

ERITROPOYESIS MEGALOBLASTICA Y ANHIDRASAS CARBONICAS ERITROCITICAS¹

DR. GUILLERMO RUIZ-REYES²

La determinación de isoenzimas de anhidrasa carbónica eritrocítica (ACE) por electroforesis en acetato de celulosa, es un procedimiento sencillo, que permite registrar con sensibilidad adecuada, eritropoyesis megaloblástica.

La enzima B es más específica de megaloblastosis que la C. Durante el tratamiento de estas anemias, su descenso es lento y progresivo normalizándose cuando los niveles de hemoglobina lo hacen también, característica que puede aplicarse al diagnóstico retrospectivo de las anemias megaloblásticas, cuando han sido aplicadas previamente medidas terapéuticas capaces de dificultar el diagnóstico citológico.

En puérperas y en sujetos sometidos a terapia anticonvulsiva, con eritropoyesis megaloblástica variable, se observó una correlación adecuada entre estos cambios y los niveles de ACE y no así en algunos pacientes con megaloblastosis inducida por anti-metabolitos, ni en un caso de síndrome de Di Guglielmo.

Estos resultados alientan su aplicación en los casos en que la detección de eritropoyesis megaloblástica se requiera. (GAC. MÉD. Méx. 99: 345, 1969).

EL DIAGNÓSTICO de las deficiencias de ácido fólico y de vitamina B12, cuando han alcanzado una expresión clínica y hematológica evidente, es relativamente fácil de establecer. La detección precoz de estas deficiencias en sus estadíos iniciales ofrece, contrariamente, mayores dificultades. Para lograr éste objetivo, se han ideado diver-

sos procedimientos citológicos y bioquímicos, que no han logrado resolver el problema debido a la divergencia de opinión que se sustenta sobre el valor de algunos de ellos o por las limitaciones de aplicación práctica que tienen otros que han probado ser útiles. El procedimiento recomendado por Herbert,¹ quien considera manifestación de la deficiencia de ácido fólico al hallazgo de cifras mayores de 5% de neutrófilos con más de cinco lóbulos, no ha sido aceptado por todos, aun cuando por su simplicidad pueda ser

¹ Trabajo de ingreso a la Academia Nacional de Medicina presentado en la sesión ordinaria del 27 de noviembre de 1968.

² Académico correspondiente. Hospital Civil de Puebla.

útil como dato de sospecha hacia este tipo de deficiencia. El examen microscópico de la capa de leucocitos que se forma en el tubo, cuando se determina el hematocrito,² es un método citológico considerado por algunos como satisfactorio para descubrir eritropoyesis megaloblástica, sin recurrir a la certeza que confiere el estudio de la médula ósea, que lamentablemente no puede aplicarse en forma sistemática durante el curso de un embarazo, por ejemplo, o en el estudio de grupos de población con propósito de encuesta.

Algunas pruebas bioquímicas, como la medición urinaria de ácido formiminoglutámico (Figlu) han provocado desacuerdo por lo que a su valor diagnóstico se refiere, particularmente en el caso de las anemias megaloblásticas del embarazo, en las que se ha encontrado anormal en ausencia de deficiencia de ácido fólico y normal en personas embarazadas con carencia de esta substancia.^{3,4}

La misma limitación se atribuye al aumento de otro derivado de la histidina, el ácido urocánico,⁵ que es excretado excesivamente, tanto en las deficiencias de ácido fólico, como en pacientes con desnutrición proteínica,⁶ lo que obviamente resta especificidad a la prueba. La excreción elevada de metilmalonato urinario, tiene limitaciones de orden técnico y el inconveniente de ocurrir sólo en las deficiencias de vitamina B12.⁷ Los propios descensos de folatos no son, para algunos, evidencia de anemia megaloblástica.⁸ Este tipo de determinaciones bioquímicas, así como la depuración de

folatos^{9,10} y la cuantificación de B12, son técnicamente complejas y por ello inadecuadas para laboratorios no especializados. Algunas elevaciones enzimáticas, como las de las deshidrogenasas láctica^{11,12} y alfa hidroxibutírica¹¹ en el suero, han mostrado una correlación adecuada con los diversos grados de eritropoyesis megaloblástica con los que han sido comparadas.

