

Identificación molecular de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) detectada en el tamiz neonatal

Clara Aurora Zamorano-Jiménez¹, Héctor Alfredo Baptista-González^{2*}, Patricia Bouchán-Valencia^{2,3}, Martha Lucía Granados-Cepeda⁴, Rocío Trueba-Gómez^{2,3}, Georgina Coeto-Barona², Fany Rosenfeld-Mann², Luisa Blanca Rosa-Mireles⁴ y Rocío Meléndez-Ramírez⁴

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Maestría en Ciencias Médicas, UNAM, México, D.F., ²Hematología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología, México, D.F., ³Doctorado en Ciencias Químico-biológicas, ENCB-IPN, México, D.F., ⁴Coordinación de Tamiz Neonatal, Instituto Nacional de Perinatología, México, D.F.

Resumen

Objetivo: Presentar la estrategia de identificación de las variantes moleculares de la G6PD detectados en el tamiz neonatal (TN). **Material y métodos:** Serie de casos incidentes de recién nacidos (RN) detectados en el TN con deficiencia de G6PD. A partir de DNA nuclear, con la metodología de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) se buscaron las variantes moleculares de la G6PD: G202A, A376G, T968C y C563T. **Resultados:** Se evaluaron 21,619 neonatos, 41 casos fueron reactivos en el TN para G6PD (tasa de 189.6/100,000 RN tamizados); en 34 casos se confirmó la variante molecular de G6PD (tasa de 157.3/100,000 RN tamizados). La combinación alélica más frecuente fue G202A/A376G (proporción y actividad promedio de G6PD de 0.460 y 1.72 ± 0.35 U/g de hemoglobina [Hb], respectivamente), seguida de G202A (0.170 y 1.74 ± 0.27 U/g de Hb) y de la combinación A376G/T968C (proporción 0.150 y 1.10 ± 0.44 U/g de Hb). La variante alélica T968C mostró actividad enzimática más baja que el resto (1.1 ± 0.4 ; $p = 0.02$). Se detectaron dos mujeres con deficiencia de G6PD, con variante G202A/A376G y G202A. **Conclusiones:** Esta estrategia molecular permite identificar las variantes involucradas hasta en el 80% de los casos. Los alelos de origen africano fueron prevalentes.

PALABRAS CLAVE: Deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Enfermedad hemolítica del recién nacido. Ictericia neonatal. Anemia neonatal. Tamiz neonatal.

Abstract

Aims: To present the strategy of identifying the molecular variants of G6PD detected in neonatal screening (NS). **Material and Methods:** We present a series of incident cases of newborns positive for G6PD deficiency detected in NS. From nuclear DNA with the methodology of real-time PCR we sought molecular G6PD variants: G202A, A376G, T968C and C563T. **Results:** Of a total of 21,619 neonates, 41 cases were reactive in NS for G6PD (189.6/100,000 RN screened rate), 34 cases confirmed the molecular variant of G6PD (157.3/100,000 RN screened rate). The most frequent allele combination G202A/A376G (G6PD ratio and median activity, 0.460 and 1.72 ± 0.35 U/g Hb, respectively), followed by G202A (0.170 and 1.74 ± 0.27 U/g Hb) and A376G/T968C (ratio 0.150 and 1.10 ± 0.44 U/g Hb). The T968C allelic variant showed lower enzyme activity than the

Correspondencia:

*Héctor Alfredo Baptista González
Hematología Perinatal
Instituto Nacional de Perinatología
Montes Urales, 800
Col. Lomas Virreyes, Del. Miguel Hidalgo, C.P. 11000, México, D.F.
E-mail: baptistagh@gmail.com

Fecha de recepción: 21-08-2013

Fecha de aceptación: 03-03-2014

rest (1.1 ± 0.4 ; $p = 0.02$). Two women were detected with G6PD deficiency with G202A/A376G and G202A variant. **Conclusions:** African alleles were prevalently detected in neonatal screening. This strategy allows the identification of molecular variants involved in 80% of cases. (Gac Med Mex. 2015;151:34-41)

Corresponding author: Héctor Alfredo Baptista González, baptistagh@gmail.com

KEY WORDS: G6PD deficiency. Hemolytic disease of newborn. Neonatal jaundice. Neonatal anemia. Neonatal screening.

