

Dos nuevas mutaciones de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, G6PD Santiago y G6PD Calvo Mackenna

Patricia Dal Borgo A.¹, Rosario Silva C.¹, Mirta Cavieres A.¹

Resumen

Se describen dos nuevas mutaciones que producen deficiencia de G6PD, ambas en niños chilenos con anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE). La mutación G6PD Santiago es debida a un cambio de arginina a prolina en el aminoácido 198, lo que lleva a una sustitución de guanina por citosina en el nucleótido 593 del exon 6. En la mutación G6PD Calvo Mackenna hay un cambio de valina a isoleucina en el aminoácido 380, lo que produce una sustitución de adenina por guanina en el nucleótido 1138 del exon 10 de la enzima. Los estudios para el diagnóstico de ellas se realizaron en "The Scripps and Research Institute de La Jolla, California, USA" por gentileza del Dr Ernest Beutler.

(**Palabras clave:** Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, G6PD, anemia hemolítica, mutación, enzima.)

Two new glucose 6 phospho-dehydrogenase mutations, G6PD Santiago and G6PD Calvo Mackenna

Two undescribed mutations that produce G6PD deficiency in Chilean boys are documented. Both occurred in patients with hereditary non-spherocytic haemolytic anaemia. G6PD Santiago was due to an Arg-Pro change at amino acid 198 because of a C transition at nucleotide 593. G6PD Calvo Mackenna was due to a A-G transition at nucleotide 1138 resulting in a substitution of valine for isoleucine at amino acid 380. The studies were carried out in the Scripps Research Institute in La Jolla, California, USA by courtesy of Dr. Ernest Beutler.

(**Key words:** G6PD, glucose 6 phosphate dehydrogenase, hemolytic anemia, mutation, enzyme).

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de la G6PD es el déficit enzimático del glóbulo rojo más frecuente en el ser humano, se cree que hay 400 000 millones de personas afectadas, y la razón de ello es que esta deficiencia confiere resistencia a la malaria. Justamente, fue estudiando la anemia hemolítica provocada por

la primaquina, droga antimalárica, que este déficit fue descubierto hace ya 40 años^{1, 2}. La G6PD es una enzima muy antigua en la evolución, ya que se encuentra en todos los organismos vivientes, desde levaduras y protozoos a plantas y animales. En los mamíferos es citoplasmática y se encuentra en todas las células del cuerpo, pero su deficiencia se manifiesta más en los glóbulos rojos posiblemente por tener estos una larga vida sin núcleo y porque contienen proteasas que degradan la enzima mutante más que las proteasas de otros tejidos³.

El rol de la G6PD en el glóbulo rojo es uno metabólico por su potencial reductor. Reduce la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) generando NADPH y oxidando la glucosa-6-fosfato, mantiene así intacto

1. Médicos Pediatras. Unidad de Hematología Hospital Luis Calvo Mackenna.

Trabajo recibido el 22 de mayo de 2000, devuelto para corregir el 31 de agosto de 2000, segunda versión el 14 de septiembre de 2000, aceptado para publicación el 29 de septiembre de 2000.

tos los grupos sulfidrilos y ayuda a detoxificar radicales libres y peróxidos. La deficiencia de esta enzima provoca un daño oxidativo irreversible en él y su muerte⁴. La vida media de esta enzima es de 60 días y refleja paso a paso la edad del glóbulo rojo, ya que este es incapaz de formar nuevas moléculas proteicas y es por esto que el reticulocito tiene 5 veces más actividad enzimática que los glóbulos senescentes.

El déficit de esta enzima se manifiesta en el individuo en 3 formas clínicas: como anemia hemolítica aguda (AHA); como anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE); y en el recién nacido, como anemia hemolítica neonatal (AHN).

Las formas agudas (AHA) aparecen solo bajo estrés, con el uso de drogas (sulfas, nitrofuranos), las infecciones o la ingestión de habas (favismo) y se ve en individuos con las mutaciones más frecuentes, como la Africana (G6PD A-) y la Mediterránea. Los pacientes que heredan la forma crónica (AHCNE) tienen en general anemia moderada con esplenomegalia que no responde a la esplenectomía.

