Eritropoyetina (EPO), la cual estimula la producción, proliferación y diferenciación de células eritroides pudieran explicar la anemia tan severa que padecen estos pacientes.

2. La HB, por su parte, mostró estar más elevada en pacientes de menor que en los de mayor edad, lo cual coincide con los valores reportados para individuos dentro de los rangos de edades especificados para este estudio. La concentración de HB está en relación directa con la concentración eritrocitaria; el cociente de estos 2 parámetros da lugar a la concentración media de hemoglobina (CMH). Las diferencias observadas fueron significativas entre cada grupo por edades, etiología y morfología, y sus respectivos controles.

Al tratarse de la principal proteína en eritrocito los valores obtenidos de las concentraciones de nucleótidos de purina así como de la enzima estudiada, fueron en base a la cantidad de HB presente en las muestras analizadas. Un descenso en la concentración de HB también puede deberse a alteración en la síntesis de sus cadenas ( $\alpha$  o no  $\alpha$ ) o bien en la biosíntesis del Heme. En el caso de anemias por desnutrición o carencia de hierro, la anemia se produce por la incapacidad de la HB de transportar Oxígeno aún cuando su porción proteica esté normal. De los pacientes ubicados dentro de las anemias

en estudio, hubo 2 con diagnóstico pendiente de anemia carencial (no fue confirmado) los cuales presentaron elevación considerable de ADA (1.8 veces los valores normales) desconociéndose la causa de dicha elevación.

3. El HT representa el porcentaje de volúmen sanguíneo que está compuesto por eritrocitos. En este caso, los pacientes sin Alteración Morfológica no mostraron diferencias con respecto a los controles debido probablemente a que los eritrocitos de dichos pacientes conservan todavía una proporción en membrana de lípidos/proteínas estructurales más o menos estable que les permite una viabilidad mayor en comparación con aquellos con Alteración Morfológica, de tal manera que pueden mantener un porcentaje de eritrocitos más constante en circulación. Aún así, hubo diferencias significativas entre los pacientes con AM y sin AM vs. controles.

4. El VCM representa el volúmen por eritrocito y sus valores normales abarcan un rango de 80 a 100 fl; no mostró diferencias significativas debido a que se tomaron promedios de los valores obtenidos. Al considerarse individualmente, hubo pacientes con VCM < 60 lo cual da un claro indicio de microcitosis. Dentro de las alteraciones morfológicas contempladas, no se hizo referencia a dichas alteraciones como predominantes en un determinado paciente, sino que se expresaron como alteraciones presentes (es decir, microcitos, macrocitos, acantocitos, etc) en las muestras estudiadas.

Faltan estudios por hacerse con relación a la expresión específica de ADA en línea eritroide y los mecanismos que dan lugar a una elevación de ADA independientemente de la etiología de la anemia, además de otra serie de incógnitas con respecto a la posible relación de alteraciones hematológicas asociadas a trastornos proliferativos, leucémicos y las que se encuentran en estudio.



---

*CONCLUSIONES*

## C O N C L U S I O N E S

1. La actividad específica de adenosina desaminasa en anemias de diversa etiología parece no estar relacionada con alteraciones ni con la morfología eritrocitaria ni con las concentraciones de nucleótidos de purina en eritrocito.
2. En anemias de diferente etiología estudiadas la alteración morfológica no es indicativo de alteración en los niveles de nucleótidos de purina.
3. En el caso de aquellas anemias cuya etiología es por Insuficiencia Renal Crónica, los niveles elevados de nucleótidos de purina pudieran obedecer más a la patofisiología de la enfermedad que a algún error intrínseco eritrocitario en el metabolismo de los mismos, no obstante existe elevación de adenosina desaminasa (2-3 veces los niveles normales) en algunos de estos pacientes.
4. Los niveles de ADA en aquellos pacientes con anemia sin diagnóstico -que están ligeramente más elevados de lo normal-, podrían indicar un posible origen a nivel de proliferación celular, pero posiblemente no son determinantes ni discriminativos como parámetro hematológico para establecer este tipo de diagnóstico.
5. Los parámetros hematológicos estudiados son suficientemente discriminativos para distinguir un proceso anémico de uno no anémico más, sin embargo, no son discriminativos para diferenciar etiologías de la anemia así como morfología eritrocitaria.

