

Caracterización molecular de variantes de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) en la población cubana

Molecular characterization of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in the Cuban population

DraC. Marianela Estrada del Cueto; MsC. Mayelín Herrera García; Dra. Clara Mayo de las Casas; Téc. Graciela Pérez Diez de los Ríos

Instituto de Hematología e Inmunología. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

La deficiencia de G6PD es la eritroenzimopatía más común en el mundo. Se realizó el estudio molecular de 50 variantes de G6PD con actividad enzimática disminuida y/o portadores de variantes electroforéticas. De 38 pacientes con variantes rápidas, 33 fueron G6PD A^{-376/202}; 3 G6PD A^{-376/968} (clase 3) y 2 fueron variantes raras. Siete variantes deficientes con movilidad electroforética normal fueron clasificadas como G6PD Santamaría^{376/542} (clase 2). De los 4 casos con variantes lentas, uno es portador de la G6PD Sao Borja³³⁷ (clase 4); los otros 2 son variantes electroforéticas raras con actividad normal. En un paciente con AHCNE no se pudo determinar la variante molecular (clase 1). La variante más frecuente en nuestra población fue la G6PD A^{-376/202}, que es un marcador de la raza negra. No se encontró ningún paciente con la variante Mediterránea. Este es el primer estudio molecular de la G6PD realizado en Cuba.

Palabras clave: mutaciones de la G6PD, variantes bioquímicas de G6PD, PCR, deficiencia de G6PD.

ABSTRACT

G6PD deficiency is the most common erythroenzymopathy in the world. The molecular study of 50 variants of G6PD with diminished enzymatic activity and/or carriers of electrophoretic variants was conducted. Of 38 patients with rapid variants, 33 were G6PD A^{-376/202}; 3 were G6PD A^{-376/968} (class 3) and 2 were rare variants. Seven deficient variants with normal electrophoretic mobility were classified as G6PD Santamaría^{376/542} (class 2). Of the 4 cases with slow variants, one was carrier of G6PD Sao Borja³³⁷ (class 4); other 2 were rare electrophoretic variants with normal activity. In a patient with CNSHA it was not possible to

determine the molecular variant (class 1). The most frequent variant in our population was G6PD A- 376/202 that is a marker for the black race. No patient with Mediterranean variety was found. This was the first molecular study of G6PD conducted in Cuba.

Key words: G6PD mutations, biochemical variants of G6PD, PCR, G6PD

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la eritroenzimopatía más frecuente y mejor estudiada del mundo, que afecta alrededor de 400 millones de personas.^{1,2} En las zonas de África tropical, Europa del este, Asia tropical y subtropical y la zona del Mediterráneo, se puede observar hasta una frecuencia del 40 % de individuos afectados. La frecuencia en Cuba es del 4,99 % en pacientes del sexo masculino.¹⁻⁴

La deficiencia de G6PD presenta un patrón de herencia ligado al cromosoma X y es muy heterogénea desde el punto de vista genético. El descubrimiento de más de 400 variantes bioquímicas diferentes ha demostrado la aparición de mutaciones en el gen de la G6PD,^{1,5} las que son generalmente responsables de la diversidad en el cuadro clínico de esta patología, aunque muchas de ellas son silentes y solo resultan de interés desde el punto de vista de la genética poblacional.⁴

Los pacientes con esta enzimopatía presentan una anemia hemolítica de intensidad variable, aunque sus manifestaciones clínicas más importantes son la ictericia neonatal y los episodios hemolíticos causados por la ingestión de drogas, habas limas, o en el transcurso de procesos infecciosos severos. En un grupo reducido de casos, el cuadro clínico es más severo y se acompaña de anemia hemolítica congénita no esferocítica (AHCNE).⁶⁻¹⁰

Los estudios moleculares de la G6PD se iniciaron en 1985 con la clonación del gen situado en la región q28 del cromosoma X, lo que permitió determinar la secuencia del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA). A partir de esa fecha se comenzaron los estudios de posibles polimorfismos del gen y se ha podido conocer la naturaleza de la mutación implicada en más de 50 variantes de G6PD, las cuales solo habían sido caracterizadas hasta esos momentos por criterios hematológicos, bioquímicos y clínicos.¹¹ Algunas de estas mutaciones crean sitios de restricción para endonucleasas, por lo que se pueden detectar mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹² Aparecen también otras variantes esporádicas donde no se ha podido determinar la mutación específica y ha sido necesaria la secuenciación del gen.¹³

En este trabajo nos proponemos determinar las alteraciones moleculares del gen de la G6PD más frecuentes en nuestra población.

