



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de
Buenos Aires
Argentina

Gómez-Manzo, Saúl; López-Velázquez, Gabriel; García-Torres, Itzhel; Hernández-Alcantara, Gloria; Méndez-Cruz, Sara Teresa; Marcial-Quino, Jaime; Castillo-Villanueva, Adriana; Enríquez-Flores, Sergio; De la Mora, Ignacio; Torres-Arroyo, Angélica; Reyes-Vivas, Horacio; Oria-Hernández, Jesús
Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: De lo clínico a lo bioquímico
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 48, núm. 4, diciembre, 2014, pp. 409-420
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53535594003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: De lo clínico a lo bioquímico

Glucose-6-phosphate dehydrogenase: From the clinical to the biochemical aspects

Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase: Aspectos clínicos e bioquímicos

- Saúl Gómez-Manzo^{1a}, Gabriel López-Velázquez^{1a}, Itzhel García-Torres^{2a}, Gloria Hernández-Alcantara^{2b}, Sara Teresa Méndez-Cruz^{3a}, Jaime Marcial-Quino^{1a}, Adriana Castillo-Villanueva^{3a}, Sergio Enríquez-Flores^{1a}, Ignacio De la Mora^{3a}, Angélica Torres-Arroyo^{4a}, Horacio Reyes-Vivas^{1a}, Jesús Oria-Hernández^{1a}

¹ Dr. en Ciencias.

² Dra. en Ciencias.

³ M. en Ciencias.

⁴ QFB.

^a Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría. Secretaría de Salud. México.

^b Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México.

Resumen

La deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la enzimopatía más frecuente, con una prevalencia global del 4,9% y con alrededor de 330 a 400 millones de personas afectadas en el mundo. La G6PD desempeña un papel fundamental en el equilibrio redox intracelular, especialmente en los eritrocitos; en condiciones de estrés oxidativo inducido (por ejemplo, por exposición a agentes externos como fármacos, alimentos o infecciones), los hematíes portadores de la variante enzimática y con deficiencia de la actividad enzimática, sufren daños irreversibles que condicionan su destrucción acelerada. La hemólisis explica el espectro de manifestaciones clínicas de esta enfermedad, que incluyen ictericia neonatal, episodios de hemólisis aguda inducida por agentes externos o anemia hemolítica crónica. El presente trabajo hace una reseña de los aspectos epidemiológicos y clínicos de esta enfermedad y revisa los aspectos fisiopatológicos a nivel bioquímico-molecular, con particular énfasis en la caracterización genética, estructural y funcional de las variantes asociadas a la deficiencia de G6PD.

Palabras clave: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa * errores innatos del metabolismo * anemia hemolítica hereditaria * diagnóstico molecular

Summary

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is the most frequent enzymopathy in humans with a global prevalence of 4.9 % and around 330 to 400 million patients affected worldwide. G6PD plays a fundamental role in the intracellular redox equilibrium, especially in red blood cells (RBC). Under oxidative stress (induced by exposure to external agents like drugs, infections or diet) RBC carrying the deficient variant suffer irreversible damage resulting in their accelerated destruction. This hemolysis explains the clinical manifestations of the disease that include neonatal jaundice, induced

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstracts Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (Impresa)

ISSN 1851-6114 (En línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

acute hemolysis or chronic hemolytic anemia. This work summarizes the epidemiologic and clinical features of G6PD deficiency, and reviews the molecular pathophysiology of this disease with special emphasis on the genetical, structural and functional characterization of variants causing this pathology.

Key word: *glucose-6-phosphate dehydrogenase* inborn errors of metabolism * hereditary hemolytic anemia * molecular diagnosis*

Resumo

A deficiência da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é a enzimopatia mais frequente, com uma prevalência global do 4,9%, e com aproximadamente 330 a 400 milhões de pessoas afetadas no mundo. A G6PD tem um importante papel no equilíbrio celular redox intracelular, especialmente nos eritrócitos; em condições de estresse oxidativo induzido, (por exemplo, pela exposição a agentes externos como fármacos, alimentos, ou infecções) as hemácias portadoras da variante enzimática e com deficiência da atividade enzimática, sofrem danos irreversíveis que condicionam a sua destruição acelerada. A hemólise explica o espectro de manifestações clínicas desta doença, que incluem icterícia neonatal, episódios de hemólise aguda induzida por agentes externos ou anemia hemolítica crônica. Este trabalho faz uma resenha dos aspectos epidemiológicos e clínicos desta doença, e revisa os aspectos fisiopatológicos no nível bioquímico-molecular, com ênfase especial na caracterização genética, estrutural e funcional das variantes associadas à deficiência de G6PD.

Palavras chave: *glucose-6-fosfato desidrogenase * erros inatos do metabolismo * anemia hemolítica hereditária * diagnóstico molecular*

Introducción

Las enzimopatías se refieren a la ausencia o decremento en la actividad de una enzima y se consideran como un grupo particular de los errores innatos del metabolismo. Las enzimopatías pueden deberse a mutaciones genéticas que afectan la función de alguna proteína con actividad catalítica o a la ausencia de un cofactor enzimático esencial. Cuando la enzimopatía afecta a las células rojas, se le denomina eritroenzimopatía. En general, las eritroenzimopatías causan anemias hemolíticas no esferocíticas crónicas con distintos niveles de severidad. Se ha reportado la existencia de estas enzimopatías en prácticamente todas las enzimas eritrocitarias involucradas en la glucólisis (1), la vía de las pentosas fosfato y el metabolismo del glutatión (2). La deficiencia de piruvato quinasa representa la eritroenzimopatía más frecuente de la vía glucolítica, mientras que la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la enzimopatía más frecuente dentro de la vía de las pentosas fosfato (3) (4).

La deficiencia de G6PD presenta una gran heterogeneidad genética; a nivel mundial se han reportado hasta la fecha alrededor de 160 mutaciones causantes de esta enfermedad; la mayoría de ellas son mutaciones puntuales que causan defectos estructurales y/o funcionales en la enzima (5). Algunas de estas variantes presentan frecuencias polimórficas en determinadas poblaciones. La distribución polimórfica permitió en algunas ocasiones determinar el origen evolutivo de las mutaciones en el gen de la G6PD, o bien determinar si una mutación fue de origen único o recurrente (6) (7).

EPIDEMIOLOGÍA DE LA DEFICIENCIA DE G6PD

La deficiencia de la G6PD es la enzimopatía más común en el hombre y el quinto defecto congénito más común a nivel mundial (8). Tiene una distribución global con una prevalencia del 4,9% y un estimado de 330 a 400 millones de personas afectadas en el mundo (9) (10). La deficiencia de G6PD se produce con mayor frecuencia en África, Asia, el Mediterráneo y el Medio Oriente (Figura 1). En los Estados Unidos, la deficiencia de la enzima afecta principalmente a las poblaciones de hombres de ascendencia africana y mediterránea con una prevalencia de aproximadamente 10% (10) (11). La prevalencia de la enfermedad correlaciona con la distribución geográfica de la deficiencia de G6PD confiere a sus portadores una protección parcial contra esta infección (5) (11). La distribución de las mutaciones varía entre las diferentes poblaciones; por ejemplo, la variante G6PD A- se encuentra mayoritariamente presente en varones africanos y afro-americanos con una frecuencia genética del 11%. La variante G6PD B- ocupa el segundo lugar a nivel mundial encontrándose frecuentemente en las poblaciones que viven o son originarias del Mar Mediterráneo. La prevalencia de esta mutación es muy variable, con frecuencias del 2 al 20% en Grecia, Turquía e Italia, pero alcanzando hasta un 70% en grupos de judíos kurdos (5).