Actualmente se cree que la AHN se debe más a una inmadurez hepática por déficit de la enzima en la célula hepática que a una hemólisis propiamente tal, ya que los recién nacidos no tienen anemia cuando hacen la ictericia^{5, 6}.

En 1984 se clonó el gen de G6PD^{7,8}, está ubicado en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X. Este gen tiene 20 kb de longitud y 13 exones. La secuencia codificadora comienza en el exon 2, ya que el exon 1 no codifica. La enzima normal se denomina G6PD B y es un monómero con una sola cadena polipeptídica de 515 aminoácidos. Este monómero es inactivo y para activarse necesita la presencia de NADP, con lo cual se transforma en un dímero o un tetramero.

CASOS CLÍNICOS

Paciente N° 1: D.L.M., nació el 6 de agosto de 1992 después de un embarazo normal de 36 semanas de gestación, pesó al nacer 2 700 g y midió 46 cm. La madre era Rh(-) sensibilizada, Coombs (+++) por lo que el paciente fue transfundido 3 veces en el período de recién nacido y luego se controló en varias oportunidades por su anemia

hemolítica. Llamó la atención la persistencia de ella después del año de edad con reticulocitos siempre discretamente elevados (entre 4 y 7%). Los valores de la serie roja al año de edad eran hematocrito (Hto) 33%, hemoglobina (Hb) 9,9 g/dl y reticulocitos (retic) 5%.

Se hizo electroforesis de Hb que reveló un *pattern* normal (HbA 97%, Hb fetal [HbF] 0,47%, Hb A₂ 2,9%). Se cuantificó la G6PD que estaba muy disminuida: 0,42 UI/grHb (normal: 5,0-7,1). La madre (de ancestro italiano) también tenía una anemia con Hto 35%, Hb 11,6 g/dl, retic 3,5% y su G6PD es de 1,5 UI/grHb, 24% de lo normal. Se envió una muestra de sangre del paciente al Scripps Institute para su estudio molecular y se informó hallazgo de una nueva mutación no descrita en el exon 10.

Actualmente el paciente tiene 7 años de edad y presenta Hto 31%, Hb 9,8 g/dl y retic 12%.

Paciente N° 2: C.N.D., nació el 5 de junio de 1980 después de un embarazo de 33 semanas de gestación con un peso de 1 700 g. Fue transfundido la primera semana de vida por ictericia y anemia. A los 9 meses de edad se hospitalizó por una crisis hemolítica al indicársela nitrofurano por un cuadro diarreico; en esa oportunidad se realizó fragilidad osmótica que fue normal, test de Coombs que fue (-) y hemograma a los padres. La madre tenía una anemia no regenerativa con cifras de Hto 36%, Hb 11,1 g/dl, VCM 80 fL, retic 1,6% y una ferremia normal.

Se solicitó estudio de enzimas al niño (G6PD y piruvato kinasa en glóbulo rojo), que la madre no realizó. El paciente no volvió a control hasta los 4 años de edad, fecha en la que nuevamente se hospitalizó por otra crisis hemolítica (Hto 12%, Hb 4,2 g/dl y retic 3,4%). En esta oportunidad se palpó el bazo a 3 cm bajo el reborde costal. Se transfundió con glóbulos rojos y al interrogar a la madre esta relató que el niño tuvo otro episodio similar 6 meses antes, con ictericia y coluria. Desde esa fecha asiste a controles periódicos, constatándose una hemólisis crónica con episodios hemolíticos más intensos ante cuadros febriles, su Hto varía entre 26 y 35%, las de Hb entre 8 y 10,6 g/dl y los reticulocitos entre 9 y 40%.

Los niveles de G6PD en este paciente estaban muy disminuidos: 0,46 UI/grHb siendo lo normal de 5,0 a 7,1 y tenía una HbF levemente aumentada 2,5% (normal < 1%).