MÉTODOS

Se estudiaron muestras de sangre total obtenidas por punción venosa correspondientes a 50 individuos deficientes de G6PD o portadores de variantes electroforéticas con actividad de G6PD normal, remitidos por los servicios de Hematología de todo el país.

Para el diagnóstico de deficiente de G6PD o portador de variante electroforética se determinó la actividad y electroforesis de G6PD utilizando los métodos establecidos por el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología.¹⁴⁻¹⁷

La muestra de DNA se obtuvo por los procedimientos estándares.¹⁶

El estudio molecular de las variantes más frecuentes (G6PD A⁻, G6PD A, G6PD Mediterránea, G6PD Santamaría) se realizó por la técnica del PCR empleando 1 mL de DNA resuspendido en *buffer* TE en un volumen final de 50 mL que contenía 5 mL de *buffer* G6PD (Tris-HCl 540 mM, MgCl₂ 54 mM, EDTA 54 mM, SO₄(NH₄)₂ 133 mM); 1 mL de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 10 mM); 0,2 mL de cebadores específicos ([tabla 1](#)) para cada exón; 0,1 mL de TAQ polimerasa y agua destilada estéril hasta completar el volumen final.

La reacción comienza con una desnaturalización inicial de 10 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de alineación hibridación a 60 °C y 1 min de extensión a 72 °C. Para las variantes G6PD Med y Santamaría la hibridación transcurre a 56 °C.

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados se les realizó una digestión con endonucleasas de restricción específicas para cada exón ([tabla 1](#)). Las digestiones se realizaron a una temperatura de 37 °C durante toda la noche, excepto para la mutación del exón 9 (nucleótido 968) que se incubó a 56 °C.

Todos los casos fueron procesados siempre con un control negativo (G6PD B) y un positivo para cada mutación analizada.

Para la comprobación de la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio. Se utilizó bromofenol azul como indicador y el marcador de peso molecular fue el X-f174 RF DNA. Los fragmentos amplificados y digeridos se visualizaron después de la electroforesis en un transiluminador.

RESULTADOS

En la [tabla 2](#) se muestran los resultados de los pacientes clasificados en 4 grupos según la movilidad electroforética de la G6PD en gel de almidón hidrolizado.

En el primer grupo se incluyeron 38 pacientes que presentaron una movilidad electroforética rápida. En 36 casos (86,8 %) se observó la mutación en el nucleótido 376 correspondiente a la G6PD A. De ellos, 33 (86,8 %) mostraron la segunda mutación en el nucleótido 202 y en 3 (7,89 %) apareció en el nucleótido 968. Las otras 2 variantes fueron clasificadas como raras. Una corresponde a un deficiente de G6PD portador de Hb H con una movilidad superior al 115 % y con resultados negativos para las mutaciones de los nucleótidos 202, 376 y 968. El otro individuo presentó actividad enzimática normal y una migración electroforética similar a la G6PD A, pero negativo a la mutación 376.

Las 7 variantes incluidas en el grupo 2 presentaron movilidad electroforética normal. Todos fueron portadores de la variante G6PD Santamaría.

En el grupo 3 se encuentran 4 pacientes con movilidad electroforética lenta. Un individuo es portador de la G6PD São Borja. Otro caso es un paciente portador de una esferocitosis hereditaria asociada con una deficiencia de G6PD. Otros dos individuos no deficientes de la enzima presentaron variantes con movilidad electroforética lenta. Todos son portadores de variantes raras.

El estudio bioquímico de un último paciente (grupo 4) no permitió determinar la movilidad electroforética de la variante. El estudio molecular resultó negativo para todos los nucleótidos estudiados (nucleótidos 202, 376, 968, 542, 563).

