

## HEMOGLOBINA WOODVILLE ASOCIADA A UNA DOBLE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

ADRIÁN P. MANSINI, DIEGO A. FERNÁNDEZ, FERNANDO M. AGUIRRE, CAROLINA PEPE, BERENICE MILANESIO, ALEJANDRO CHAVES, SILVIA EANDI EBERLE, AURORA FELIÚ TORRES

*Servicio de Hematología-Oncología, Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina*

**Resumen** En nuestro país, la co-herencia de defectos eritrocitarios, hemoglobinopatías, enzimopatías y membranopatías no es un evento inusual. A fin de diagnosticarlos, se implementó una estrategia de laboratorio que incluye pruebas de tamizaje y confirmatorias, además de la caracterización molecular. Como resultado de esto, se identificó a un hombre de 24 años, portador de una hemoglobinopatía (hemoglobina Woodville) y de una enzimopatía (déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). La hemoglobina Woodville no produce síntomas en el estado heterocigota, no habiéndose comunicado, hasta el momento, individuos homocigotas o doble heterocigotas. Por el contrario, la doble mutación puntual en el gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa c.[202G>A;376A>G], p. [Val 68Met; Asn126Asp], previamente descrita, ocasiona hemólisis de gravedad variable tras la ingesta de drogas o alimentos o durante el curso de infecciones. Este caso resalta la importancia de la metodología utilizada para el diagnóstico, tratamiento y asesoramiento genético correcto.

**Palabras clave:** hemoglobina Woodville, hemoglobinas anormales, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

**Abstract** *Hemoglobin Woodville associated with double point mutation in the gene of glucose-6-phosphate dehydrogenase.* The co-inheritance of erythrocyte defects, hemoglobinopathies, enzymopathies, and membranopathies is not an unusual event. For the diagnosis, a laboratory strategy, including screening and confirmatory tests, additional to molecular characterization, was designed. As the result of this approach, a 24-year-old man carrying a hemoglobinopathy (Hemoglobin Woodville) and an enzymopathy (glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency) was identified. In the heterozygous state hemoglobin Woodville, is asymptomatic, and homozygous or double heterozygous individuals have not been reported thus far. On the other hand, previously described double point mutation in the gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase c. [202G>A; 376A>G], p. [Val 68Met; Asn126Asp], causes hemolysis of varying severity after food or drug intake or infections. This case highlights the importance of the methodology carried out for the diagnosis, treatment, and proper genetic counseling.

**Key words:** Woodville hemoglobin, abnormal hemoglobins, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency

Las alteraciones de la hemoglobina (Hb) son los desórdenes monogénicos más frecuentes y han sido identificadas más de 1 000 mutaciones diferentes<sup>1</sup>. Si bien estas mutaciones predominan en ciertas regiones del mundo, las migraciones han determinado su distribución mundial. Por otra parte, la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la alteración enzimática eritrocitaria más frecuente, que afecta a 400 millones de personas en el mundo entero<sup>2-4</sup>. Esto implica que la co-herencia de más de un defecto genético eritroide no es un evento inusual, especialmente en países como el nuestro con una población multiétnica.

Se identificó la presencia de la Hb Woodville [ $\alpha$ 1 6(A4); Asp->Tyr] asociada a una doble mutación puntual en el gen de *G6PD* c.[202 G>A; 376 A>G, p.Val68Met; Asn126Asp] en un individuo<sup>5,6</sup>.

### Caso clínico

Hombre de 24 años, incluido en el estudio familiar de eritropatías debido a que su hijo de 4 años de edad presentaba microcitosis e hipocromía sin anemia. Los estudios hematológicos incluyeron: hemograma, obtenido mediante un contador hematológico Sysmex XS-800i (*Sysmex Corporation, Kobe, Japan*); cuantificación de las diferentes fracciones de Hb, realizada por electroforesis capilar (*Capillarys Flex Sebia, Evry, France*) y por electroforesis en gel de agar a pH ácido y alcalino (*Sebia, Lisses, Évry, France*); prueba de tamizaje de deficiencia de G6PD (prueba de Brewer); prueba para la determinación de hemoglobinas inestables (prueba de Carrel y Kay); actividad enzimática de la G6PD, medida por espectrofotometría<sup>7</sup> y determinación de la  $P_{50}$ , realizada en el analizador *Radiometer ABL 835 analyzer* a 128 longitudes de

Recibido: 7-XI-2014

Aceptado: 17-VI-2015

**Dirección postal:** Dra. Aurora Feliú Torres, Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Combate de los Pozos 1881, 1245 Buenos Aires, Argentina  
e-mail: afeliu@garrahan.gov.ar

onda (*Radiometer A/S, Copenhagen, Denmark*). La  $P_{50}$  se calculó por extrapolación de la curva de disociación del oxígeno al 50% de saturación y se utilizó como un indicador de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno<sup>8</sup>.