En fecha relativamente reciente, Weatherall y McYntyre,¹³ efectuando estudios electroforéticos de hemolizados humanos en gel de almidón, señalaron que dos fracciones proteínicas no hemoglobínicas, con actividad de anhidrasa carbónica, designadas como anhidrasas carbónicas eritrocíticas (ACE) "B" y "C" tenían variaciones de concentración en diversas edades y en algunas circunstancias clínicas. Señalaron que ambas isoenzimas disminuyen en la infancia y alcanzan concentración de adulto en el segundo y tercer año de la vida. La AC "B" se observó reducida en pacientes con tirotoxicosis y elevada en sujetos con hipotiroidismo, retornando a niveles normales cuando eran tratados específicamente. En su comunicación indican que ambas enzimas se encuentran elevadas en pacientes con anemia megaloblástica por deficiencia de B12 y probablemente en las ocasionadas por carencia de ácido fólico.

Interesados por la posibilidad de aplicar estos hallazgos a la detección precoz de eritropoyesis megaloblástica, se resolvió: 1. Simplificar su técnica de cuantificación usando poliacetato de celulosa como medio de soporte y 2.

Valorar la especificidad y sensibilidad de sus variaciones en la detección de eritropoyesis megaloblástica de etiología diversa. En esta comunicación se resumen los resultados obtenidos en esos estudios,^{15,16,17.}

MATERIAL Y MÉTODO

Se examinaron 63 adultos normales de ambos sexos, veinte pacientes con

del hematocrito y la inspección de frotis de sangre buscando cambios megaloblásticos.

En todos los pacientes con anemia megaloblástica, en las púerperas y en los enfermos epilépticos tratados con medicación anticonvulsiva, se efectuaron estudios de médula ósea. Los resultados de estos exámenes se clasificaron en cuatro grupos, de acuerdo con el criterio adoptado por el Labo-

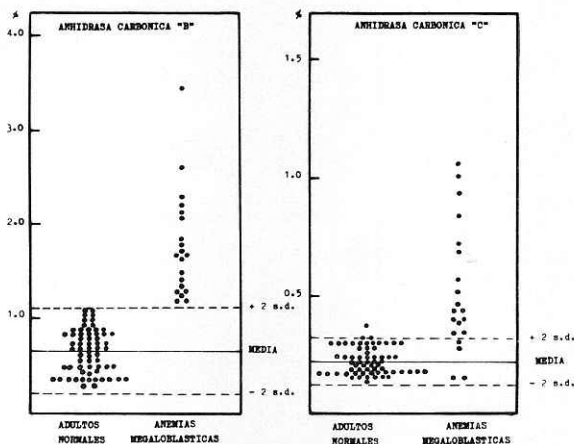


FIG. 1. Valores de ACE "B" y "C" observados en 63 adultos sanos y en 20 pacientes con anemia megaloblástica.

anemia megaloblástica, 198 mujeres entre el primero y el cuarto día del puerperio y 149 pacientes epilépticos sometidos a tratamientos prolongados con drogas anticonvulsivantes.

El examen de sangre periférica incluyó la estimación de hemoglobina,

ratorio de Hematología del Instituto Nacional de la Nutrición¹⁸ para graduar cambios megaloblásticos.

La cuantificación de isoenzimas de ACE se practicó con la técnica rápida de electroforesis en acetato de celulosa descrita por nosotros.¹⁵

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cifras de ACE "B" y "C" encontradas en adultos sanos, fueron inferiores a 1.11 y 0.32% respectivamente. La técnica empleada,¹⁵ aplicable en laboratorios pequeños, permite que una persona efectúe cuatro determinaciones por duplicado en un lapso de cuatro horas, a partir del momento en que se extrae la sangre problema, hasta que el cálculo aritmético final se realiza. De esta manera pueden practicarse simultáneamente tres diferentes tipos de estudios hematológicos: isoenzimas de anhidrasa carbónica eritrocítica, hemoglobina A2 y estudio de la motilidad electroforética de la hemoglobina.