En las figuras 1 y 2 se muestran algunos ejemplos de los patrones electroforéticos obtenidos en gel de agarosa al 1,5 % de los exones 3-4 y 6-7 digeridos con Nla III y Mbo II, respectivamente, correspondientes a las mutaciones 202 y 563 (G6PD A⁻ y G6PD Med).

DISCUSIÓN

La utilización de métodos bioquímicos como la actividad y electroforesis de G6PD permite detectar solo una parte de las variantes estructurales de esta enzima, por lo que ha sido necesario desarrollar otras técnicas de mayor poder resolutivo que permitan discriminar entre variantes que presentan igual movilidad electroforética. Entre estos métodos podríamos señalar los estudios cinéticos, el enfoque isoelectrico y la cromatografía analítica.¹⁷

No fue hasta 1985, con la introducción de las técnicas de biología molecular para el estudio de esta enzima, que se pudo precisar la alteración a nivel del DNA y determinar realmente si estas variantes eran similares, aspecto este muy importante para poder predecir el cuadro clínico de estos casos. Se plantea que la presencia de algunas de estas mutaciones son las responsables del cuadro hematológico de estos pacientes, por lo que ha sido necesario no solo clasificarlos por el porcentaje de actividad que presentan, sino también por la severidad de la anemia hemolítica. En 1967 se estableció una clasificación de las variantes de G6PD teniendo en cuenta estos dos aspectos:¹⁷

Clase 1: pacientes deficientes de G6PD con AHCNE.

Clase 2: actividad enzimática < 10 % sin hemólisis crónica.

Clase 3: actividad enzimática entre 10 y 60 % sin hemólisis crónica.

Clase 4: actividad enzimática > 60 %.

Clase 5: actividad enzimática aumentada.

En nuestro estudio coincidimos con los trabajos realizados por otros investigadores donde se plantea que la variante G6PD A⁻ es la de mayor frecuencia en nuestro país.⁴ En esta variante aparece una doble mutación: una correspondiente a la de la variante G6PD A en el nucleótido 376 y una segunda mutación que pudiera estar en los nucleótidos 202, 968 ó 680. respectivamente. La variante molecular A^{-376/202} fue la más frecuente dentro de los casos estudiados con G6PD A⁻ (86,8 %). Esta variante es común en las poblaciones de origen africano y constituye un marcador de la raza negra.¹⁸ La variante G6PD A^{-376/968} ubicada en la zona del Mediterráneo, México y Costa Rica en individuos fenotípicamente blancos, fue descrita en Cuba en 1989 y se encontró en individuos de la raza negra.¹⁹ Todos estos casos se agruparon en la clase 3 y son pacientes susceptibles a presentar episodios

hemolíticos asociados con agentes oxidantes y/o procesos infecciosos. Una de las variantes raras que aparecen con movilidad electroforética rápida en la electroforesis en gel de almidón hidrolizado corresponde a un individuo deficiente de G6PD que también es portador de una Hb H. Este paciente es muy sintomático, presenta ictericia marcada y mantiene una hemólisis crónica severa que se exagera aún más en el transcurso de procesos infecciosos por lo que ha requerido de la administración de transfusiones de sangre. Debido a la interacción entre estas dos enfermedades no es posible precisar la clase a la que pertenece la variante, por lo que su caracterización molecular puede contribuir a determinar si el paciente es portador de una AHCNE agravada por la presencia de la Hb H o si se trata de una variante de la clase 2 ó 3. El otro caso con actividad normal pero negativo para la mutación correspondiente a la G6PD A (nucleótido 376), pudiera presentar una mutación lejana al sitio activo de la enzima o a la zona de interacción entre las subunidades que conforman la molécula de la enzima, de forma tal que produzca el cambio de la movilidad electroforética, pero que no afecte la actividad catalítica de esta y por lo tanto, no presente manifestaciones clínicas. Esta variante pertenece a la clase 4.