En Latinoamérica, la prevalencia estimada para la deficiencia de G6PD varía de manera importante entre países y dentro de estos incluso dentro de las diferentes regiones. Es posible que estas variaciones se de-

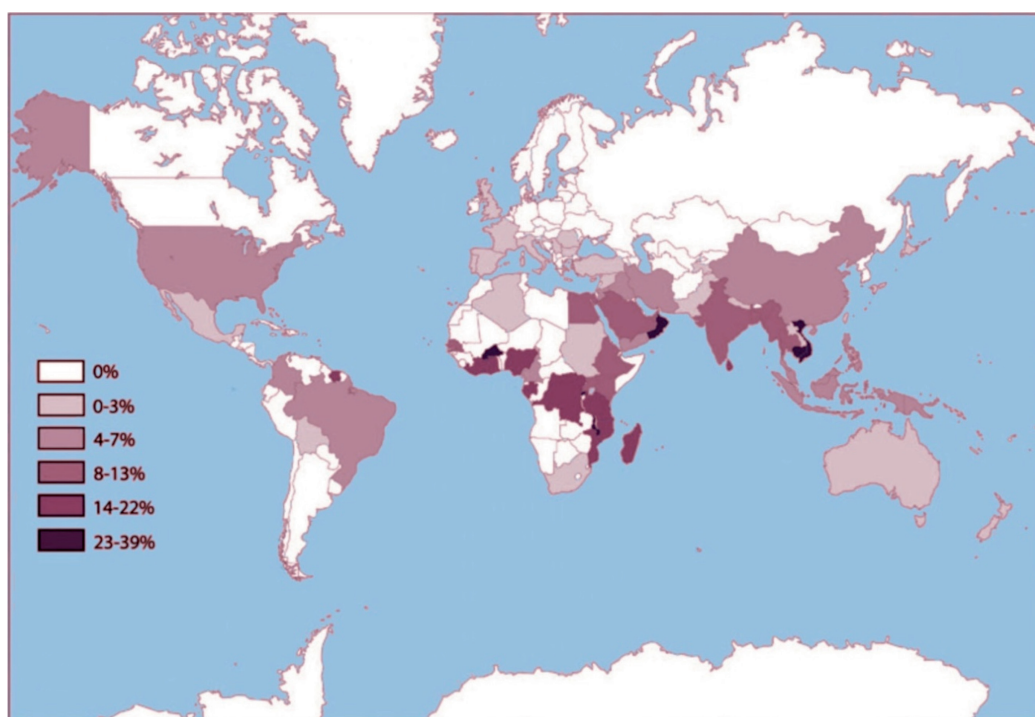


Figura 1. Distribución de la prevalencia mundial en la deficiencia G6PD de acuerdo con Nkhoma et al. (10).

ban, entre otras cosas, a la heterogeneidad genética de cada población, a las variaciones introducidas por los métodos diagnósticos utilizados, e incluso, a la ausencia de estudios epidemiológicos adecuados en muchas áreas de este continente. Recientemente se desarrolló un modelo geoestadístico Bayesiano para crear un mapa continuo de la prevalencia de la deficiencia de G6PD alrededor del mundo (12) (13). El mapa modelado de prevalencia representa la frecuencia alélica de la deficiencia fenotípica. Los resultados de este estudio muestran que en Latinoamérica, la deficiencia de G6PD se concentra en las regiones costeras; pero aún en estas, la prevalencia es menor que en el África del sub-Sahara o en Asia (12) (13). A nivel regional, es posible observar que la deficiencia de G6PD está virtualmente ausente en el norte de México, partes de Costa Rica, Perú, Bolivia y en gran parte de Argentina; por el contrario, los niveles más elevados se encuentran en las provincias centrales y de la costa del sur de Brasil (12) (13). A nivel país, la frecuencia alélica en países como Argentina, Bolivia, Costa Rica, México, Panamá y Perú es menor del 1%; se sitúa entre el 1 y 3% en Belice, República Dominicana, Guatemala, Honduras y Guyana; y entre el 3 y 5% en Brasil, Colombia, Ecuador, El Salvador y Paraguay. Las mayores prevalencias se calculan en Haití (5,2%) y Venezuela (8,6%); sin embargo, en este último país, los estudios epidemiológicos son escasos, lo cual crea una mayor incertidumbre en los valores calculados para este territorio (12) (13).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA DEFICIENCIA DE G6PD

El espectro clínico de la deficiencia de G6PD es muy amplio, abarcando desde sujetos asintomáticos hasta estados hemolíticos agudos o crónicos. La gravedad del cuadro clínico casi siempre correlaciona con el grado de deficiencia enzimática según se muestra en la Tabla I. La mayoría de los sujetos que presentan las variantes con niveles moderados de deficiencia, se encuentran asintomáticos a través de su vida e inclusive desconocen el estado de su enfermedad. En los sujetos con las variantes deficientes graves, las manifestaciones clínicas pueden dividirse en tres grandes grupos: ictericia neonatal, hemólisis aguda y anemia hemolítica crónica no esferocítica.

Ictericia neonatal. La bilirrubina producida por el feto se elimina por el hígado materno, sin embargo, inmediatamente después del nacimiento el neonato debe asumir esta función. Dado que muchos de los mecanismos involucrados en la depuración de bilirrubina no están completamente desarrollados al nacimiento, la mayoría de los neonatos desarrollan algún grado de hiperbilirrubinemia entre los días 2 a 5 después del nacimiento. Sin embargo, en los pacientes con deficiencia de G6PD, la prevalencia de ictericia neonatal es del doble que en la población general (11) y es además más frecuente y grave en niños prematuros (14). La ictericia neonatal es más común en las variantes gravemente afectadas que en las moderadas. Los neonatos con

Tabla I. Clasificación de Variantes de G6PD (Adaptada de WHO Working group, 1989).⁽⁹⁾

Clase	Nivel de actividad enzimática eritrocitaria	Grado de deficiencia enzimática	Manifestaciones clínicas
I	No detectable	Deficiencia grave	Anemia hemolítica crónica no esferocítica
II	Actividad residual del 1 al 10%	Deficiencia grave	Hemólisis aguda
III	Actividad residual del 10 al 60%	Deficiencia moderada	Hemólisis aguda ocasional
IV	Actividad del 60 al 150%	Actividad normal	Sin manifestaciones
V	Actividad mayor del 150%	Actividad aumentada	Sin manifestaciones

deficiencia de G6PD en combinación con Síndrome de Gilbert (deficiencia hereditaria de uridin-difosfato glucuronosiltransferasa) presentan el mayor riesgo de desarrollar ictericia neonatal (15). El mecanismo por el que la deficiencia de G6PD causa ictericia neonatal no se comprende completamente, pero se piensa que la disminución en la conjugación de la bilirrubina y la depuración hepática contribuyen de manera más importante que la hemólisis (16).

