

Instituto de Hematología e Inmunología

## ENZIMAS DE LA BIOSÍNTESIS DEL GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH). VALORES NORMALES Y ESTUDIO DE UN PACIENTE CON DEFICIENCIA DE GSH

Dra. Marianela Estrada del Cueto, Lic. Gisela Molina Matos, Lic. Alina Gutiérrez Campo y Téc. Graciela Pérez Díez de los Ríos

### RESUMEN

Se estandarizaron las técnicas de actividad de  $\gamma$ -glutamyl cisteil sintetasa y glutatión sintetasa con el objetivo de estudiar los pacientes con deficiencia congénita de glutatión reducido. Los valores normales encontrados en nuestro laboratorio no presentaron diferencias significativas con los señalados por otros autores. Se estudiaron varios miembros de una familia con deficiencia de glutatión reducido. Los estudios bioquímicos excluyeron la posible deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En el propósito y un hermano (G.D.R.) se encontró deficiencia de glutatión sintetasa. Ambos presentan una anemia hemolítica congénita no esferocítica, con hemólisis crónica e íctero que se exagera en el transcurso de procesos infecciosos y también litiasis vesicular. Ninguno presentó acidosis metabólica ni trastornos neurológicos progresivos, por lo que ambos son portadores de la forma benigna de la enfermedad. En el padre y otro hermano, los resultados del estudio hematológico y bioquímico indican que posiblemente son heterocigóticos para la deficiencia de esta enzima. Esta es la primera familia con deficiencia de glutatión sintetasa encontrada en nuestra población.

*Descriptores DeCS:* GLUTATION/deficiencia; GLUTATION SINTETASA/deficiencia; GLUTATION SINTETASA/genética; GLUTAMATO-CISTEINA LIGASA/genética; ANEMIA HEMOLITICA CONGENITA/genética.

El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido que se encuentra presente en elevadas concentraciones dentro del eritrocito (2 mM). Su función fundamental es proteger a la célula contra la acción de agentes oxidantes endógenos y exógenos, así como mantener la estabilidad de la membrana. También participa en el mantenimiento de la estructura de la hemoglobina, en la síntesis de proteínas en

los reticulocitos, así como preserva la integridad de algunas enzimas y proteínas de la membrana.<sup>1-3</sup>

Este metabolito se sintetiza en 2 reacciones dependientes de adenosina trifosfato (ATP). En la reacción de la  $\gamma$ -glutamyl cisteil sintetasa ( $\gamma$ -GCS) se forma un dipéptido a partir del ácido glutámico y la cisteína, y en el segundo paso actúa la glutatión sintetasa (GS), la cual agrega

glicina al dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína.<sup>1,4</sup> La deficiencia de estas 2 enzimas es muy rara, pero en ambos casos los niveles de GSH se encuentran disminuidos, por lo que fundamentalmente se produce un cuadro de anemia hemolítica de intensidad variable.<sup>4-6</sup>

Aunque en la deficiencia de  $\gamma$ -GCS se observan niveles muy bajos de GSH, la anemia es de ligera a moderada y el patrón de herencia es autosómico recesivo.<sup>7</sup>

La deficiencia severa de GS se transmite también de forma autosómica recesiva, y se pueden observar 2 fenotipos: anemia hemolítica aislada o enfermedad multisistémica con anemia hemolítica, acidosis metabólica, 5-oxoprolinuria y disfunción neurológica asociada con el síndrome hemolítico.<sup>4,8,9</sup>

Además de la hemólisis crónica que acompaña a estas 2 enzimopatías, los pacientes son susceptibles de presentar episodios agudos de hemólisis por estrés oxidativo con la formación de cuerpos de Heinz.<sup>4</sup>

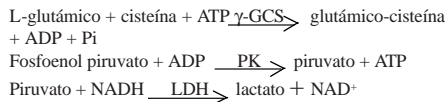
El objetivo de este trabajo es estandarizar las técnicas de actividad de  $\gamma$ -GCS y GS y presentar los estudios de una familia con deficiencia de GSH.

## MÉTODOS

Para la estandarización de las técnicas de actividad enzimática de  $\gamma$ -GCS y GS se utilizaron muestras de 30 individuos sanos donantes voluntarios del banco de sangre obtenidas por punción venosa, utilizando heparina como anticoagulante, conservadas a 4 °C y procesadas antes de las 4 horas de realizada la extracción. Los hematíes se lavaron 3 veces con solución salina fisiológica (0,9 % NaCl) a 3 000 rev/min y 4 °C durante 10 minutos y se conservaron a 4 °C hasta el momento de

preparar los hemolizados para la determinación enzimática.