La G6PD Santamaría, no descrita anteriormente en nuestro país, presenta una doble mutación: una similar a la G6PD A (nucleótido 376) y otra en el nucleótido 542. Esta variante, encontrada frecuentemente en España, Argelia y otros países del Mediterráneo, presenta menos del 8 % de actividad enzimática, aspecto que provoca que aparezca en algunos pacientes un cuadro hematológico severo, y en algunos casos con requerimientos transfusionales. Los 7 casos deficientes de G6PD que presentaron variantes con movilidad electroforética normal fueron inicialmente clasificados, de acuerdo con el estudio bioquímico, como G6PD Mediterránea. El análisis molecular de estos pacientes permitió demostrar que todos presentaban la variante G6PD Santamaría y se incluyeron en la clase 2. Es importante señalar que en España la variante más frecuente es la G6PD Mediterránea, la cual es muy polimórfica y que presenta un cuadro clínico similar a la G6PD Santamaría,²⁰ por lo que llama la atención el hecho de que aún no se ha encontrado ningún paciente en la población cubana con la G6PD Med, a pesar de la contribución importante de este país a la mezcla racial de nuestra población.^{3,4}

La G6PD São Borja, descrita simultáneamente en Brasil y Cuba, corresponde a las variantes de la clase 4, ya que no tiene manifestaciones clínicas. La mutación se encuentra afectando el nucleótido 377 y se detectó por la secuenciación del gen.²¹ En el grupo 3 también aparece otro paciente que presenta un cuadro clínico severo debido a que es portador además de una esferocitosis hereditaria. El diagnóstico de la deficiencia de G6PD se realizó después que se detectó un proceso hemolítico una vez que el paciente había sido esplenectomizado y se había mantenido asintomático durante un tiempo. Este caso es posible que presente la variante G6PD Seattle,^{22,23} una de las variantes polimórficas deficientes de G6PD. Por el cuadro clínico se concluyó en la clase 3. Los otros 2 pacientes de este grupo presentaron actividad enzimática normal y se incluyeron en la clase 4. En estas 3 últimas variantes está pendiente concluir el estudio. Deberá realizarse polimorfismo de cadena sencilla (SSCP) y secuenciación del gen.

Un último paciente (grupo 4) es portador de una variante deficiente de G6PD con AHCNE (clase 1), la que está presente también en otros miembros de la familia con manifestaciones similares. Al no poder precisar su movilidad electroforética en gel de almidón hidrolizado (no se observa banda electroforética), realizamos el estudio molecular para las mutaciones de los exones 3,4,5,6,7,9 descartando todas las posibles mutaciones polimórficas. Esto demuestra que se trata de una variante rara, por lo que nos proponemos realizar el SSCP y la secuenciación del gen.

Este estudio constituye el primer paso en nuestro país para la caracterización genética y molecular de variantes de G6PD encontradas en nuestra población. Conocer el tipo de mutación específica que las afecta puede contribuir a ampliar en el conocimiento sobre la estructura terciaria y cuaternaria de esta enzima, así como relacionarla con las características bioquímicas, el cuadro clínico y la evolución de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease. [CD-ROM]. New York: McGraw-Hill; 1997.
2. Beutler E. Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism. Plenum Pub Corp 1978.
3. González R, Ballester JM, Estrada M, Lima F, Martínez G, Wade M, et al. Study of the genetical structure of the Cuban population: Red cell and serum biochemical markers. *Am J Hum Genet* 1976;28:585-96.
4. González R, Estrada M, Colombo B. G6PD polymorphism and racial admixture in the Cuban population. *Humangenetik* 1975;23:75-8.
5. Kyats B. Genetic mapping: X chromosome. *Hum Genet* 1983;64:28-32.
6. Beutler E. Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency. *N Engl J Med* 1991;324:169-74.
7. Metha A, Mason PJ, Vulliamy TJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Balliere's Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13:21-38.
8. Shannon K, Buchanan GR. Severe hemolytic anemia in black children with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Pediatrics* 1982;70:364-8.
9. Kattamis CA, Chaidas A, Chaidas S. G6PD deficiency and favism in the island of Rhodes. *J Med Genet* 1969;6:286-9.
10. Fleming AF, de Silva PS. G6PD deficiency. En: *Masson's Tropical diseases*. Cook AC, Zumla A, eds. Edinburg: Elsevier Science; 2003. pp. 208-12.
11. Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Molec Dis* 2002;28:93-103.
12. Luzzatto L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: From genotype to phenotype. *Haematologica* 2006;91:1303-7.
13. Chen EY, Cheng A, Lee A, Kuang W-J, Hillier L, Green P, et al. Sequence of human glucose 6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. *Genomics* 1991;10:792-6.
14. Rovira A, Vulliamy TJ, Pujades A, Luzzatto L, Vives Corrons J-L. The glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variant G6PD Union (454 Arg>Cys) has a worldwide distribution possibly due to recurrent mutation. *Hum Mol Genet* 1994;3:833-7.