Se realizó la extracción de ADN de leucocitos de sangre periférica por el método de *salting out*. Se estudiaron las deleciones más frecuentes del cluster  $\alpha$ -globina ( $-\alpha 3.7$ ,  $-\alpha 4.2$ ,  $-\text{MED}$  y  $-\text{20.5}$ ) por GAP-PCR utilizando la estrategia y los primers previamente descritos por Chong y col.<sup>9</sup> Se secuenciaron directamente los genes *HBA1* y *HBA2* utilizando el método Sanger con el secuenciador automático ABI PRISM 3130 (*Applied Biosystems*) y primers descritos por Zorai y col<sup>10</sup>.

La presencia de deleciones/inserciones en los clusters  $\alpha$ -globina y  $\beta$ -globina se estudió por MLPA, utilizando el *kit* salsa MLPA P140B HBA y P102-B2 HBB (MRC-Holland). Por último, se analizaron por secuenciación directa los genes *HBB* y *G6PD*<sup>11,12</sup>.

Los resultados de los estudios hematológicos se muestran en la Tabla 1. Tanto el propósito como su hijo presentaron valores

disminuidos de volumen corpuscular medio (VCM) y hemoglobina corpuscular media (HCM) sin anemia. En el niño se encontró una deficiencia de hierro leve. La electroforesis capilar de Hb del propósito y su hijo mostró la presencia de una banda anómala de 5% y 3.4%, respectivamente.

En ambos varones se detectó la mutación puntual c.19G>T (p.Asp7Tyr) en estado heterocigota en el gen *HBA1*. Esta mutación provoca una variante de la Hb llamada Hb Woodville, previamente descrita en 2 mujeres con perfil hematológico normal<sup>5, 6</sup>. No se encontraron mutaciones puntuales en los genes *HBB* y *HBA2* ni se detectaron deleciones en el *cluster* de  $\alpha$ -globina.

La prueba de Brewer fue solo positiva en el propósito, confirmándose la disminución de la actividad enzimática mediante una técnica cuantitativa. La secuenciación del gen de la *G6PD* permitió la identificación de una doble mutación puntual c.[202G>A; 376A>G, p.Val68Met; Asn126Asp]. Esta variante de la enzima *G6PD* llamada A- está clasificada como clase III según la Organización Mundial de la Salud y está asociada con una actividad del 10-20%<sup>13, 14</sup>.

TABLA 1.– Resultados de análisis hematológico

	Niño	Madre	Propósito
Hematías ( $10^{12}$ / l)	5.3	4.7	5.6
Hemoglobina (g/dl)	13.5	13.8	15.1
Hematocrito (%)	37.8	39.8	43.5
VCM (fl)	72.0	85.2	77.5
HCM (pg)	25.7	29.6	26.9
CHCM (g/dl)	35.7	34.7	34.7
ADE (%)	13.7	13.7	12.3
Reticulocitos (%)	2.0	1.6	1.6
Morfología eritrocitaria	anisocitosis+ microcitosis++ hipocromía++ punteado basófilo+	anisocitosis+ ovalocitos+	anisocitosis+ microcitosis+ hipocromía+ punteado basófilo+
LDH (U/l)	434	365	273
Electroforesis Hb capilar	A / X / A <sub>2</sub>	A / A <sub>2</sub>	A / X / A <sub>2</sub>
Hb A2 (%)	2.7	2.3	2.1
Hb F (%)	0.97	< 0.3	< 0.3
Banda X (%)	3.4	-	5.0
Cuerpos de inclusión	Negativo	Negativo	Negativo
Prueba de Carrel y Kay	Negativo	Negativo	Negativo
Prueba de Brewer	Negativo	Negativo	Positivo
Ferritina (ng/ml)	19.7	16.0	82.9
Ferremia ( $\mu\text{g}\%$ )	75.6	102.5	97.6
TIBC ( $\mu\text{g}\%$ )	385	469	279
Saturación %	20	22	35
$P_{50}$ (RR: 25-29 mmHg)	26.4	No realizada	27
Fragilidad osmótica media	Normal	Normal	Normal
Concentración de G6PD (RR: 4.6-13.5 U/gHb)	No realizado	No realizado	1.7
Actividad enzimática	No realizada	No realizada	18%

RR: Rango de referencia

## Discusión

Los desórdenes hereditarios de la hemoglobina son los defectos más comunes, atribuidos a alteraciones genéticas, y se estima que el 7% de la población mundial es portadora de algunos de éstos<sup>13</sup>. Debido a las características étnicas de nuestro país, la presencia de más de una alteración en los hematíes no es un evento inusual. A fin de detectar estas asociaciones se emplea un conjunto de pruebas de tamizaje, aplicadas a una amplia variedad de patologías eritrocitarias. Como resultado de esta estrategia se detectó la presencia de la Hb Woodville en el padre y en su hijo. Además, solo en el padre y asociada a esta variante de Hb se identificó una doble mutación puntual en el gen *G6PD*.