En octubre de 1991 se envió una muestra de sangre del paciente al Scripps Research Institute, donde se informó haber encontrado una mutación de G6PD no descrita en el exon 6.

Análisis mutacional. El análisis del DNA de los pacientes se hizo en el Departamento de Medicina Molecular y Experimental del Instituto Scripps de La Jolla, California, gracias a la cooperación del Dr Ernest Beutler. Se obtuvo DNA por métodos convencionales y se examinaron buscando G6PD A- y G6PD Mediterránea, que no se encontraron. Posteriormente los exones 2, 5, 6, 8, 10, 11, 12 y 13 se sometieron a análisis conformacional polimórfico.

La reacción de polimerasa en cadena (PCR) se hizo en un sistema de 10 ul, las muestras se desnaturalizaron a 98 °C por 4 min y luego a 94° por 30 seg, 58 °C por 30 seg y 72° por 45 seg en presencia de 8uC alfa-P-dATP (Amersham, 3000 Ci/mmol); después de 30 ciclos de PCR se agregó 8 ul de buffer al fondo de cada muestra y estas se desnaturalizaron a 98° por 3 min. Con 3 ul de la muestra se hizo electroforesis en gel al 5% de acrilamida neutral y 5% de glicerol durante 6 horas (25W), luego se hizo análisis secuencial del DNA amplificado por PCR y la confirmación de las mutaciones se hizo secuenciando las hebras o bien por análisis de restricción.

En el paciente C.N.D., al someter el DNA a análisis polimórfico conformacional de una hebra, se encontró un fragmento amplificado anormal en el exon 6. El exon 6 se secuenció en ambas direcciones y se identificó la mutación que destruía un sitio de restricción Sfa NI. Esta mutación es en el nucleótido 593 del DNA en donde hay una sustitución de guanina por citosina, lo que produce un cambio en el aminoácido 198 de arginina por prolina. Se la denominó G6PD Santiago.

En el paciente D.L.M. se encontró una mutación en el nucleótido 1138 del exon 10 con un cambio de adenina a guanina con lo cual en el aminoácido 380 hay un cambio de isoleucina a valina. Se la llamó G6PD Calvo Mackenna.

DISCUSIÓN

La Organización Mundial de la Salud⁹ ha categorizado las variantes de G6PD según

la actividad enzimática y la expresión clínica en cinco clases:

- Clase I < 20% de actividad enzimática y son las causantes de la AHCNE.
- Clase II < de 10% de actividad G6PD Mediterránea), cursa con AHA.
- Clase III > de 10% de actividad (G6PD A), cursa con AHA.
- Clase IV actividad enzimática normal, asintomática.
- Clase V actividad enzimática aumentada, asintomática.

Los pacientes con las variantes comunes de G6PD, como son las II y III, no tienen anemia hemolítica, salvo que se expongan a drogas u otra forma de estrés. Las variantes IV y V no producen manifestación clínica. En cambio, en la clase I la funcionalidad de la enzima formada es tan pobre que la sobrevivencia del glóbulo está muy acortada, aun sin estrés. Estos pacientes frecuentemente tienen esplenomegalia y la anemia no se corrige con una esplenectomía.

El estudio electroforético y las propiedades eméticas de la enzima residual hizo notorio que no todas las poblaciones mundiales tienen la misma mutación. Se han descrito más de 400 mutaciones y las hay de 2 tipos, las variantes polimórficas frecuentes en áreas de malaria endémica y las esporádicas. De las polimórficas, en África existe la G6PD A+, la G6PD A- y la Santa María; en Europa, la Mediterránea con sus diversas variantes, y en Asia, la Canton es la más frecuente^{10, 11}. Las variantes esporádicas ocurren en cualquier lugar del mundo en muy baja frecuencia y son casi siempre del tipo AHCNE.