En la figura 1 se observa la distribución de los valores de las isoenzimas B y C en 63 personas sanas y 20 pacientes con anemia megaloblástica. En éstos, se pudo confirmar la observación de Weatherall y McYntyre¹³ quienes señalan, que en el estudio de sus casos se observó elevada principalmente la banda B, sin excluir hiperactividad de la fracción C. En efecto, en todos los casos de anemia megaloblástica estudiados, la concentración de ACE "B" estuvo elevada y en el 80% solamente, la ACE "C" sobrepasó los límites normales. Estos hallazgos sugieren una mayor especificidad de las modificaciones de ACE "B" para registrar eritropoyesis megaloblástica, cuando se emplean en

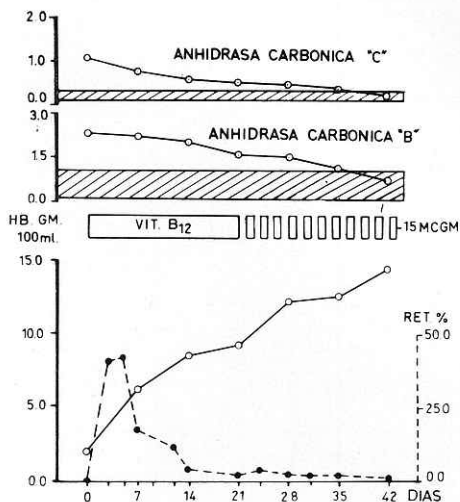


Fig. 2. Descenso lento y progresivo de la isoenzima de ACE, durante el tratamiento de un paciente con anemia megaloblástica nutricional.

su medición procedimientos electroforéticos.

En varios casos de anemia megaloblástica se efectuaron determinaciones periódicas de ambas isoenzimas, antes y durante el curso del tratamiento específico. En todos ellos se apreció un descenso lento y progresivo de las enzimas, hasta alcanzar niveles normales, coincidiendo esto con la normalización de las

La característica de normalización en forma lenta y progresiva, sugiere que su cuantificación pueda ser útil en el diagnóstico retrospectivo de eritropoyesis megaloblástica, en los casos en que se hayan administrados medicamentos específicos antes de realizar los exámenes de médula ósea, que como se sabe, pueden dificultar la apreciación de cambios citológicos de tipo diagnóstico,

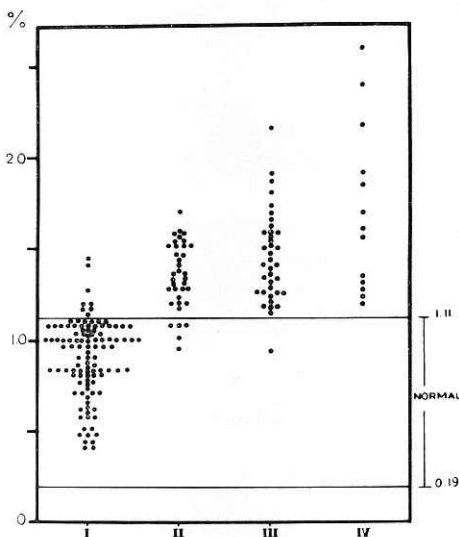


FIG. 3. Valores de ACE "B" en los cuatro grados de alteraciones megaloblásticas observadas en 198 mujeres en período puerperal.

cifras de hemoglobina. En la figura 2 se muestra una típica conducta de variaciones enzimáticas en un caso florido de anemia megaloblástica nutricional severa, tratada específicamente.

al inducir en lapsos cortos la normalización de la eritropoyesis patológica.

En la figura 3 se muestra la distribución de los valores de ACE "B" en 198 mujeres en el período inmediato

al parto. Este tipo de pacientes fue escogido, porque la frecuencia de concentraciones bajas de folatos asociada a embarazo aumenta durante el período puerperal,⁸ elevando así las posibilidades de observar entre ellas eritropoyesis megaloblástica. Un factor adicional, como la concurrencia al Servicio de Gineco-obstetricia de nuestro Hospital, de personas de escasos recursos económicos y por ello con limitaciones alimenticias importantes, contribuyó también a que en este lote de personas, se encontrara una elevada frecuencia de alteraciones megaloblásticas de intensidad variable, que permitiera valorar la sensibilidad de las variaciones enzimáticas en la detección de este tipo anormal de eritropoyesis.

En el grupo I, constituido por 112 pacientes con médula normal, sólo 7% tuvieron niveles de AC "B" ligeramente por arriba de lo normal. En los grados II y III, 87 y 97% respectivamente fueron anormales. En el grado IV con cambios megaloblásticos típicos, todas las concentraciones enzimáticas estuvieron elevadas. Estos hallazgos sugieren que las variaciones de ACE son suficientemente sensibles para ser utilizadas en la detección precoz de eritropoyesis megaloblástica del embarazo e indican que la elevación de AC "B" es directamente proporcional a los cambios megaloblásticos, como pudo comprobarse al obtener una curva de tipo ascendente al graficar los valores promedio de la isoenzima B, en los cuatro grados de cambios megaloblásticos.