15. Saenz G, Moreira J. Laboratorio de Hemoglobinopatías. Manual Latinoamericano. San José, Costa Rica; 1980.
16. Kan YW, Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human α globin structural gene: Relationship to sickle mutation. Proc Natl Acad Sci USA 1980;75:5631-5.
17. WHO. Standarization of technique for the study of glucose 6 phosphate dehydrogenase. WHO Tech Rep Series. Geneva 1967;366.
18. Vulliamy TJ, Othman A, Town M, Nathwani A, Falusi AG, Mason PJ, et al. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose 6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A-. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:8568-76.
19. Beutler A, Khul W, Saenz GF, Rodriguez W. Mutation analysis of G6PD variants in Costa Rica. Hum Genet 1991;87:462-5.
20. Oppenheim A, Jury CL, Rund D, Vulliamy TJ, Luzzatto L. G6PD Mediterranean accounts for the high prevalence of G6PD deficiency in Kurdish Jews. Hum Genet 1993;91:293-7.
21. Weimer TA, Salzano FM, Westwood B, Bwutler E. Molecular characterization of G6PD variants from Brazil. Hum Biol 1993;65:41-6.
22. de Vita G, Alcalay M, Samprieto M, Cappellini MD, Fiorelli G, Toniolo D. Two point mutations are responsible for G6PD polymorphism in Sardinian. Am J Hum Genet 1989;44:233-40.
23. Meissner PE, Coulibaly B, Mandi G, Mansmann U, Witte S, Schick W et al. Diagnosis of red cell G6PD deficiency in rural Burkina Faso. Comparison of a rapid fluorescent enzyme test on filter paper with polymerase chain reaction based genotyping. Br J Haematol 2005;131:395-9.

DraC. Marianela Estrada del Cueto. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado Postal 8070, Ciudad de La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 6438268, 6438695, 6434214, Fax (537) 6442334. e-mail: ihidir@hemato.sld.cu

_Sitio Web: www.sld.cu/sitios/ihj

Tabla 1. Mutaciones de la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), enzimas de restricción empleadas y secuencia de cebadores utilizados

Variante	Mutación	Exón	Enzima de restricción	Producto PCR (pb)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)		Secuencia de los cebadores
					Corte normal	Corte mutante	
A ^a	202 G→A	4	Nla III	353	338 + 15	215+123+15	η 5' -CAGCCACTTCTAACCACACACCT -3' P4b 5' - CCGAAGTTGGCCATGCTGGG -3'
A	376 A→G	5	Fok I	295	295	154+141	A 5' -CTGTCTGTGTGTCTGTCTGTCC -3' M 5' -GGCCAGCCTGGCAGGCGGGAAG -3'
A ^a	680 G→T	7	Bst NI	583	267+168+54 +50+30+14	168+155+112 + 54+50+30+14	91 5' -CCCCGAAGAGGAATTCAAGGGGGT -3' 92 5' -GAAGAGTAGCCCTCGAGGGTGAC -3'
A ^a	968 T→C	9	Nci I	282	282	162+120	D 5' -CAAGGAGCTCATTCTCCCTT -3' R 5' -TGCCTTGCTGGGCCTCGAAGG -3'
Med	563 C→T	6	Mbo II	547	377+119+26 +25	277+119+100 +26+25	91 5' -CCCCGAAGAGGAATTCAAGGGGGT -3' 92 5' -GAAGAGTAGCCCTCGAGGGTGAC -3'
Sta.	376 A→G	5	Fok I	295	295	154+141	A 5' -CTGTCTGTGTGTCTGTCTGTCC -3' M 5' -GGCCAGCCTGGCAGGCGGGAAG -3'
María	542 A→T	6	Acc III	130	130	110+20	SM 5' -AGGAGATGTGGTTGGACATCCGG -3' B 5' -GGCCAGCCTGGCAGGCGGGAAG -3'
Seattle	844 G→C	8	Dde I	164	100+58+5	159+5	L 5' - GGAGCTAAGGCGAGCTCTTGGC -3' I 5' - GGCATGCTCCTGGGACTGTG -3'