---

*BIBLIOGRAFIA*

## B I B L I O G R A F I A

1. Starkey TS, Ma C, Ma PF.: A study of adenosine deaminase and its conversion factor in human serum. *Adv Exp Med Biol* 253:65-69, 1989.
2. Wilson DK, Rudolph FB.: Atomic structure of ADA complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* 252:1278-1284, 1991.
3. Chang Z, Nygaard P: Deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* Adenosine Deaminase reveals evolutionarily conserved amino acid residues: Implications for catalytic function. *Biochemistry* 30:2273-2280, 1991.
4. Bhaumik D, Medin J, Gathy K, Coleman MS.: Mutational analysis of active site residues of human adenosine deaminase. *J Biol Chem* 268(8): 5464-5470, 1993.
5. Wilson DK, Quijcho FA.: A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of Adenosine Deaminase with bound I-deazaadenosine and Zinc-activated water. *Biochemistry* 32(7): 1689-1694, 1993.
6. Weisman MI, Caiolfa VR, Parola AH.: Adenosine deaminase-complexing protein from bovine kidney. *J Biol Chem* 263(11): 5266-5270, 1988.
7. Schrader WP, West CA.: Characterization of the Adenosine Deaminase-Adenosine Deaminase Complexing Protein binding reaction. *J Biol Chem* 265(31): 19312-19318, 1990.
8. Jahnwar SC, Berkvens TM, Breukel C.: Localization of Human Adenosine Deaminase (ADA) gene sequences to the q12-q13.11 region of chromosome 20 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 50:168-171, 1989.
9. Voogt EH, Grzeschik KH.: Assignment of Adenosine Deaminase Complexing Protein (ADCP) gene(s) to human chromosome 2 in rodent-human somatic cell hybrids. *Hum Genet* 59:317-323, 1981.
10. Kredrich NM, Hershfield MS.: Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency in Scriver C.R. (ed): *The Metabolic*

Basis of Inheritance Disease. Vol.I, Chapter 40, 6th. ed., McGraw-Hill, 1989.

11. Siegenbeek van Heukelom LH, Boom A, Bartstra HA, Staal GEJ.: Characterization of adenosine deaminase isozymes from normal human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 72: 109-115, 1976.
12. Edwards YH, Hopkinson DA, Harris H.: Adenosine deaminase isozymes in human tissues. *Ann Hum Genet* 35:207-219, 1971.
13. Akeson AL, Wiginton DA, Hutton JJ.: Normal and mutant human adenosine deaminase genes. *J Cell Biochem* 39: 217-228, 1989.
14. Markert ML, N-Slycord C, Ward FE.: A High proportion of ADA point mutations associated with a specific alanine-to-valine substitution. *Am J Hum Genet* 45: 354-361, 1989.
15. Harris H, Hopkinson DA.: *Handbook of enzyme electrophoresis in Human Genetic*; ed; North-Holland Publishing Co. Oxford, 1978.
16. Daddona PE, Shewach DS, Kelley WN.: Human Adenosine Deaminase. *J Biol Chem* 259(19):12101-12106, 1984.
17. Wiginton DA, Kaplan DJ, States JC.: Complete sequence and structure of the gene for human Adenosine Deaminase. *Biochemistry* 25:8234-8244, 1986.
18. Akeson AL, Wiginton DA.: Mutations in the human Adenosine Deaminase gene that affect protein structure and RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci* 84: 5947-5951, 1987.
19. Markert ML, Hutton JJ, Wiginton DA, Kaufman RE.: Adenosine deaminase (ADA) deficiency due to deletion of the ADA gene promoter and first exon by homologous recombination between two Alu elements. *J Clin Invest* 81: 1323-1327, 1988.
20. Tzall S, Ellenbogen A, Eng F, Hirschhorn R.: Identification and characterization of nine RFLPs at the adenosine deaminase (ADA) locus. *Am J Hum Genet* 44: 864-875, 1989.
21. Johnston JM, Kredich NM.: Inhibition of methylation by adenosine in adenosine deaminase-inhibited, phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *J Immunol* 123(1): 97-103, 1979.