Introducción

El tamiz neonatal es un conjunto de pruebas diseñadas para efectuar intervenciones de prevención secundaria mediante el diagnóstico preclínico de diversas enfermedades hereditarias, con el cumplimiento de un grupo de criterios metodológicos ampliamente descritos y actualizados¹. Las enfermedades candidatas a ser incluidas en el TN varían de acuerdo a la población blanco donde será aplicada, por lo que se requiere la validación de cada prueba en el contexto clínico particular^{1,2}, como es el caso de la detección de deficiencia de la G6PD.

La deficiencia de la G6PD pertenece al grupo de las anemias hemolíticas hereditarias y su prevalencia varía entre poblaciones. Al día de hoy se conocen más de 400 variantes de la G6PD y presenta un patrón de herencia ligado al cromosoma X, del cual se conocen cerca de 140 mutaciones de un sólo nucleótido (polimorfismo de nucleótidos simples [SNP])³.

La deficiencia de G6PD muestra amplia variabilidad en su expresión clínica, desde asintomática hasta aquellos casos con anemia hemolítica e hiperbilirrubinemia neonatal (HBN) severa³. Las diferentes mutaciones generan diversas concentraciones de la enzima eritrocitaria, sin tener una relación proporcional de mayor severidad y de expresión clínica⁴. La mayor parte de los sujetos afectados por esta deficiencia son asintomáticos y solamente cuando ocurre la exposición a sustancias oxidantes, como algunos alimentos, medicamentos o eventos infecciosos, pueden desencadenar crisis de hemólisis⁵.

La prevalencia global de la deficiencia de G6PD varía ampliamente de acuerdo a la región geográfica y el método analítico empleado⁵. La mayor prevalencia ocurre en regiones subsaharianas, donde afecta a entre el 23 y 39% de la población. En Latinoamérica varía de acuerdo al mestizaje africano poblacional⁴; para México se reporta del 0.39-4.09% de acuerdo a la zona geográfica^{6,7}, mientras que en grupos indígenas se presenta del 0.28 al 6.22%⁷ de la población estudiada. Existen informes sobre la asociación de

HBN y la deficiencia de G6PD para neonatos que regresan al hospital por ictericia, hasta el 47% de ellos presenta deficiencia de G6PD⁸. En nuestro medio hay reportes aislados de la ocurrencia en la deficiencia de G6PD, que varía del 0.43-0.66% en neonatos de término sin ictericia⁹ hasta el 1.57% en los casos con HBN¹⁰. A pesar de su elevada prevalencia, la detección de la deficiencia de la G6PD no es una prueba obligatoria incluida en el TN en México, ni existen reportes sobre el seguimiento clínico de los casos detectados con deficiencia de G6PD en población abierta o en el periodo neonatal, lo que impide estimar el impacto clínico o epidemiológico de este grupo de mutaciones y estimar el posible beneficio de su prevención primaria.

El objetivo del trabajo es presentar los resultados en la estrategia de identificación de las variantes moleculares de la G6PD, en los casos detectados en el TN, mediante el empleo de una técnica de recolección no invasiva, para la obtención del material genómico en el diagnóstico molecular de la deficiencia de G6PD, bajo los requisitos señalados en los estudios de asociación genética presentes en la Declaración STREGA¹¹.

Material y métodos

Se realizó un estudio observacional, longitudinal, prospectivo y descriptivo a partir del mes de febrero de 2008, cuando se incluyó en el TN la determinación de la actividad de la G6PD. Se evaluaron consecutivamente en el tamiz todos los RN del Instituto Nacional de Perinatología, que es un hospital de tercer nivel de atención de pacientes con embarazos de alto riesgo y con alta prevalencia de nacimientos pretérmino. Se incluyeron los neonatos, independientemente de edad gestacional y peso al nacimiento, hospitalizados en las salas de alojamiento conjunto y en las unidades de cuidados especiales. Fueron diferidos o excluidos de su realización los casos con muerte neonatal temprana, así como aquellos neonatos gravemente enfermos, por no contar con muestra sanguínea, para el estudio inicial.