Debido a que la deficiencia de G6PD aumenta el riesgo y el inicio temprano de la hiperbilirrubinemia (16), el diagnóstico debe de considerarse en neonatos que desarrollan hiperbilirrubinemia mayor de 10 mg/dL dentro de las primeras 24 horas de nacimiento y/o que poseen el antecedente de un hermano con ictericia neonatal. En algunos casos, sobre todo aquellos con un incorrecto manejo de la hiperbilirrubinemia, la ictericia neonatal asociada a la deficiencia de G6PD puede producir *kernícterus* y daño neurológico permanente, que en un gran número de casos desemboca en la muerte del paciente (17). Se estima que en Estados Unidos el 30% de los niños ictericos que desarrollan daño neurológico permanente por *kernícterus* presentan deficiencia de G6PD (18).

Hemólisis aguda. La manifestación más común de la deficiencia de G6PD es la hemólisis aguda, la cual se produce cuando las células eritrocitarias se encuentran bajo estrés oxidativo desencadenado por habas verdes (*Vicia faba*), fármacos o infecciones. Se han reportado eventos no relacionados con estos agentes que pueden desencadenar la hemólisis, como la diabetes, el infarto al miocardio o incluso el ejercicio físico vigoroso (19-21). Sin embargo, la coexistencia de estas entidades con infecciones o exposición a fármacos como la causa primaria del episodio hemolítico no puede descartarse.

La relación entre la ingesta de habas verdes y sus efectos patológicos (favismo) se observó desde siglos atrás en los países mediterráneos, aunque sin conocerse la causa subyacente. La deficiencia de G6PD como entidad nosológica se descubrió hasta mediados del siglo XX, mien-

tras se investigaba el desarrollo de hemólisis en pacientes bajo tratamiento con primaquina. Desde entonces, algunos otros fármacos (antimaláricos, sulfonamidas, sulfonas, nitrofurantoína, etc) se han relacionado con el desarrollo de hemólisis aguda en pacientes deficientes de G6PD (22). Los procesos infecciosos son la causa más común de hemólisis en pacientes deficientes de G6PD; entre éstos, las infecciones por virus de la hepatitis A y B, citomegalovirus, los cuadros de neumonía y fiebre tifoidea son causas frecuentes (23-25). El mecanismo exacto por el cual las infecciones desencadenan la hemólisis se desconoce, aunque se piensa que la producción de especies oxidantes por parte de los leucocitos puede causar estrés oxidativo a los eritrocitos (26).

La hemólisis ocurre 24 a 48 horas después de la exposición al agente estresante y es auto-limitante, pues la destrucción eritrocitaria no continúa a pesar de la persistencia de la ingesta del agente oxidante o el proceso infeccioso. Es probable que este efecto se deba a la destrucción acelerada de eritrocitos envejecidos, los cuales presentan menor resistencia al estrés oxidativo mientras que las células más jóvenes y los reticulocitos tienen niveles enzimáticos suficientes para lidiar con el estrés oxidante sin sufrir hemólisis (27). Las manifestaciones clínicas de la hemólisis aguda son fatiga, malestar generalizado, dolor abdominal o lumbar, ictericia, hemoglobinuria y ocasionalmente esplenomegalia. Las pruebas de laboratorio indican niveles aumentados de bilirrubina no conjugada y lactato deshidrogenasa; la biometría hemática y el frotis sanguíneo pueden mostrar anemia normocítica normocrómica, anisocitosis, policromasia y presencia de reticulocitos, poiquilocitos y eritroblastos tardíos (27).

Anemia hemolítica crónica no esferocítica. En algunos pacientes, la presencia de las variantes más gravemente afectadas (clase I) condiciona la presencia de anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE), debido a que la baja actividad de la enzima no puede mantener un aporte suficiente de NADPH para prevenir el estrés

oxidativo generado por el metabolismo normal. Como en otras anemias hemolíticas crónicas, los pacientes cursan con una historia de ictericia neonatal y anemia crónica que en algunos casos requiere de transfusiones sanguíneas continuas y que además, puede exacerbarse de manera aguda por los agentes estresantes mencionados. Es común, además, la presencia de esplenomegalia, colelitiasis, reticulocitosis y el aumento de los niveles séricos de bilirrubina y deshidrogenasa láctica (27).

Manejo y tratamiento de la deficiencia de G6PD. En el caso de la ictericia neonatal, el tratamiento sigue el mismo curso que el que se provee por cualquier otra causa incluyendo fototerapia y exanguinotransfusión. En la hemólisis aguda inducida el principal objetivo es evitar los agentes estresantes ya mencionados. En general, la hemólisis aguda es de corta duración y no requiere tratamiento específico; sin embargo, en algunos casos (usualmente en niños), la hemólisis puede ser lo suficientemente extensa para provocar una anemia grave que requiera de transfusión. La suplementación con hierro y ácido fólico posterior al evento hemolítico puede considerarse dependiendo del grado de la hemólisis. El manejo de la AHCNE es similar al de otras anemias hemolíticas crónicas: vigilancia estrecha para evitar que un evento exacerbante empeore gravemente la anemia, suplementación con hierro, transfusión sanguínea de ser necesario y agentes quelantes en caso de sobrecarga

de hierro. La esplenectomía, aunque controversial, es realizada generalmente en los pacientes con las formas graves de la enfermedad, incrementando a veces los niveles de hemoglobina. En las formas graves de la enfermedad, la identificación de la mutación, el consejo genético y el diagnóstico prenatal son recomendables y deben de ofrecerse (27).

ASPECTOS BIOQUÍMICOS MOLECULARES DE LA DEFICIENCIA DE G6PD

Equilibrio Redox en el Eritrocito. La G6PD es la primera enzima de la vía de las pentosa-fosfato, una vía metabólica altamente conservada responsable de la producción de una variedad de moléculas fundamentales, incluyendo precursores de nucleótidos y NADPH (28). En la primera reacción de la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, la G6PD cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona con la producción concomitante de una molécula de NADPH. Cuando el 6-fosfogluconato se convierte en ribulosa-5-fosfato por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), se produce una segunda molécula de NADPH (Figura 2).