22. Ullman B, Gudas LJ, Cohen A, Martin DW.: Deoxyadenosine metabolism and cytotoxicity in cultured mouse T lymphoma cells: a model for immunodeficiency disease. *Cell* 14: 365-375, 1978.
23. Donofrio J, Coleman MS, Hutton JJ.: Overproduction of Adenine deoxynucleosides and deoxynucleotides in adenosine deaminase deficiency with Severe Combined Immunodeficiency Disease. *J Clin Invest* 62: 884-887, 1978.
24. Coleman MS, Donofrio J, Hutton JJ, Hahn L.: Identification and quantitation of adenine deoxynucleotides in erythrocytes of a patient with Adenosine Deaminase deficiency and Severe Combined Immunodeficiency *J Biol Chem* 253(5): 1619-1626, 1978.
25. Rosen FS.: Primary immunodeficiency diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 40: 166-196, 1989.
26. Waldmann TS.: Immunodeficiency: Immunoregulation and immunogenetics. *C Immunol Immunopathol* 40: 25-36, 1986.
27. Valentine WN, Paglia DE, Tartaglia AP, Glisanz F.: Hereditary hemolytic anemia with increased red cell adenosine deaminase (45-to-75 fold) and decreased adenosine triphosphate. *Science* 195: 781-785, 1977.
28. Miwa S, Fujii H, Matsumoto N.: A case of red-cell Adenosine Deaminase Overproduction associated with hereditary hemolytic anemia found in Japan. *Am J Hematol* 5:107-115, 1978.
29. Pèrignon J-L, Hamet M, Buc HA.: Biochemical study of a case of hemolytic anemia with increased (85-fold) red cell adenosine deaminase. *Clin Chim Acta* 124: 205-212, 1982.
30. Valentine WN.: Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Ann Int Med* 103(2): 245, 1985.
31. Chottiner EG, Gingsburg D, Mitchell BS.: Autosomal dominant hemolytic anemia and adenosine deaminase overproduction. *Adv Exp Med Biol* 253A: 493-497, 1989.
32. Chottiner EG, Gingsburg D, Mitchell BS.: Erythrocyte adenosine deaminase overproduction in hereditary hemolytic anemia. *Blood* 74: 448-453, 1989.

33. Fujii H, Miwa S.: Recent Progress in the molecular genetic analysis of erythroenzymopathy. *Am J Hematol* 34: 301-310, 1990.
34. Paglia DE, Valentine WN.: Control of red blood cell adenine nucleotide metabolism studies of adenosine deaminase. *The Red Cell*. pp: 319-335. Ed. Alan R. Liss, Inc., New York, New York; 1978.
35. Piña E, Fernández C.: La adenosina como regulador metabólico en. Ochoa S et al (ed): *Bioquímica y biología molecular*. Vol I, cap. 3, 1 ed, Ed. Salvat; 1986.
36. Centelles JJ, Cascante M, Canela EI, Franco R.: A model for adenosine transport and metabolism. *Biochem J* 287: 461-472, 1992.
37. Paglia DE, Valentine WN.: Red cell nucleotide abnormalities. *The Red Cell: Sixth Ann Arbor Conference* pp: 213-225. Ed. Alan R Liss, Inc., New York, New York; 1984.
38. Hershfield MS, Kredich NM.: S-Adenosylhomocysteine Hydrolase is an adenosine-binding protein: a target for adenosine toxicity. *Science* 202: 757-760, 1978.
39. Bushfield M, Johnson RA.: Regulation of adenylate cyclase by adenosine: characterization of the P-site. *Biochem Soc Trans* 18(2): 150-151, 1990.
40. Kizaki H, Suzuki K, Tadakuma T, Ishimura Y.: Adenosine Receptor-mediated accumulation of Cyclic AMP-induced T-lymphocyte death through internucleosomal DNA cleavage. *J Biol Chem* 265(9): 5280-5284, 1990.
41. McKenzie SB.: Aspectos generales y clasificación de las anemias en McKenzie SB et al (ed): *Hematología Clínica*, cap. 5, ed. 1; Ed. Manual Moderno, 1991.
42. Erslev AJ.: Erythrocyte disorders: Classification and manifestations in Williams et al (ed): *Hematology*. Vol. 1, chapter 42, ed 4th, Ed. McGraw-Hill, 1991.
43. Bull BS, Gorius JB, Beutler E.: Morphology of erythron in Williams et al (ed): *Hematology*. Vol. 1, chapter 42, ed 4th, Ed. McGraw-Hill, 1991.

44. Adrian GS, Hutton JJ.: Adenosine Deaminase messenger RNAs in lymphoblast cell lines derived from leukemic patients and patients with hereditary adenosine deaminase deficiency. *J Clin Invest* 71: 1649-1660, 1983.
45. Gladler BE, Backer K, Diamond LK.: Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in congenital hipoplastic anemia. *N Eng J Med* 309: 1486-1490, 1983.
46. Gladler BE, Backer K.: Elevated red cell adenosine deaminase activity: a marker of disordered erythropoiesis in Diamond-Blackfan anaemia and other hematologic diseases. *Br J Hematol* 68: 165-168, 1988.
47. Kanno H, Fujii H, Tani K.: Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in a patient with Primary Acquired Sideroblastic Anemia. *Am J Hematol* 27: 216-220, 1988.
48. Van Der Wyden MB, Harrison C, Hallam L, McVeigh D, Gan TE, Taafee LM.: Elevated red cell adenosine deaminase and haemolysis in a patient with a myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 73(1): 129-131, 1989.
49. Medina C.: Erythrocyte Adenosine Deaminase in different pathologies associated with anemia. *Arch Med Res* 23(4): 192, 1992.
50. Cowan MJ, Brady RO, Widder KJ.: Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 83: 1089-1091, 1986.
51. Beutler E.: *The Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods*; 2th ed., Grune & Stratton; New York, New York, 1975.
52. Beutler E.: *Red Cell Enzyme Defects. Hematol Pathol* 4(3): 103-114, 1990.
53. Erslev AJ, Caro J.: *Anemia of Chronic Renal Failure in Williams et al (ed): Hematology. Vol. 1, chapter 44, ed 4th, Ed. McGraw-Hill, 1991.*
54. Erslev AJ.: *Erythrocyte disorders: Anemias related to unknown or multiple mechanisms in Williams et al (ed): Hematology. Vol. 1, chapter 51, ed 4th, Ed. McGraw-Hill, 1991.*