Para la actividad de la  $\gamma$ -GCS se empleó la técnica señalada por *Beutler*<sup>5</sup> y *Four- Seeling*, que se basa en la siguiente reacción:<sup>10</sup>



Reactivo	$\mu\text{L}$
Tris/HCl 1M pH 8	100
KCl 1M	100
MgCl <sub>2</sub> 0,4M	50
ATP 50 mM	40
NADH 5mM	40
PEP 25 mM	100
L-cisteína 100 mM	100
L-glutámico 100 mM	100
PK 0,5 U	50
LDH 0,5 U	100
Hemolizado 1/20	50
H <sub>2</sub> O	170

Se registró el cambio de densidad óptica ( $\Delta$ DO) por minuto a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 340 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV/visible, producto de la transformación del NADH en NAD<sup>+</sup>.

Los g Hb se determinaron agregando 200  $\mu\text{L}$  del hemolizado a 5 mL de solución de Drabkin y multiplicando por un factor (3,68) la absorbancia (DO) a una  $\lambda$  de 540 nm.

Los resultados de actividad enzimática (AE) se expresaron en unidades internacionales (UI) por gramo de hemoglobina (g Hb) según la siguiente fórmula:

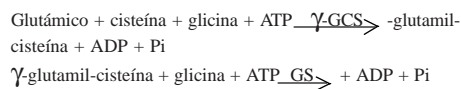
$$AE = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times \frac{1}{6,22} \times \frac{1}{0,05} \times \frac{10^2}{g \text{ Hb}}$$

donde:

6,22: coeficiente de extinción molar en NADH.

- 0,05: volumen de hemolizado en la mezcla de reacción.  
 10<sup>2</sup>/g Hb: para expresar la actividad en g % de Hb.  
 1: volumen final de la mezcla de reacción.

El principio de la determinación de GS es el siguiente:



Se empleó un método colorimétrico midiendo el fósforo inorgánico (Pi) producido durante la reacción de la  $\gamma$ -GCS y restándole éste al total liberado durante las 2 reacciones enzimáticas.<sup>11</sup>

El sistema de ensayo utilizado fue el siguiente:

Reactivo	Blanco (mL)	Dipéptido (mL)	Tripéptido (mL)
Cisteína 12 $\mu$ M	-	0,4	0,4
Glutámico 12 $\mu$ M	-	0,4	0,4
Glicina 12 $\mu$ M	-	-	0,4
ATP 12 $\mu$ M	0,2	0,2	0,2
Ditioeritrol (DTT) 12 $\mu$ M	0,2	0,2	0,2
KCl 22,5 $\mu$ M	0,1	0,1	0,1
MgCl <sub>2</sub> 22,5 $\mu$ M	0,1	0,1	0,1
Imidazol/ HCl 60mM PH8	0,2	0,2	-
Hemolizado ajustado a 10 mg Hb/ $\mu$ L	-	0,2	0,2
Incubar a 37 °C durante 1 hora			
Ácido tricloro-acético al 10 %	2,0	2,0	2,0
Hemolizado a 10 mg Hb/mL	0,2	-	-

Cisteína 12 $\mu$ M	0,4	-	-
Glutámico 12 $\mu$ M	0,4	-	-
Glicina 12 $\mu$ M	0,4	0,4	-
Filtrar			

Para la determinación de fósforo inorgánico se tomaron 0,3 mL del filtrado + 50  $\mu$ L de molibdato de amonio al 2,5 % + 50  $\mu$ L de ácido ascórbico al 5 % + 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada.

Se incubó 10 minutos a la oscuridad y se leyó a una  $\lambda$  de 578 nm. Para la determinación de la concentración del dipéptido y del tripéptido se realizó una curva patrón de Pi (tabla 1).

Se mezclaron bien cada uno de los tubos y se tomaron 0,3 mL de cada uno + 50  $\mu$ L de molibdato de amonio al 2,5 % + 50  $\mu$ L de ácido ascórbico + 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada.

Se leyó la DO igualmente a una  $\lambda$  de 478 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu$ M de Pi liberado/h/mL de hematíes, de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{Pi} = \frac{\mu\text{M} \times 4}{3} \times 10$$

donde:

- 4: volumen en mL de la mezcla de reacción sin coloración.  
 3: volumen en mL de la curva patrón sin coloración.  
 $\mu$ M: micromoles de Pi obtenidos en la curva patrón a partir del valor de DO encontrado.  
 10:  $\frac{2}{0,2}$  donde 2 es la dilución del hemo-0,2 lizado y 0,2 es el volumen empleado para el ensayo.