% ANHIDRASA CARBONICA "B"

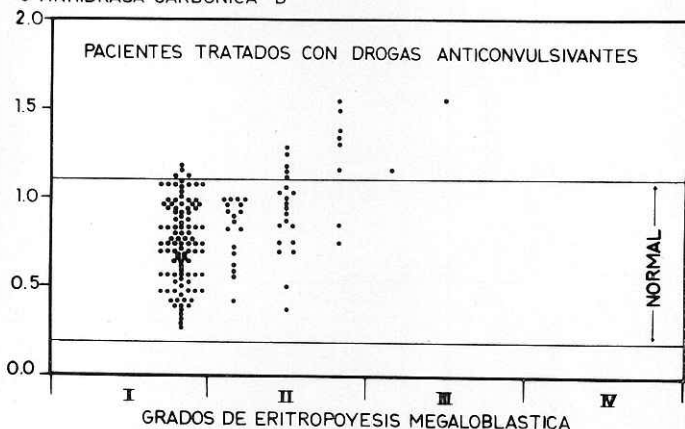


FIG. 4. Valores de ACE "B" en sujetos sometidos a terapia anticonvulsiva prolongada, mostrando una correlación adecuada entre los niveles de la isoenzima y el grado de alteración megaloblástica.

La detección precoz de eritropoyesis megaloblástica ofrece teóricamente en el campo de la obstetricia, una de sus mejores aplicaciones. La determinación de estas isoenzimas durante el curso del embarazo, particularmente en las personas con anemia, debe esperarse útil para establecer tratamientos adecuados y hacer con ello la mejor profilaxia de los accidentes que se han atribuido a las deficiencias de folatos durante la gestación.

Una correlación semejante a la observada en púerperas se observó en el estudio¹⁷ de un grupo de pacientes sometidos a tratamiento con drogas anticonvulsivantes, capaces, particularmente cuando se usan en forma prolongada, de inducir eritropoyesis megaloblástica. En éstos, como en las púerperas, se obtuvo también una correlación adecuada entre los cambios citológicos en médula ósea y los niveles de AC "B" (Fig. 4). En un estudio semejante de Reynolds y col.¹⁸ en el que fueron medidos, entre otros parámetros, la actividad del DHL del suero, no se observaron modificaciones de esta enzima en los enfermos con eritropoyesis megaloblástica inducida por terapia anticonvulsiva, contrariamente a lo que acontece en la secundaria a las deficiencias de B12 o de ácido fólico. Esto sugiere que la detección de este tipo particular de eritropoyesis patológica pueda lograrse también con la medición de las isoenzimas de ACE.

En cuatro pacientes con eritropoyesis megaloblástica secundaria al uso de antimetabolitos y en un enfermo con síndrome de Di Guglielmo, que presen-

taba, como habitualmente ocurre en estos casos, cambios megaloblásticos, no se observaron elevaciones de ACE. Esto sugiere, aún cuando constituye una experiencia muy reducida, que en estos tipos especiales de eritropoyesis megaloblástica, no ocurren elevaciones de estas isoenzimas y su medición es por lo tanto inefectiva para detectarlas.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen la colaboración que les prestaron en sus estudios los Dres. Alfonso Arroyo, Jorge Ley Koo, Manuel S. Santillana y Roberto Rivera, de la Unidad Hospitalaria "Hospital Civil de Puebla" y al Dr. Julio Sánchez Lemus, Director del Hospital Campestre "Dr. Rafael Serrano" de "Batán", Pue. y al personal médico y enfermeras de la misma Institución.

REFERENCIAS

1. Herbert, V.: *Symposium on folic acid deficiency*. Proc. Rev. Soc. Med. 57: 377, 1964.
2. Goodall, H. B.: *Microscopical examination of the "buffy coat" from the hematocrit in the investigation of anaemia in pregnancy*. J. Clin. Path. 10: 248, 1957.
3. Mollin, D. L. y Hoffbrand, A. V.: *The diagnosis of folate deficiency*. Series Haemat. 3: 1, 1965.
4. Chisholm, M. y Sharp, A. S.: *Follicle acid excretion in anaemia of pregnancy*. Brit. M. J. 2: 1366, 1964.
5. Bennett, M. C. y Chanarin, I.: *Urinary excretion of urocanic acid in megaloblastic anemia*. Lancet. 2: 1095, 1961.
6. Spector, I., Falcke, H. C., Yoffe, Y. y Metz, J.: *Observations on urocanic acid and formiminoglutamic acid excretion in infants with protein malnutrition*. Amer. J. Clin. Nutr. 18: 426, 1966.
7. Barness, L. A., Young, D., Mellman, W. J., Kahn, S. B. y Williams, W. J.: *Methylmalonate excretion in a patient with pernicious anemia*. New Eng. J. Med. 268: 144, 1963.
8. Chanarin, I., Rothman, D. y Berry, V.: *Iron deficiency and its relation to folic acid status in pregnancy: Results of clinical trial*. Brit. M. J. 1: 480, 1965.
9. Chanarin, I., Mollin, D. A. y Ander-