Es importante señalar que en el eritrocito, la vía de las pentosas fosfato es la única responsable de la producción de NADPH en respuesta al estrés oxidativo, actuando así como guardián del potencial redox en esta célula (29). El NADPH está implicado en al menos tres vías antioxi-

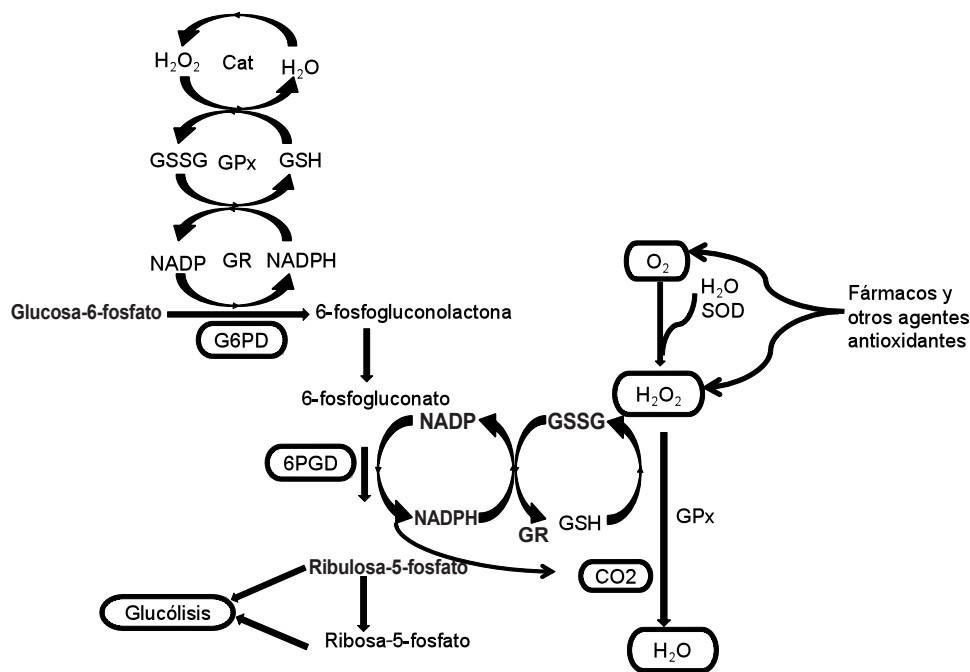


Figura 2. Vía de las pentosas fosfato. El NADPH se produce por la acción de la G6PD y la 6PGD. El NADPH sirve como donador de protones para la generación del glutatión reducido, el cual sirve como sustrato de la glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y la catalasa. Cat= catalasa. GPx= glutatión peroxidasa. GR= Glutatión reductasa. G6PD= Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. 6PGD= 6-fosfogluconato deshidrogenasa. SOD= Superóxido dismutasa. GSH= Glutatión reducido. GSSG= Glutatión oxidado. H_2O_2 = Peróxido. O_2 = Superóxido.

dantes: los ciclos del glutatión, de la tiorredoxina y de la glutarredoxina (Figura 2). En el primer ciclo, el NADPH se encarga de regenerar el glutatión (GSH) por la glutatión reductasa (GR). Los electrones del NADPH se donan durante la reacción catalizada por la GR, en el que el glutatión oxidado (GSSG) se reduce para liberar dos moléculas de GSH. En el eritrocito, el GSH es esencial para la reducción del peróxido de hidrógeno y los radicales libres (22). Por otra parte, la glutatión peroxidasa (GPX) elimina el peróxido de los eritrocitos, el GSH sirve como sustrato de esta enzima mientras que el NADPH se requiere para reducir el GSSG y los grupos sulfhidrilos oxidados de algunas proteínas.

La fisiopatología molecular de la deficiencia de G6PD ayuda a entender la correlación observada entre la distribución geográfica de la deficiencia de G6PD con las zonas endémicas de malaria (30). Diversos estudios apoyan la evidencia de que la malaria es un factor de selección que ha incrementado la prevalencia de la deficiencia de G6PD como un carácter favorable que confiere resistencia a la infección por *Plasmodium falciparum* (29). A este respecto, se proponen varios mecanismos a nivel molecular que podrían explicar esta resistencia, por ejemplo, la disminución de la proliferación de *P. falciparum* en los eritrocitos deficientes de G6PD como resultado de la acumulación intracelular de sustancias oxidadas tóxicas para el parásito, o la destrucción acelerada y selectiva de los eritrocitos deficientes e infectados (31).

Biología molecular de la G6PD. El gen de la G6PD se localiza en la región sub-telomérica del brazo largo del cromosoma X en el locus Xq28; por lo tanto, la deficiencia de esta enzima es una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X (32-34). La secuencia completa del gen de la G6PD presenta un tamaño de 18,5 Kb y está conformado por 12 intrones y 13 exones que codifican para un producto de 1545 pb (32). De manera inusual,

las primeras 600 pb de la región 5' del gen G6PD, correspondiente al exón 1 y parte del exón 2, no se traducen; por lo que el ATG de inicio se encuentra en la base 115 de las 127 pb que forman el exón 2. Esta secuencia no traducida inusualmente larga del extremo 5' contiene codones ATG fuera del marco de lectura y presenta 2 subregiones constituidas en un 80% por guaninas y citosinas, característica común entre los genes con expresión constitutiva. En cuanto a la región promotora del gen, se han señalado varias características interesantes i) su alto contenido en GC (más del 70%), ii) la ausencia del elemento CAAT ubicado frecuentemente en la posición -70 a -90 de diversos genes eucariotes (sitio esencial para el proceso de transcripción), iii) la sustitución de la clásica caja TATA por la secuencia ATTAAAT ubicada a -202 pb del codón de inicio y que, por analogía con la de otros genes, comparte la misma función, y iv) la presencia de por lo menos 9 sitios de tipo CCGCCC, los cuales parecen estar involucrados en la regulación del gen (32).

El análisis de la secuencia genética mostró una fuerte correlación entre el grado de conservación de los aminoácidos mutados con el cuadro clínico de la enfermedad; esto es, las mutaciones más graves ocurren en los aminoácidos más conservados. Este mismo análisis demostró que de manera consistente, las mutaciones que causan deficiencia clase I (grave) están agrupadas en el exón 10 (Figura 3), el cual codifica la región de la interface involucrada en la formación de la estructura dimérica de la enzima (35). En este mismo sentido, la gran mayoría de las mutaciones encontradas hasta la fecha consisten en sustituciones sencillas que modifican la codificación de un solo aminoácido (mutaciones *missense*), siendo poco común la presencia de una segunda mutación en el mismo gen (con excepción de la variante A- y algunas otras muy poco frecuentes). Hasta el momento, no existen reportes de mutaciones en la región promotora (36) (37).

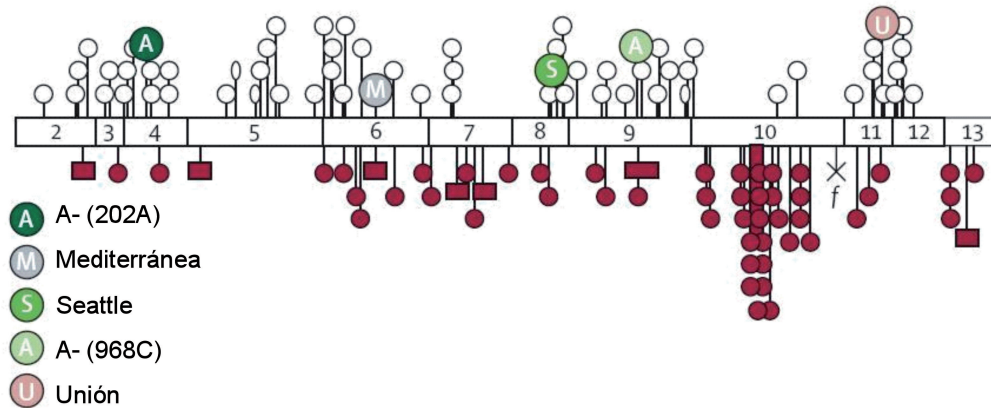


Figura 3. Mutaciones comunes en los exones del gen de la G6PD. Los rectángulos numerados representan los exones. Los círculos abiertos representan a las mutaciones que causan las variantes clase II y III. Los círculos llenos representan mutaciones esporádicas de la variante severa clase I. Los elipses abiertos son mutaciones que causan las mutaciones clase IV. Los cuadros llenos indican sitios de deleción (Adaptada de Capellini y Fiorelle (22)).