55. Lichtman MA, Brennan JK.: Hemopoietic stem cell disorders: Myelodysplastic. Preleukemia and oligoblastic leukemia (myelodysplastic disorders), in Williams et al (ed): Hematology. Vol. 1, chapter 19, ed 4th, Ed. McGraw-Hill, 1991.
56. Dean BM, Simmonds HA, Sahota A, Acker KJ.: Adenine and adenosine metabolism in intact erythrocytes deficient in adenosine monophosphate- pyrophosphate phosphoribosyl transferase: a study of two families. Clin Sci Mol Med 55:407-412 (1978).
57. Beutler E.: Energy metabolism and maintenance of erythrocyte in Williams et al (ed): Hematology. Vol. 1, chapter 51, ed 4th, Ed. McGraw-Hill, 1991.
58. Lubin BH.: Reference Values in Infancy and Childhood, in Hematology of Infancy and Childhood, edited by D Nathan and FA Oski, 3d.ed, pp: 177-182. Sanders, Philadelphia, 1987.
59. Kosower NS.: Altered properties with aged. Am J Hematol 42:241-247, 1993.
60. Palella TD, Fox IH.: Hyperuricemia and Gout in The Metabolic Basis of Inherited Disease; Scriver C.R. (ed): The Metabolic Basis of Inheritance Disease. Vol.I, Chapter 37, 6th. ed., McGraw-Hill, 1989.
61. Henderson ES.: Acute leukemia: general considerations in Williams et al (ed): Hematology. Vol. 1, chapter 25, ed 4th, Ed. McGraw-Hill, 1991.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente .....

Número .....

Sección .....

C. MARINA MA. DE JESUS ROMERO PRADO  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "ESTUDIO BIOQUIMICO DE LA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASA EN PACIENTES CON ANEMIA DE ETIOLOGIA DESCONOCIDA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis la M. en C. Claudia Medina Lozano.

A T E N T A M E N T E  
" PIENSA Y TRABAJA "  
Guadalajara, Jal., 23 de Marzo de 1993.  
EL DIRECTOR

M. EN C. JUAN LUIS CIFUENTES LEMUS



FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

BIOL. JESUS ALBERTO ESPINOSA ARIAS

c.c.p.- M.C. Claudia Medina Lozano, Directora de tesis pte.-  
c.c.p.- El expediente del alumno.

JLCL>JAEA>Cgr.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AMBIENTALES

DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE  
JEFE DE DIVISION CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

P R E S E N T E

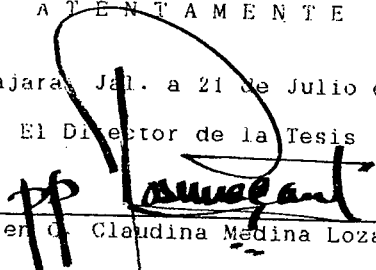
Por medio de la presente queremos informarle a Ud. que, habiendo revisado el trabajo de tesis titulado ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASA EN PACIENTES CON ANEMIA DE DIVERSA ETIOLOGÍA que realizó la pasante de la Lic. en Biología, MARINA MARIA DE JESUS ROMERO PRADO código 084478091, consideramos que reúne los requisitos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales correspondientes.

Aprovechando la ocasión para enviarle un cordial saludo, nos despedimos de Ud.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 21 de Julio de 1994.

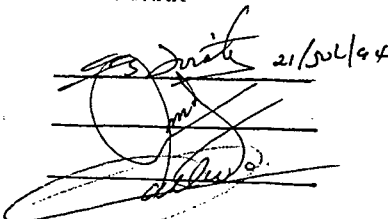
El Director de la Tesis

  
M. en C. Claudina Medina Lozano

SINODALES

M. en C. Carlos Beas Zárate  
Q.F.B. Rosa Maria Dominguez Arias  
Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega

FIRMA

  
21/Jul/94