Al dipéptido se le restó el tripéptido y se obtuvo el valor de la glutatión sintetasa.

Se determinó la media ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar ( $\pm 1\text{DS}$ ) y se establecieron los valores normales de la  $\gamma$ -GCS y GS.

Se estudió una familia con deficiencia congénita de GSH.

TABLA 1. Curva patrón de fósforo inorgánico para la determinación de la concentración del dipéptido y tripéptido

Reactivos	Blanco	0,5 µM	1µM	1,5 µM	2 µM	2,5 µM	3 µM	3,5 µM	4 µM	4,5 µM	5 µM
Solución I	-	0,5	1,0	1,5	-	-	-	-	-	-	-
Solución II	-	-	-	-	1,0	1,25	-	-	-	-	-
Solución madre	-	-	-	-	-	-	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
H <sub>2</sub> O destilada	1,5	1,0	0,5	-	0,5	0,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0
TCA 10 %	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Solución madre de Pi= fosfato monobásico de sodio 10 µM.

Solución I= dilución 1/5 de la solución madre.

Solución II= dilución 1/10 de la solución madre.

## DESCRIPCIÓN DEL CASO

L.D.R., paciente de la raza blanca, sexo femenino y 25 años de edad, que desde 1980 ingresó en varias ocasiones en el Hospital «William Soler» por presentar ictericia.

En 1980 los hallazgos clínicos y de laboratorio más importantes fueron: bilirrubina indirecta elevada, esplenomegalia de 2 cm, Hb 118 g/L y tinte icterico en las esclerótidas.

Los resultados de la biopsia hepática y la laparoscopia realizada en 1981 mostraron hígado de características normales con gránulos de pigmentos biliares. Se mantuvo el aumento de bilirrubina indirecta y la hepatomegalia de 3 cm.

En enero de 1986 ingresó nuevamente y el estudio de las pruebas funcionales hepáticas y el hierro sérico fueron normales. Presentó litiasis vesicular, hepatoesplenomegalia ligera, bilirrubina indirecta elevada y Hb 134 g/L.

En febrero de 1987 fue remitida al Departamento de Enzimas del Instituto de Hematología para el estudio de una posible anemia hemolítica, donde se observó: Hb 126 g/L, conteo de reticulocitos 7,2 % y bilirrubina indirecta aumentada.

El análisis de la historia familiar mostró que G.D.R., hermano de L.D.R. ingresó en el hospital «Carlos J. Finlay» en septiembre de 1986 con el diagnóstico de sepsis

generalizada. Presentaba íctero, orinas oscuras, esplenomegalia, Hb 112 g/L, conteo de reticulocitos 20 %, litiasis vesicular, antígeno de superficie de hepatitis B negativo y actividad y electroforesis de G6PD normal. M.R.A., la madre del propósito, falleció en 1978 a consecuencia de una neoplasia de cuello del útero.

Al propósito, a 2 hermanos y al padre se les realizó actividad de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), 6-fosfogluconico deshidrogenasa (6PGD), glutatión reductasa (GR),  $\gamma$ -GCS, GS y la determinación y estabilidad del GSH.<sup>10-13</sup> Al paciente se le determinó también la actividad de piruvato kinasa (PK), fosfoglicerato kinasa (PGK), hexokinasa (Hx) y deshidrogenasa láctica (LDH).

## RESULTADOS

Los valores normales de  $\gamma$ -GCS y GS encontrados en nuestro laboratorio fueron  $3,22 \pm 0,64$  ( $\bar{X} \pm 1DS$ ) UI/g Hb y  $1,468 \pm 1,117$  ( $\bar{X} \pm 1DS$ ) µM de Pi liberado/h/mL de hematies.

En la tabla 2 se muestran los parámetros hematológicos del propósito y los familiares estudiados. El conteo de reticulocitos se encontró aumentado en todos los casos, excepto en el padre. En un hermano (G.D.R.) y el padre se observó una disminución de las cifras de hemoglobina.