Hay alrededor de 100 mutaciones cuyas secuencias génicas han sido determinadas. Estas se han identificado en todos los exones, salvo el exon 1 que no tiene secuencia codificadora. 25% de las mutaciones conocidas están en el exon 10, y de ellas, todas, menos 2 que se encuentran en el extremo 5' del exon, son de clase I¹²⁻¹⁵. Se cree que en este exon se encuentra el sitio de unión del NADP, porque algunas de estas variantes se activan con altas concentraciones de NADPH, compuesto íntimamente relacionado con el metabolismo del glutatión, que está presente en todas las células y cuya función es prevenir el daño oxidativo tanto endógeno como exógeno de ellas. Otra posibilidad se-

ría que esta zona fuera una de contacto de subunidades, que sería el sitio donde los dos monómeros interactúan para formar el dímero y las mutaciones en este lugar alterarían la estabilidad de la enzima¹⁶.

Las mutaciones pueden deberse a deleciones o a mutaciones puntuales, afectando la transcripción, procesamiento o la estructura primaria misma de la enzima y la sustitución de aminoácidos que estas mutaciones provocan (casi siempre de tan solo 1), alteran la función de la enzima ya sea por disminución de la estabilidad de ella o afectando la función catalítica de la G6PD¹⁷. Aunque la actividad enzimática sea muy baja (1%), nunca está totalmente ausente.

De las dos nuevas variantes descritas en este artículo, una de ellas se ubica en el exon 10, lo que reafirma la tendencia de estas mutaciones que producen ACHNE a agruparse en el supuesto sitio de unión de NADP (exon 10) o en la zona de unión de la G6P (exon 6).

REFERENCIAS

1. Beutler E: The hemolytic effect of primaquine and related compounds: a review. *Blood* 1959; 14: 103-39.
2. Bienzle U, Ayeni O, Lucas A, Luzzatto L: Glucose 6 phosphate dehydrogenase and malaria. *Lancet* 1972; 1: 107-10.
3. Beutler E: Selectivity of proteasas as a basis for tissue distribution of enzymes in hereditary deficiencies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80: 3767-8.
4. Arese P, De Fioresi A: Pathophysiology of hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Seminars of Hematology* 1990; 27: 1-40.
5. Vales T: Severe neonatal jaundice associated with glucose-6-dehydrogenase deficiency: pathogenesis and global epidemiology. *Acta Paediatrica* 1994; 83 (Suppl. 394): 58-76.
6. Luzzatto L: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hemolytic anemia. In: Nathan DG, Oski FA (eds.). *Hematology of Infancy and Childhood*. 5th edition, Philadelphia, Pennsylvania WB, Saunders Company 1998: 704-726.
7. Toniolo D, Persico MG, Battistuzzi G, et al: Partial purification and characterization of the messenger RNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Mol Biol Med* 1984; 2:89-103.
8. Beutler E: The genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Semin Hematol* 1990; 27: 137-64.
9. Betke K, Beutler E, Brewer GJ, et al: Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Report of a WHO scientific group. *WHO Tech Rep Ser* 1967; N° 366.
10. Beutler E: G6PD: Populations genetics and clinical manifestations. *Blood Reviews* 1996; 10: 45-52.
11. Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 1994; 84: 3613-36.
12. Beutler E, Westwood B, Melemed A, Dal Borgo P, Margolis D: Three new exon 10 glucose-6-dehydrogenase mutations. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 64-72.
13. Beutler E, Westwood B, Prchal J, Vaca G, Bartsocas CS, Baronciani L: New G6PD mutations from various ethnic groups. *Blood* 1992; 80: 255-6.
14. Beutler E, Mathai CK, Smith JE: Biochemical variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. *Blood* 1968; 31: 131.
15. Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *N Engl J Med* 1991; 324: 169-74.
16. Mason PJ: New insights into G6PD deficiency. *Br J Haematol* 1996; 94: 585-91.
17. Mason PJ, Vulliamy TJ, Bautista JM, Luzzatto L, Naylor C, Adams M: The three dimensional structure of G6PD helps to explain G6PD deficiency. *Blood* 1994; 84 (Suppl.): 14a.