La Hb Woodville fue descrita por primera vez en 1986 en una mujer vietnamita. La variante es el resultado de la mutación GAC→TAC en los genes *HBA2* o *HBA1* y los portadores de la misma son asintomáticos. El propósito y su hijo presentaron un porcentaje bajo de esta variante de Hb, lo que concuerda con los reportes bibliográficos. El valor de  $P_{50}$  fue normal, aunque algunos autores comunicaron un leve aumento de la afinidad de esta Hb por el oxígeno<sup>5, 6</sup>.

La disminución del VCM y HCM detectada en el niño y en el padre no concuerdan con lo reportado previamente. Las pacientes descritas por Como y Viprakasit presentaban índices hematimétricos normales<sup>5, 6</sup>. Los índices en el niño no se modificaron tras la administración de sulfato ferroso a dosis terapéutica. El estudio molecular de los genes *HBB* y *HBA2* descartó la presencia de otras mutaciones puntuales o deleciones que pudieran alterar el equilibrio entre la producción de cadenas de globina  $\alpha/\beta$ , ocasionando así las alteraciones en el VCM y/o HCM como se observan en los síndromes talasémicos. La deficiencia de G6PD, fuera del episodio hemolítico no altera los índices hematimétricos y, dado que solo el padre del niño presenta ambas alteraciones, no justificaría los hallazgos encontrados en el niño. La falta de reportes a nivel mundial y la imposibilidad de estudiar a familiares de la rama paterna impide aclarar la etiología de estos hallazgos.

El uso de la electroforesis capilar de Hb permitió diferenciar la Hb Woodville de la HbA<sub>2</sub>. En reportes previos donde se usó cromatografía líquida de baja presión, los tiempos de retención de la Hb Woodville y de Hb A<sub>2</sub> fueron los mismos, lo que puede conducir al diagnóstico erróneo de  $\beta$ -talasemia<sup>6</sup>. La electroforesis de Hb a pH alcalino en gel de agar mostró un componente migratorio a la altura de la Hb fetal.

En cuanto a la deficiencia de G6PD, enzimatopatía ligada al cromosoma X, la variante A- está clasificada como clase III, y se caracteriza por episodios de hemólisis desencadenados por infecciones, drogas o alimentos. Esta variante

no sólo tiene disminución de la actividad enzimática, sino que también tiene baja estabilidad debido a defectos en el plegado de la proteína<sup>15</sup>.

En conclusión, la identificación de la Hb Woodville asociada a la deficiencia de G6PD refuerza el planteo de que el diagnóstico de las patologías eritrocitarias debe incluir pruebas de tamizaje que conduzcan a la identificación de más de un desorden coheredado, a fin de dar un correcto diagnóstico y un adecuado consejo genético.

**Agradecimientos:** Agradecemos a la Dra. Silvia González, del Hospital de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer, por el estudio de  $P_{50}$ .

**Conflicto de intereses:** Ninguno para declarar

## Bibliografía

1. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67: 71-86.
2. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 84: 3613-36.
3. Luzzatto L, Vulliamy TJ, Mehta A. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, vol.3, 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2001; p 4517-33
4. Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *Am Fam Physician* 2005; 72: 1277-82.
5. Como PF, Barber S, Sage RE, Trent RJ, Kronenberg H. Hemoglobin Woodville: alpha (2)6(A4) aspartic acid->tyrosine. *Hemoglobin* 1986;10: 135-41.
6. Viprakasit V, Chinchang W, Chotimarat P. Hb Woodville, a rare alpha-globin variant, caused by codon 6 mutation of the alpha1 gene. *Eur J Haematol* 2006; 76: 79-82.
7. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Dacie and Lewis Practical Haematology, 10th edition Philadelphia: Churchill Livingstone, 2006, 217 pp.
8. Siggaard-Andersen M, Siggaard-Andersen O. Oxygen status algorithm, version 3, with some applications. *Acta Anaesthesiologica Scand* 1995; 39: Supp. 107, 13-20.
9. Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, Higgs DR. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common southeast asian deletion determinants of alpha-thalassemia. *Clin Chem* 2000; 46: 1692-5.
10. Zorai A, Harteveld CL, Bakir A, et al. Molecular spectrum of alpha-thalassemia in Tunisia: epidemiology and detection at birth. *Hemoglobin* 2002; 26: 353-62.
11. Roldán A, Gutiérrez M, Cygler A, Bonduel M, Sciuccati G, Torres AF. Molecular characterization of beta-thalassemia genes in an Argentine population. *Am J Hematol* 1997; 54:179-82.
12. Poggi V, Town M, Foulkes NS, Luzzatto L. Identification of a single base change in a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain-reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA. *Biochem J* 1990; 271: 157-60.
13. World Health Organization Working Group: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ* 1989; 67: 601-11.
14. Zhao X, Li Z, Zhang X. G6PD-MutDB: a mutation and phenotype database of glucose-6-phosphate (G6PD) deficiency. *J Bioinform Comput Biol* 2010; Suppl 1: 101-9.
15. Vulliamy TJ, D'Urso M, Battistuzzi G, et al. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5171-5.