La detección semicuantitativa de G6PD se realizó en la etapa posnatal por un método rápido como prueba

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos de los iniciadores y las sondas de hibridación usados para la determinación de los polimorfismos de la G6PD

Polimorfismo evaluado	Secuencia	Tm (°C)
G202A F	5' TCAGgTggCTgTTCCg 3'	62.9
G202A R	5' CTCACCTCTgTTTgCggAT 3'	59.9
G202A Sen	5' CCgAAAACACCTTCATCgTgggCT—FL 3'	67.4
G202A Anc	5' LC640-gCCCgTTCCCGCCTCACAgTggCTgACA-PH 3'	79.7
A376G F	5' TgTCTgTCTgTCCgTgTCTCC 3'	65.9
A376G R	5' ACTCgTgAATgTTCTTggTgA 3'	62.9
A376G Sen	5' gCgCCTCAACAgCCACATggATgCCCT—FL 3'	75.6
A376G Anc	5' LC640- ACCTggggTCACAggCCAACCgCCTCTT—PH 3'	75.5
C563T F	5' gTTCAAgggggTAACgCAg 3'	66.4
C563T R	5' CACCTCAgCACCATgAggTT 3'	66.5
C563T Sen	5' CATCTCCTCCCTgTTCC—FL 3'	49.4
C563T Anc	5' LC640-AggACCAGATCTACCgCATCgACCACTAC—PH 3'	66.2
T968C F	5' CCAgTACgTggggAAC 3'	58.8
T968C R	5' CAgTgCCCgCACAC 3'	61
T968C Sen	5' ggTCgTCCgggTACCCTTT—FL 3'	60.5
T968C Anc	5' LC640 gTggCCTCgCCCTCTCCATCg—PH 3'	69.6

F: iniciador o primer sentido; R: iniciador o primer antisentido; Sen: sonda sensor (5'LC Red 640, 3'ph: fosfato); Anc: sonda ancla (3'-FL: fluoresceína); Tm: temperatura de fusión.

de escrutinio, mediante una técnica colorimétrica (Neonatal G6PD Assay, Semiquantitative; Bio-Rad Laboratories) en muestras de sangre contenidas en una matriz seca (tarjeta de Guthrie). El punto de corte para definir la deficiencia de G6PD se consideró con valores ≤ 2.6 U/g de Hb. Los casos reactivos en el TN fueron posteriormente evaluados, junto con sus familias, para el estudio molecular confirmatorio. El seguimiento clínico y hematológico de los casos se mantuvo al menos en el primer año de vida en la consulta externa de Hematología Pediátrica.

Mediante el raspado de la mucosa oral con un hisopo de Dacrón poliéster, se obtuvo material celular de descamación para la extracción del DNA. Para el caso de las madres, se recolectó muestra de sangre mediante la punción de la vena periférica para extraer posteriormente DNA nuclear. En este reporte no se incluyen los resultados de los padres o hermanos integrantes de la familia.

El DNA se extrajo empleando un método comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit Roche®, Mannheim, Alemania). La muestra se almacenó a -70°C hasta su estudio molecular.

Debido al gran número de polimorfismos asociados a la deficiencia de G6PD existentes en nuestro país⁶, se estableció una estrategia para optimizar el estudio confirmatorio molecular. La selección de los polimorfismos de la G6PD se efectuó mediante la consulta de opinión de tres expertos nacionales en el tema (R. Lisker, G. Vaca y B. Ibarra Cortés), que consideraron 14 polimorfismos reportados con mayor frecuencia en nuestro país^{5,6}; adicionalmente se incorporaron los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud¹². Para este reporte se seleccionó un primer bloque de cuatro polimorfismos: dos de origen africano (G202A y A376G) y dos de origen europeo (C563T y T968C), con mayor prevalencia nacional^{13,14}.

Debido a su accesibilidad para la aplicación en el contexto clínico, se seleccionó la metodología de PCR-TR mediante el formato de sondas de hibridación¹⁵. Los diseños para los diferentes SNP fueron realizados por TIB MOLBIOL (Eresburgstrasse, Berlín) (Tabla 1).