Bioquímica de la G6PD. La G6PD (EC 1.1.1.49) es una enzima ubicua que se encuentra presente en todas las formas de vida desde procariotes a animales (38). El alineamiento múltiple de más de 100 secuencias de la G6PD de diferentes organismos, identificó tres secuencias altamente conservadas en todo el espectro filogenético: la primera secuencia de 9 residuos (198-RID-HYLGKE-206, numeración correspondiente a la G6PD humana) contiene la lisina 205, la cual está implicada en la unión de la G6P y es esencial para la catálisis (39). La segunda secuencia (38-GxxGGDLA-44) es parte del sitio de unión a la coenzima; mientras que la última (170-EKPxG-174) contiene a la Pro172 la cual está involucrada en el correcto posicionamiento de los sitios de unión del sustrato y la coenzima (40).

La G6PD humana consta de 515 aminoácidos y presenta una masa molecular de 59.25 kDa; es una proteína citosólica que se expresa en todas las células de manera constitutiva pero cuyos niveles de expresión pueden diferir en un rango de hasta dos órdenes de magnitud en diferentes tejidos (41). La estructura secundaria de esta proteína se forma por un total de 15 regiones α -hélices y 15 hebras- β que se arreglan en un dominio de unión de coenzima con un plegamiento tipo Rossmann y una extensa región de interface formada por la asociación de dominios β + α pertenecientes al extremo C-terminal de cada subunidad (40) (Figura 4). En la enzima humana, cada uno de estos dominios estructurales pre-

senta un sitio de unión a ligando (40), el dominio tipo Rossmann contiene el sitio activo de la enzima que une la G6P y el NADP catalítico, mientras que un segundo sitio de unión a NADP se encuentra cerca de la región de la interface de la proteína (40) (42). Este segundo sitio de unión a la coenzima se encuentra al parecer conservado sólo en organismos superiores y está implicado en la dimerización y la estabilidad de la enzima (43) (44), de hecho, mutaciones localizadas cerca del sitio estructural promueven la disminución de la estabilidad de la enzima causando fenotipos severos de deficiencia (variantes clase I) (44).

En solución, la G6PD existe en un equilibrio dímero-tetrámero el cual es afectado por el pH y la fuerza iónica; a pH alcalinos y alta fuerza iónica el equilibrio se desplaza hacia el dímero, mientras que en condiciones de pH ácido y baja fuerza iónica se favorece el tetrámero (45). Dado que ambas especies oligoméricas presentan actividades catalíticas similares, el significado fisiológico de esta interconversión no se comprende (40).

El mecanismo cinético de la G6PD humana sigue un modelo de orden aleatorio en equilibrio rápido; esto es, cualquiera de los dos sustratos pueden unirse independientemente a la enzima antes del evento catalítico, que es el paso más lento de la reacción. Las constantes cinéticas calculadas para la enzima recombinante son k_{cat} 161 s⁻¹, K_m G6P 6,76 mM y K_m NADP 54,8 mM (46).

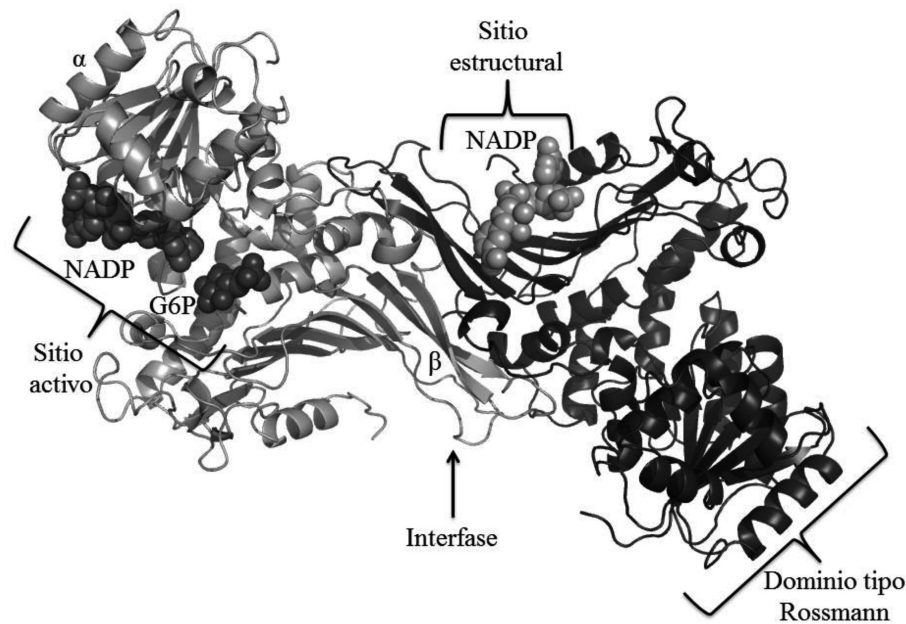


Figura 4. Estructura tridimensional del dímero de G6PD humana. Se indican los principales elementos estructurales de la proteína. Cada uno de los monómeros se muestra en un diferente tono de gris. Los sustratos de la enzima (G6P y NADP) y la coenzima estructural (NADP) se muestran como modelos de esferas; a manera de ejemplo, se indica un alfa hélice y una hebra beta. Por claridad, sólo uno de los monómeros ilustra la posición del sitio activo y el otro el sitio estructural. La figura se construyó en base a los archivos depositados en el Protein Data Bank 1QKI, 2BHL y 2BH9, utilizando el programa PyMOL (64).

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LAS VARIANTES PATOLÓGICAS DE G6PD

En el periodo precedente al reconocimiento de la deficiencia enzimática de G6PD como mecanismo subyacente de la hemólisis inducida por primaquina, algunos ensayos cualitativos como la observación de los cuerpos de Heinz y la estabilidad del glutatión, ayudaron a entender la fisiopatología y orientar el diagnóstico de la enfermedad (4). El siguiente avance en el diagnóstico de la enfermedad lo constituyó el desarrollo de métodos semi-cuantitativos que permitieron determinar la actividad de G6PD siguiendo la reducción de NADP a NADPH; dentro de éstos se incluye el método de la mancha fluorescente (47) y el método de la decoloración (48). Ambos métodos son sencillos, rápidos, sensibles y económicos; de tal forma que se utilizan frecuentemente en aquellos países en donde esta enfermedad presenta una alta prevalencia como aquéllos con una alta incidencia de malaria (22). Otro ensayo que cuantifica de manera indirecta la producción de NADPH es el del formazan (49), del cual posteriormente se reportó una modificación que disminuye el tiempo de preparación y facilita la interpretación de los resultados (50).