- son, B. B.: *The clearance from the plasma of folic acid injected intravenously in normal subjects and patients with megaloblastic anaemia*. Brit. J. Haemat. 4: 435, 1958.
10. Hogan, J. A., Maniatis, A. y Moloney, W. C.: *The serum Lactobacillus casei folate clearance test in various hematologic disorders*. Blood. 24: 187, 1967.
 11. Fleming, F. y Elliott, B. A.: *Serum enzyme test for megaloblastic erythropoiesis in anaemia in pregnancy*. Brit. M. J. 2: 1108, 1964.
 12. Goldfare, A. G. y Papp, B. J.: *Excessively high levels of lactic acid dehydrogenase activity in pernicious anemia*. Am. J. Med. 34: 578, 1963.
 13. Weatherall, D. J. y McIntyre, P. A.: *Developmental and acquired variations in erythrocyte carbonic anhydrase isozymes*. Brit. J. Haemat. 13: 106, 1967.
 14. Rikli, E. E., Chazanfar, S. S. S., Gibbons, B. H. y Edsall, J. T.: *Carbonic anhydrases from human erythrocytes. Preparation and properties of two enzymes*. J. Biol. Chem. 239: 1065, 1965.
 15. Ruiz Reyes, G. y Ramírez-Zorrilla, M. J.: *Rapid measurement of erythrocyte carbonic anhydrase isozymes by means of cellulose acetate electrophoresis*. Am. J. Clin. Path. En prensa.
 16. Ruiz Reyes, G., Ibarra Oropeza, S., Ramírez Zorrilla, M. J. y Castro, R.: *Utilidad clínica de las variaciones de isoenzimas de anhidrasa carbónica eritrocítica en la detección de eritropoyesis megaloblástica*. Rev. Inv. Clín. En prensa.
 17. Ibarra Oropeza, S., Ruiz Reyes, G., Ramírez Zorrilla, M. J., Mendoza López, M. y García García, O.: *Terapia anticonvulsiva, eritropoyesis megaloblástica y anhidrasas carbónicas eritrocíticas*. Por publicarse.
 18. Sánchez Meda, L.: Comunicación personal.
 19. Reynolds, E. H., Milner, G., Matthews, D. M. y Chanarin, I.: *Anticonvulsant therapy, megaloblastic haemopoiesis and folic acid metabolism*. Quart. J. Med. 35: 521, 1966.

COMENTARIO OFICIAL

DR. LUIS SÁNCHEZ-MEDAL¹

LA IDENTIFICACIÓN de la eritropoyesis megaloblástica tiene especial importancia en encuestas sobre el estado nutricional de la población. En efecto, entre las carencias nutritivas más comunes están la de vitamina B₁₂ y la de ácido fólico, nutrientes indispensables para que el tejido eritroblástico madure en forma normal. Al igual que las carencias en diversos nutrientes, la de vitamina B₁₂ y la de ácido fólico son particularmente frecuentes en la mujer embarazada en quien los requerimientos en algunos elementos nutritivos aumentan extraordinaria-

mente. Así se estima que en el tercer trimestre del embarazo el requerimiento diario en ácido fólico es 6 a 8 veces superior al de la mujer no embarazada. Como consecuencia de lo anterior, en el curso del embarazo los niveles séricos de folato disminuyen en forma progresiva y al final del mismo una proporción elevada de embarazadas tienen niveles de folato séricos francamente anormales. La determinación del folato sérico y eritrocítico es ciertamente muy útil en este tipo de estudios, pero por razones técnicas su realización está limitada a un escaso número de laboratorios y, además, no puede usarse como sustituto de la investigación

¹ Académico numerario, Instituto Nacional de la Nutrición.