TABLA 2. Estudio hematológico del propósito y sus familiares

	Hemoglobina (g/L)	Conteo de reticulocitos (%)
Propósito	137	7,3
Hermano (G.D.R.)	112	20,0
Hermano	159	5,0
Padre	122	0,8

En la tabla 3 se presentan los niveles y estabilidad del GSH y la actividad de las enzimas eritrocitarias estudiadas. La actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y de 6-fosfogluconico deshidrogenasa (6PGD) se encontró dentro de límites normales en todos los casos. En el paciente y un hermano (G.D.R.) la actividad de LDH se observó muy elevada, con un patrón de isoenzimas 1,2 aumentada y 3 ligeramente aumentada.

Los niveles de GSH se encontraron disminuidos en el propósito y un hermano (G.D.R.), mientras que el padre y el otro hermano mostraron niveles normales. La estabilidad de GSH fue del 100 % en todos los casos. No se detectó actividad de GS en el propósito y un hermano (G.D.R.), mientras que en el padre se observó un valor intermedio (63,5 % del valor normal) y el otro hermano mostró actividad normal. La actividad de  $\gamma$ -GCS se encontró aumentada en los 2 casos con deficiencia de GS.

## DISCUSIÓN

Se han desarrollado varias técnicas para la determinación de la actividad enzimática de la GS y la  $\gamma$ -GCS mediante métodos espectrofotométricos, colorimétricos y radioisotópicos.<sup>5,10,11,14</sup> Nosotros seleccionamos aquéllas que fueran fáciles de reproducir en nuestras condiciones de trabajo y que además dieran resultados confiables. Los valores normales encontrados para estas 2 enzimas no presentan diferencias significativas con los señalados por otros autores, por lo que consideramos que pueden ser empleados para el diagnóstico de estas 2 eritroenzimopatías congénitas.<sup>5,10,11</sup>

Aunque el propósito tenía cifras de hemoglobina normales, el conteo de reticulocitos se encontró aumentado. El hermano G.D.R. presentó cifras de hemoglobina disminuidas y conteo de reticulocitos muy elevado, lo que conjuntamente con los otros resultados de laboratorio y las manifestaciones clínicas observadas, permitió concluir que es portador de una anemia hemolítica crónica. El padre y el otro hermano no presentan ninguna manifestación clínica. En el primero la hemoglobina se encontraba ligeramente disminuida y en el segundo el conteo de reticulocitos estaba ligeramente elevado.

TABLA 3. Estudio bioquímico del propósito y sus familiares

	GSH (mg %)	Estabilidad GSH (%)	G6PD (U/g Hb)	6PDG (U/gHb)	$\gamma$ -GCS (U/gHb)	GS (mM Pi/h mL GR)
Propósito	6,1	100	5,29	4,11	4,02	0
Hermano (G.D.R.)	5,8	100	6,5	5,8	5,6	0
Hermano	12,8	100	6,08	4,72	3,97	2,26
Padre	20,8	100	5,67	7,34	5,7	0,938
Valores de referencia	13,43-26,47	> 70	4,54-11,84	5,4-10,3	2,58-3,56	0,351-2,585

Los resultados del estudio bioquímico permitieron descartar la presencia en esta familia de una deficiencia de G6PD, que es la eritroenzimopatía hereditaria más frecuente en nuestra población.

Los niveles de GSH disminuidos en el propósito y un hermano hicieron sospechar la posibilidad de una deficiencia de una de las 2 enzimas que intervienen en la síntesis de este metabolito y el estudio de éstas permitió demostrar que ambos son portadores de una deficiencia de GS. En el padre se observó un valor intermedio (63,9 %) y el otro hermano mostró actividad normal.

De acuerdo con el patrón de herencia de esta enfermedad, el padre, al igual que la madre, son portadores obligados, pero de variantes estructurales diferentes, ya que no existe consanguinidad entre ambos. El hermano que mostró actividad enzimática normal debe ser también heterocigótico, ya que presentaba reticulocitosis al momento del estudio y tiene antecedentes de ictericia ligera durante la infancia.

La actividad de la  $\gamma$ -GCS estaba aumentada en todos los casos. Esto puede ser debido a que con niveles bajos de GSH (inhibidor por retroalimentación de la  $\gamma$ -GCS), se produce una elevación de la actividad de esta enzima. Este hecho no se

observa en el padre y un hermano, ya que ambos tienen niveles normales de GSH. No se puede descartar que existan otros mecanismos de control de la síntesis del GSH que se estimulen bajo determinadas condiciones, como por ejemplo, variaciones de las concentraciones normales de los aminoácidos que se encuentran involucrados en el ciclo del  $\gamma$ -glutamil.<sup>8,9,15</sup>