Por ser una condición con mecanismo de herencia ligada al cromosoma X, los casos del género masculino identificados mediante las pruebas moleculares fueron definidos como hemicingotos mutados. Los casos

Tabla 2. Tasa de incidencia de casos detectados en el TN para la deficiencia de la G6PD

Periodo de evaluación	RNV (22,828)	Tamizados (21,619)	% (94.7)	Casos		Tasa x 100,000 RNV	
				Reactivos (n = 41)	Confirmados (n = 34)	Tamiz (189.6)	Confirmados (157.3)
De febrero a diciembre de 2008	5,110	4,927	96.4	6	4	121.8	81.2
De enero a diciembre de 2009	4,772	4,528	94.8	9	9	198.7	198.7
De enero a diciembre de 2010	4,189	4,083	97.5	10	7	244.9	171.4
De enero a diciembre de 2011	4,229	4,131	97.7	8	6	193.6	145.2
De enero a diciembre de 2012	4,528	3,950	87.2	8	8	202.5	202.5

del género femenino identificados fueron definidos como homocigotos o heterocigotos mutados. Los casos donde no se detectaron los polimorfismos evaluados se definieron como de presentación natural (WT).

La presentación de los resultados es mediante estadística descriptiva, que consiste en frecuencias, porcentajes, tasas y proporciones de la cohorte incipiente presentada. La frecuencia de casos identificados se reporta en tasas por 100,000 recién nacidos vivos (RNV). Se utilizó la prueba estadística paramétrica análisis de varianza de un solo factor o no paramétrica Kruskal-Wallis (de acuerdo a la distribución de los datos) en la comparación de los alelos mutados y combinación alélica con el porcentaje de actividad de la enzima G6PD y niveles de bilirrubina sérica total con valor de p estadísticamente significativo de 0.05.

Este protocolo fue aprobado, aprobado por la Comisión de Ética en Investigación del instituto, se financió en su totalidad con fondos federales asignados al proyecto. Los autores declaran la no existencia de conflicto de interés alguno.

Resultados

Durante el periodo comprendido entre febrero de 2008 y diciembre de 2012, se atendieron 22,828 RNV, con una cobertura del 94.7% del programa de TN de la población susceptible (21,619 neonatos). En este periodo se identificaron 41 casos inicialmente reactivos para la detección de la deficiencia de G6PD (Tabla 2), con tasa de 189.6 casos por cada 100,000 RN tamizados. Los casos identificados mediante las pruebas moleculares fueron 34 neonatos, con tasa de 157.3 casos por cada 100,000 RN tamizados. En la distribución de género, dos casos fueron mujeres (proporción de 0.050) y los restantes 39 casos fueron neonatos de género masculino (proporción de 0.950).

Un total de 1,209 RN (5.3%) no fueron incluidos en el TN por diversas causas, entre las que se encuentran muerte neonatal temprana, traslado hospitalario, egreso hospitalario temprano y no visita a la consulta externa a realizar el tamiz metabólico neonatal.

La distribución en las concentraciones de la actividad enzimática de la G6PD detectadas en el tamiz varió de 0.2 a 2.6 U/g de Hb. En siete casos se reportó como WT, todos ellos varones; la ictericia se detectó en tres casos; en dos casos los valores de actividad de la G6PD se presentaron cercanos a los valores de corte. Se identificaron reactivos en el TN a dos neonatos del sexo femenino: uno mostró actividad de la G6PD de 0.8 U/g de Hb y recibió la herencia de ambos padres de la combinación alélica G202A/A376G; el segundo caso femenino presentó actividad de la enzima G6PD de 2.5 U/g de Hb, con la presencia heterocigota del alelo G202A, en cuya madre no se detectó ninguna de las variantes moleculares estudiadas y no fue posible contar con la muestra sanguínea del padre. En ningún caso se identificó la variante alélica mediterránea C563T de la G6PD (Tabla 3).