Acorde a las recomendaciones de la OMS, el diagnóstico bioquímico de la deficiencia de G6PD debe basarse en la cuantificación sérica de la actividad enzimática por métodos espectrofotométricos siguiendo la reducción del NADPH a 340 nm. En eritrocitos normales, la actividad de G6PD determinada por este método oscila entre 7 y 10 UI/g Hb a 30 °C (26). El ensayo de actividad de G6PD debe hacerse en sangre libre de leucocitos con el fin de eliminar la interferencia causada por la actividad de G6PD en las células blancas, especialmente en presencia de leucocitosis. En la medición de la actividad enzimática, algunos eventos provocan interferencia en la determinación, por ejemplo, un episodio agudo de hemólisis o una cuenta elevada de reticulocitos debido a que la actividad de la G6PD en las células jóvenes es mucho más alta que en las células maduras.

El siguiente paso en la comprensión de las bases moleculares de la deficiencia de G6PD lo constituyó el estudio de la proteína silvestre y las variantes patológicas purificadas a partir de lisados eritrocitarios. En general, se reconocía que las variantes patológicas presentaban variaciones en la movilidad electroforética y disminución de la estabilidad térmica, así como disminución de la actividad catalítica y modificaciones de la afinidad por la G6P y su análogo, 2-deoxi-G6P (9). Desafortunadamente, en vista de que la enzima purificada a partir de células sanguíneas es una mezcla de proteínas que provienen de eritrocitos de diferentes edades y, dado que la proporción de células nuevas y células envejecidas en un determinado momento puede modificarse por eventos fisiológicos o patológicos (la proporción puede variar, por ejemplo, después de un ataque hemo-

lítico), las propiedades estructurales y funcionales determinadas a partir de la enzima eritrocitaria purificada resultan ser el producto de una mezcla heterogénea. Esta heterogeneidad junto con las variaciones técnicas inter-laboratorios, ha promovido resultados imprecisos que dificultan significativamente el diagnóstico de la enfermedad. Por ejemplo, ninguna de las pruebas bioquímicas ayuda en el diagnóstico de las mujeres heterocigotas. Lo anterior debido a que el mosaicismo del cromosoma X provoca que estas pacientes presenten una doble población de células rojas, de las cuales aproximadamente el 50% presentan la deficiencia mientras que el resto no (51). En este mismo sentido, el diagnóstico oportuno en neonatos es complicado debido a que la mayoría de sus células rojas son jóvenes y, consecuentemente, conservan una elevada actividad de G6PD. Por lo tanto, la caracterización molecular del defecto genético constituye el método de certeza para el diagnóstico inequívoco de esta patología.

Para el diagnóstico molecular de la deficiencia de G6PD se han implementado diversas técnicas, entre las que se incluyen el sistema refractario de amplificación de mutaciones, la electroforesis desnaturante en geles de gradiente, las curvas de punto de fusión, microarreglos, HPLC desnaturante, ensayo de *dot blot* reverso, el ensayo de extensión de una sola base y el análisis de RFLP, por citar algunos (51) (52). En general, el diagnóstico puede involucrar dos etapas: la primera permite encontrar las mutaciones más frecuentes en una zona geográfica específica; para este fin, el ensayo más indicado es el de PCR-RFLP que representa una estrategia confiable, rápida y válida para la búsqueda orientada de mutaciones que se sospechan *a priori*. La segunda etapa, más costosa y complicada pero que permite detectar mutaciones menos frecuentes, se basa principalmente en la secuenciación del gen completo (53).

Los problemas asociados con el estudio de la G6PD obtenida de células eritrocitarias (heterogeneidad de la muestra), fueron finalmente sorteados con el aislamiento y la clonación del gen de la G6PD humana y la producción de la proteína recombinante. La purificación en mayor escala de una enzima fresca, pura, estable y homogénea, permitió la caracterización estructural y funcional de la proteína por medios bioquímicos y biofísicos, incluyendo la obtención de la estructura molecular de la proteína. A partir de la comparación de la enzima recombinante silvestre con las variantes construidas por medio de mutagénesis sitio dirigida, fue posible explicar en gran medida los efectos deletéreos que las mutaciones provocan en la proteína y que ayudan a entender el espectro clínico de esta deficiencia enzimática. A continuación, se exponen los estudios realizados con variantes recombinantes de la G6PD y las conclusiones más relevantes que de estos se desprenden.

La variante más común a nivel mundial, G6PD A-(V68M + N126D), fue la primera enzima recombinan-

te en estudiarse de manera detallada en por Town *et al* (54). Los resultados mostraron que ambas mutaciones son necesarias para producir el fenotipo patológico; las mutantes individuales mostraron mínimas perturbaciones catalíticas y estructurales, mientras que la doble mutante mostró un efecto aditivo en la pérdida de actividad y estabilidad de la proteína. Tang *et al* (55) estudiaron las variantes N165D (Taipéi), G163S y R198C, todas ellas localizadas cerca del sitio activo de la enzima. Los resultados mostraron que la actividad de las tres mutantes disminuyó notablemente; sin embargo, la ausencia de la estructura cristalográfica de la proteína no permitió entender la relación estructural entre los cambios introducidos por la mutación y la disminución de la actividad. Gómez Gallego *et al* (56) estudiaron el plegamiento de la variante A⁻ (V68M + N126D) encontrando que la doble mutación induce intermediarios parcialmente plegados que no son capaces de llevar a cabo la dimerización requerida para alcanzar la forma activa de la enzima.

La variante Volendam (P172S) se construyó y estudió por Roos *et al* (57); esta mutación es interesante dado que aún cuando no se encuentra en el exón 10, provoca una deficiencia grave (clase I). La proteína recombinante muestra un fuerte decremento en la actividad específica, afinidad disminuida por ambos sustratos y mayor sensibilidad a la termoinactivación. Los autores sugieren que el efecto sinérgico de la mutación, tanto en la actividad como en la estabilidad, puede explicar la severidad de la mutación.

Gómez Gallego *et al* (58) retomaron el estudio de la variante A⁻ (V68M + N126D). Aunque en este trabajo se encontró que las constantes cinéticas de la mutante fueron similares a las de la enzima silvestre, estudios estructurales y de modelaje molecular indicaron que la variante produce proteínas inestables, parcialmente plegadas, con disminución de la estructura terciaria y menor grado de dimerización. En su conjunto, los datos sugieren que la pérdida de especies correctamente plegadas podría explicar la deficiencia enzimática *in vivo*. Grabowska *et al* (59) construyeron la variante Suwalki (P409R) encontrando diferencias significativas tanto en la actividad como en la estabilidad de la mutante. El efecto de esta mutación se analizó utilizando un modelo de la estructura de la enzima humana silvestre, sugiriendo que el cambio afecta el sitio de unión del NADP⁺ estructural y las interacciones que contribuyen a la formación del tetrámero. Wang *et al* (60) caracterizaron las variantes Unión (R454C) y Ándalus (R454H). Los estudios cinéticos demostraron que para ambas mutantes, la velocidad máxima de la enzima disminuye aproximadamente 10 veces, mientras que la afinidad por los sustratos disminuyó alrededor de 5 veces; además, la estabilidad de ambas variantes es marginalmente menor con respecto a la de la enzima silvestre. Los autores concluyen que la disminución en la eficien-

cia catalítica de ambas mutantes contribuye al fenotipo de estas variantes.