El propósito y un hermano (G.D.R.) son portadores de una anemia hemolítica congénita no esferocítica (AHCNE) que se exagera durante los procesos infecciosos, con la aparición de orinas oscuras. La presencia de litiasis vesicular, acidosis metabólica y trastornos neurológicos en esta enfermedad, han sido señalados por otros investigadores.<sup>5,6,8,15</sup> No obstante, se ha descrito una forma benigna de la enfermedad en la cual la disminución de la actividad enzimática se detecta sólo en los glóbulos rojos.<sup>4,5,8</sup>

Aunque nuestros 2 casos presentaron litiasis vesicular, producto posiblemente de la hemólisis crónica, no se demostró ningún trastorno neurológico ni tampoco acidosis metabólica, por lo que ambos son portadores de la forma benigna de la enfermedad. Esta es la primera familia con deficiencia de GS encontrada en nuestra población.

## SUMMARY

---

The techniques of the activity of gamma glutamyl cysteal synthetase and glutathione synthetase were standardized aimed at studying those patients with congenital deficiency of reduced glutathione. The normal values found in our laboratory did not have significant differences compared with those mentioned by other authors. Several members of a family with deficiency of reduced glutathione were studied. The biochemical studies excluded the possible deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. In the main case and a sibling (G.D.R.) it was found a deficiency of glutathione synthetase. Both present a non-spherocytic congenital hemolytic anemia with chronic hemolysis and icterus that exacerbate in the course of infectious processes, and gall stones, too. No one presented metabolic acidosis or progressive neurologic disorders, since both are carriers of the benign form of the disease. In the father and other sibling the results of the

hematological and biochemical study show that they are possibly heterozygotic for the deficiency of this enzyme. This is the first family with glutathione synthetase deficiency found in our population.

*Subject headings:* GLUTATHIONE/deficiency; GLUTATHIONE SYNTHASE/deficiency; GLUTATHIONE SYNTHASE/genetics; GLUTAMATE-CYSTEINE LIGASE/deficiency; GLUTAMATE-CYSTEINE LIGASE/genetics; ANEMIA, HEMOLYTIC CONGENITAL/genetics.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Meister A, Tate SS. Glutathione and related  $\gamma$ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann Rev Biochem* 1976;45:559.
2. ———. Metabolism and function of glutathione. *Trends Biochem Sci* 1981;6:231.
3. Bannai S, Tateishi N. Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Membr Biol* 1986;89:1.
4. The metabolic and molecular bases of inherited disease. CD-ROM. McGraw-Hill, 1997.
5. Beutler E, Gelbart T, Pegelow C. Erythrocyte glutathione synthetase deficiency leads not only to glutathione synthetase deficiency but also to glutathione-S-transferase deficiency. *J Clin Invest* 1986;77:38.
6. Larsson A, Zetterstrom R. Pyroglutamic aciduria (5-oxoprolinuria), and inborn error in glutathione metabolism. *Pediatr Res* 1974;8:852.
7. Beutler E. Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism. New York: Plenum Medical Book, 1978.
8. Ristoff E, Larsson A. Patients with genetic defect in the gammaglutamyl cycle. *Chem Biol Interact* 1998;111-112:113.
9. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* 1998;111-112:1.
10. Foure-Seeling G, Meister A. Gamma glutamyl cysteal synthetase from erythrocytes. *Ann Biochem* 1984;141:510.
11. Boivin P, Galand C, Andre R, Debray J. Anemias hemolitiques congenitales avec deficit isole en glutathione reduit par deficit en glutathione synthetase. *Nour Rev Fr Hematol* 1966;6:859.
12. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Löhr GW, Ramot B, Valentine WN. International Committee for Standardization in Hematology. recommended methods for red-cell enzyme analysis *Br J Haematol* 1977;35:331.
13. Beutler E. The glutathione instability of drug sensitive red cell. A new method for the in vitro detection of drug sensitivity. *J Lab Clin Med* 1957;49:84.
14. Lestas AN, White JM. A reappraisal of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase activity in haemolysates from normal erythrocytes by two different methods. *Ann Int Biochem* 1983;20:241.
15. Wellner VP, Sekura R, Meister A, Larsson A. Glutathione synthetase deficiency, an inborn error of metabolism involving the  $\gamma$ -glutamyl cycle in patients with 5-oxoprolinuria. *Proc Natl Acad Sci* 1974;71:2505.

Recibido: 22 de diciembre de 1998. Aprobado: 20 de enero de 1999.

Lic. *Marianela Estrada del Cueto*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléf. (537)578268. Fax(537)338979.e-mail:ihidir@hemato.sld.cu