Tabla 2. Resultados del estudio molecular de variantes de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD)

Grupo 1 Movilidad electroforética rápida (38)	Grupo 2 Movilidad electroforética normal (7)	Grupo 3 Movilidad electroforética lenta (4)	Grupo 4 Movilidad electroforética no precisada (1)
G6PD A ^a ^{202/376} (33)	G6PS Santamaría ⁵¹² (7)	G6PD São Borja ³³⁷	G6PD "rara" (1)
G6PD A ^a ^{968/376} (3)		G6PD Seattle ⁸⁴⁴ (¿) (1)	
G6PD "rara" (2)		G6PD "rara" (2)	

(): número de casos.

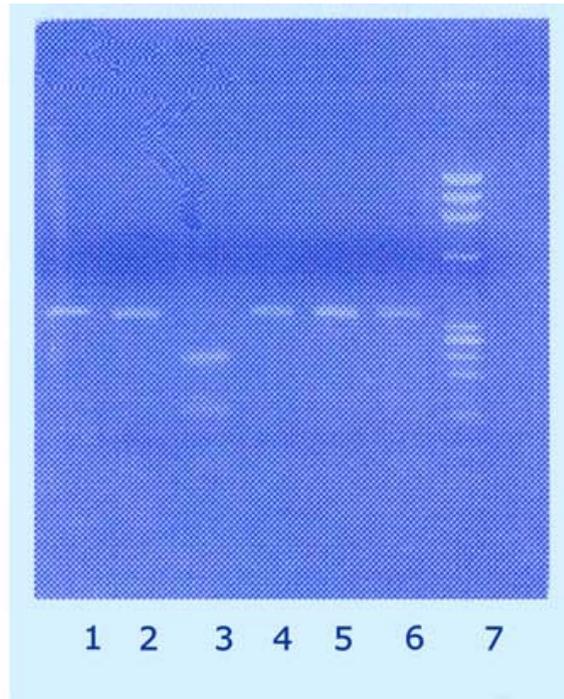


Fig. 1 Electroforesis de los exones 3-4 después de la digestión con Nla III.
 1: producto PCR sin digerir; G6PD B; 3: paciente con la mutación en el nt 202;
 4,5,6: pacientes negativos para la mutación nt 202; 7: marcador de peso molecular

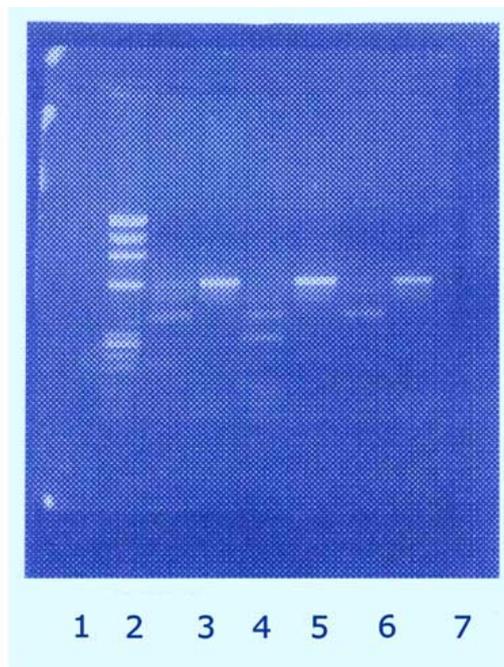


Fig. 2. Electroforesis de los exones 6-7 después con Mbo II.
 1: marcador de peso molecular f-174; 2,6: pacientes negativos para la
 mutación 563; 3,5,7: producto PCR sin digerir;
 4: control positivo heterocigótico 563.