Wang *et al* (61) analizaron las variantes Wisconsin (R393G) y Nashville (R393H) en las cuales el residuo modificado se encuentra cercano al sitio del NADP estructural y formando parte de la interface. Los estudios sobre la termoestabilidad, la desnaturalización y la digestión proteolítica, indicaron que la variante Nashville es menos estable que la enzima silvestre y la variante Wisconsin. En este mismo sentido, la afinidad de la variante Nashville por el NADP⁺ estructural es menor que la enzima silvestre y la variante Wisconsin. Los resultados sugieren que la inestabilidad de la variante Nashville, aunada a su baja afinidad por la coenzima estructural, podrían explicar las manifestaciones clínicas de esta mutación; sin embargo, para la variante Wisconsin los resultados obtenidos no permitieron discernir el origen de la deficiencia. Huang *et al* (62) analizaron las variantes Plymouth (G163D) y Mahidol (G163S); los resultados mostraron que los parámetros cinéticos de las variantes fueron semejantes a los de la enzima silvestre; sin embargo, la estabilidad de las mutantes fue marcadamente menor respecto a la enzima silvestre. Aunado a la inestabilidad, ambas mutantes presentaron defectos importantes en su plegamiento, por lo que los autores sugieren que la inestabilidad estructural parece ser la base molecular del fenotipo clínico. Por último, Wang *et al* (44) (63), estudiaron la importancia de la coenzima estructural en la estabilidad y el plegamiento de la G6PD silvestre y cómo estas propiedades se afectan en las variantes Campinas (G488V), G6PD Fukaya (G488S), Wisconsin (R393G) y Nashville (R393H). Estas variantes comparten la característica de que las mutaciones se encuentran cercanas al sitio del NADP estructural. Los resultados indicaron que todas estas mutaciones disminuyen la afinidad por la coenzima, decrecen el rendimiento del plegamiento alcanzado en experimentos de renaturalización y muestran una sensibilidad aumentada a la proteólisis por quimi tripsina y a la inactivación por calor. En su conjunto, los datos indican que todas estas mutaciones afectan la unión del NADP estructural dificultando el plegamiento de la proteína y causando inestabilidad en la proteína plegada.

Conclusiones

Como se mencionó, es importante reiterar que a pesar de la existencia de más de 160 variantes patológicas de G6PD descritas en todo el mundo, sólo las aquí descritas se han estudiado desde un punto de vista bioquímico, biofísico y estructural. Sin duda, estos aspectos pocos tratados de la deficiencia de G6PD representan un espacio de oportunidad interesante para la investigación biomédica básica. Como lo muestra este trabajo, el estudio detallado de la proteína recombinante hu-

mana permite explicar la relación estructura-función de la proteína silvestre y sus variantes patológicas. Por lo tanto, el extender los estudios hacia el sustrato molecular responsable de la misma, permitirá contribuir de manera sustancial a la comprensión de las bases moleculares de la fisiopatología en la deficiencia humana de G6PD. Lo anterior sentará las bases para que, a futuro, se realicen estudios como los de interacción entre moléculas pequeñas y las mutantes de G6PD (*Docking*) para identificar biomoléculas que se unan a la proteína e incrementen la estabilidad de estas variantes, o bien, restauren sus propiedades catalíticas permitiendo desarrollar nuevas opciones terapéuticas para esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los proyectos CONACyT 154570 (SGM), 104841 (HRV) y 106126 (JOH). De igual forma agradecen a Diana Angélica López García, Jessica Terrón-Hernández y Sandra Tobón-Cornejo, por su asistencia en la revisión bibliográfica.

CORRESPONDENCIA

JESÚS ORIA-HERNÁNDEZ
HORACIO REYES-VIVAS

Laboratorio de Bioquímica Genética. Instituto Nacional de Pediatría

Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacán, MÉXICO D.F., México

Tel. (+52) (55) 1084 0900 Ext. 1442

Correo-e: jesus.oria.inp@gmail.com;

hreyesvivas@yahoo.com.mx.

Referencias bibliográficas

- van Wijk R, van Solinge WW. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 2005; 106(13): 4034-42.
- Feig SA, Segel GB, Morimoto K. Childhood Anemias. In: Yazdani S, McGhee SA Stiehm R (Eds.) *Chronic Complex Diseases of Childhood: A Practical Guide for Clinicians*. Boca Raton, Florida: Brown Walker Press, 2011. pp. 223-230.
- Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Valentini G. Red Cell Piruvate Kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *Br J Haematol* 2005; 130: 11-25.
- Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; a historical perspective. *Blood* 2008; 111: 16-24.
- Peters AL, Van Noorden CJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *J Histochem Cytochem* 2009; 57(11): 1003-11.
- Beutler E, Yoshida A. Genetic variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase: a catalog and future prospects. *Medicine* 1988; 67: 311-34.
- Beutler E. G6PD: population genetics and clinical manifestations. *Blood Rev* 1996; 10: 45-52.
- Ramírez-Cheyne J, Zarante I. Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: situación actual, su relación con malaria y estrategias para calcular su prevalencia. *Univ Med Bogotá (Colombia)* 2009; 50 (1): 58-76.
- WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ* 1989; 67: 601-11.
- Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 42(3): 267-78.
- Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *Am Fam Physician* 2005; 7: 1277-82
- Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M *et al.* G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. *PLoS Med* 2012;9(11):e1001339.
- Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD Deficiency: Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy. *Adv Parasitol* 2013; 81: 133-201.
- Lopez R, Cooperman JM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hyperbilirubinaemia in the newborn. *Am J Dis Child* 1971; 122: 66-70.
- Beutler E, Gelbart T, Miller W. Severe jaundice in a patient with a previously undescribed glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutation and Gilbert syndrome. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 28: 104-7.
- Kaplan M, Rubaltelli FF, Hammerman C, Vilei MT, Leiter C, Abramov A *et al.* Conjugated bilirubin in neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* 1996; 128: 695-7.
- Johnson LH, Bhutani VK. System-based approach to management of neonatal jaundice and prevention of *kernicterus*. *J Pediatr* 2002; 140: 396-403.
- Maisels MJ. Neonatal jaundice. *Pediatr Rev* 2006; 27: 443-54.
- Carette C, Dubois-Laforgue D, Gautier JF, Timsit J. Diabetes mellitus and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: from one crisis to another. *Diabetes Metab* 2011; 37(1): 79-82.
- Lee DH, Warkentin TE, Neame PB, Ali M. Acute hemolytic anemia precipitated by myocardial infarction and pericardial tamponade in G6PD deficiency. *Am J Hematol* 1996; 51: 174-5.
- Ninfali P, Bresolin N. Muscle glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and oxidant stress during physical exercise. *Cell Biochem Funct* 1995; 13: 297.
- Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008; 9606: 64-74.
- Siddiqui T, Khan AH. Hepatitis A and cytomegalovirus infection precipitating acute hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Mil Med* 1998; 163: 434-5.
- Tugwell P. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in Nigerians with jaundice associated with lobar pneumonia. *Lancet* 1973; 1: 968-9.

25. McCaffrey RP, Halsted CH, Wahab MFA, Robertson RP. Chloramphenicol-induced hemolysis in Caucasian glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Ann Intern Med* 1971; 74: 722-6.
26. Beutler E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods, 3rd edn. New York: Grune and Stratton; 1984.
27. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev* 2007; 5: 267-83.
28. Miclet E, Stoven V, Michels PA, Opperdoes FR, Lallemand JY, Duffieux F. NMR spectroscopic analysis of the first two steps of the pentose-phosphate pathway elucidates the role of 6-phosphogluconolactonase. *J Biol Chem* 2001; 276(37): 34840-6.
29. Manganelli G, Fico A, Martini G, Filosa S. Discussion on pharmacogenetic interaction in G6PD deficiency and methods to identify potential hemolytic drugs. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2010; 10: 143-50.
30. Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med* 1998; 76: 581-8.
31. Janney SK, Joist JJ, Fitch CD. Excess Release of ferriheme in G6PD-deficient erythrocytes: Possible Cause of hemolysis and resistance to Malaria. *Blood* 1986; 67: 331-3.
32. Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, Luzzatto L *et al.* Paonessa G, D'Urso M, Persico MG. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *EMBO J* 1986; 5(8): 1849-55.
33. Szabo P, Purrello M, Rocchi M, Archidiacono N, Alhadeff B, Filippi G *et al.* Cytological mapping of the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene distal to the fragile-X site suggests a high rate of meiotic recombination across this site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 7855-9.
34. Trask BJ, Massa H, Kenwick S, Gitschier J. Mapping of human chromosome Xq28 by two-color fluorescence in situ hybridization of DNA sequences to interphase cell nuclei. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1-15.
35. Cheng YS, Tang TK, Hwang MJ. Amino acid conservation and clinical severity of human glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations. *J Biomed Sci* 1999; 6: 106-14.
36. Franzè A, Ferrante MI, Fusco F, Santoro A, Sanzari E, Martini G *et al.* Molecular anatomy of the human glucose 6-phosphate dehydrogenase core promoter. *FEBS Lett* 1998; 437: 313-8.
37. Menounos PG, Garinis GA, Patrinos GP. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency does not result from mutations in the promoter region of the G6PD gene. *J Clin Lab Anal* 2003; 17(3): 90-2.
38. Luzzatto L, Battistuzzi G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Advances in Human Genetics* 1985; 14: 217-386.
39. Bautista JM, Mason PJ, Luzzatto L. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Lysine 205 is dispensable for substrate binding but essential for catalysis. *FEBS Lett* 1995; 366: 1.
40. Kotaka M, Gover S, Vandeputte-Rutten L, Au SWN, Lam V, Adams M. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP+ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Cryst* 2005; D61: 495-504.
41. Luzzatto L, Mehta A, Vulliamy T. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, Chapter 179, pp 4517-4553.
42. Au SWN, Naylor CE, Gover S, Vanderputte, Rutten L, Scopes DA *et al.* Solution of the structure of tetrameric human glucose 6-phosphate dehydrogenase by molecular replacement. *Acta Crystallogr* 1999; D55: 826-34.
43. Au SWN, Gover S, Lam V, Adams M. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the cristal structure reveals a structural NADP+ molecule and provides. *Structure* 2000; 8: 293-303.
44. Wang XT, Chan TF, Lam V, Engel P. What is the role of the second "structural" NADP+-binding site in human glucose-6-phosphate dehydrogenase? *Protein Science* 2008; 1403-11.
45. Cohen P, Rosemeyer MA. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Eur J Biochem* 1969; 8: 8-15.
46. Wang XT, Au SWN, Lam VMS, Engel PC. Recombinant human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Evidence for a rapid-equilibrium random-order mechanism. *Eur J Biochem* 2002; 269: 3417-24.
47. Beutler E, Mitchell M. Special modifications of the fluorescent screening method for glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 1968; 32: 816-8.
48. Motulsky AG, Campbell-Kraut IM. Population genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the red cell. In: Blumberg BS, ed. *Proceedings of the conference on genetic polymorphisms and geographic variations in disease*. New York: Grune and Stratton: 1961;159.
49. Hirono A, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Nat Acad Sci* 1988; 85: 3951-4.
50. Tantalur IS, Kawamoto F. An improved, simple screening method for detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trop Med Int Health* 2003; 8(6): 569-74.
51. Kaplan M, Hammerman C. Neonatal screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: biochemical versus genetic technologies. *Semin Perinatol* 2011; 35(3): 155-61.
52. Kaplan M, Hammerman C. The need for neonatal glucose-6-phosphate dehydrogenase screening: a global perspective. *J Perinatol* 2009; Suppl 1:S46-52.
53. Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why? *IUBMB Life* 2009; 61(1): 27-34.
54. Town M, Bautista JM, Mason PJ, Luzzatto L. Both mutations in G6PD A- are necessary to produce the G6PD deficient phenotype. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 171-4.

55. Tang TK, Yeh CH, Huang CS, Huang MJ. Expression and biochemical characterization of human glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*: a system to analyze normal and mutant enzymes. *Blood* 1994; 83(5): 1436-41.
56. Gómez-Gallego F, Garrido-Pertierra A, Mason PJ, Bautista JM. Unproductive folding of the human G6PD-deficient variant A-. *FASEB J* 1996; 10(1): 153-8.
57. Roos D, van Zwieten R, Wijnen JT, Gómez-Gallego F, de Boer M, Stevens D *et al.* Molecular basis and enzymatic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase volendam, leading to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood* 1999; 94(9): 2955-62.
58. Gomez-Gallego F, Garrido-Pertierra A, Bautista JM. Structural defects underlying protein dysfunction in human glucose-6-phosphate dehydrogenase A- deficiency. *J Biol Chem* 2000; 275:13: 9256-62.
59. Grabowska D, Jablonska-Skwiecincka E, Plochocka D, Chelstowska A, Lewandowska I, Witos I *et al.* A novel mutation in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in a subject with chronic nonspherocytic hemolytic anemia--characterization of enzyme using yeast expression system and molecular modeling. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32(1): 124-30.
60. Wang XT, Lam VM, Engel PC. Marked decrease in specific activity contributes to disease phenotype in two human glucose 6-phosphate dehydrogenase mutants, G6PD(Union) and G6PD(Andalus). *Hum Mutat* 2005; 26(3): 284.
61. Wang XT, Lam VM, Engel PC. Functional properties of two mutants of human glucose 6-phosphate dehydrogenase, R393G and R393H, corresponding to the clinical variants G6PD Wisconsin and Nashville. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762(8): 767-74.
62. Huang Y, Choi MY, Au SW, Au DM, Lam VM, Engel PC. Purification and detailed study of two clinically different human glucose 6-phosphate dehydrogenase variants, G6PD(Plymouth) and G6PD(Mahidol): Evidence for defective protein folding as the basis of disease. *Mol Genet Metab* 2008; 93(1): 44-53.
63. Wang XT, Engel PC. Clinical mutants of human glucose 6-phosphate dehydrogenase: impairment of NADP(+) binding affects both folding and stability. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(8): 804-9.
64. Delano WL. The PyMOL molecular graphics systems, Delano Scientific, Palo Alto, CA, USA. Disponible en <http://www.pymol.org/>.

Recibido: 25 de marzo de 2014

Aceptado: 19 de septiembre de 2014