Las concentraciones de la actividad de la G6PD para las variantes alélicas T968C, G202A y A376G presentan dispersión de 1.1 ± 0.4 (0.50-1.80) 1.73 ± 0.3 (0.80-2.20) y 1.57 ± 0.46 (0.50-2.20), respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p = 0.02$). De los 41 neonatos inicialmente reactivos, en seis casos se tuvieron valores de actividad de G6PD de ≤ 1.0 U/g de Hb (proporción de 0.150); 29 casos adicionales mostraron valores de 1.1 a 2.0 U/g de Hb (proporción de 0.700), y concentraciones de 2.1 a 2.6 U/g de Hb se presentaron en los seis casos restantes (proporción de 0.150). La variante alélica T968C mostró la mayor proporción de casos con actividad enzimática de G6PD < 1.0 U/g/Hb (0.333 contra 0.037 y 0.120, respectivamente). No hay

Tabla 3. Descripción de las variantes alélicas identificadas en el binomio madre-hijo, valores de la actividad enzimática y expresión clínica

Número consecutivo	Género	Actividad de G6PD (U/g de Hb)	Alelos G6PD neonatal	Alelos G6PD materno	Ictericia/HBN
1	Masculino	1.9	WT	WT	No
2	Masculino	1.8	G202A/A376G	G202A/A376G	No
3	Masculino	1.6	G202A/A376G	G202A/A376G*	Sí/13.9
4	Masculino	2.7	G202A/A376G	G202A/A376G*	No
5	Masculino	1.0	A376G/T968C	A376G/T968C	Sí/10.6
6	Masculino	0.5	A376G/T968C	A376G/T968C	Sí/16.3
7	Masculino	2.4	WT	WT	No
8	Femenino	0.8	G202A/A376G	G202A/A376G	No
9	Masculino	1.4	G202A/A376G	G202A/A376G	No
10	Masculino	2.1	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/8.7
11	Masculino	1.7	G202A/A376G	G202A/A376G†	No
12	Masculino	1.9	G202A/A376G	G202A/A376G†	Sí/5.7
13	Masculino	1.2	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/17.6
14	Masculino	1.7	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/ND
15	Masculino	1.2	A376G/T968C	A376G/T968C	Sí/14.3
16	Masculino	0.8	A376G/T968C	A376G/T968C	No
17	Masculino	1.7	G202A/A376G	G202A/A376G	No
18	Masculino	2.2	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/12.4
19	Masculino	2.1	G202A	G202A	Sí/10.3
20	Masculino	2.0	G202A	G202A	Sí/7.1
21	Masculino	0.5	WT	WT	No
22	Masculino	1.7	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/11.4
23	Masculino	2.6	WT	WT	Sí/17.8
24	Masculino	1.3	WT	WT	No/8.2
25	Femenino	2.5	G202A	WT	Sí/8.1
26	Masculino	1.8*	G202A	G202A	No/5.6
27	Masculino	1.5	G202A	G202A	Sí/7.4
28	Masculino	2.2	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/10.9
29	Masculino	1.3	G202A	G202A	Sí/21.2
30	Masculino	1.6	WT	WT	No
31	Masculino	1.7	G202A	G202A	No
32	Masculino	1.8	G202A/A376G	G202A/A376G	No
33	Masculino	0.2	WT	WT	Sí/13.4
34	Masculino	1.8	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/6.1
35	Masculino	1.2	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/ND
36	Masculino	1.5	A376G/T968C	A376G/T968C	Sí/8.4
37	Masculino	2.0	G202A/A376G	ND	Sí/10.5
38	Masculino	1.4	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/6.8
39	Masculino	1.8	G202A	G202A	Sí/8.6
40	Masculino	1.8	G202A/A376G	G202A/A376G	Sí/12.4
41	Masculino	1.8	A376G/T968C	A376G/T968C	Sí/14.4

WT no mutado para los SNP estudiados.

ND: no determinado.

*,†: madre con dos casos reactivos.

Tabla 4. Variantes alélicas de la deficiencia de G6PD, concentración enzimática y bilirrubinas séricas totales

Variables		Alelo G6PD		
		T968C* (n = 6)	G202A (n = 27)	A376G (n = 25)
Concentración de actividad G6PD (U g/Hb)*		1.1 ± 0.4 (0.50-1.80)	1.73 ± 0.3 (0.80-2.20)	1.57 ± 0.46 (0.50-2.20)
Estrato G6PD (n/desvío estándar)	< 1.0 (6/0.150)	0.333	0.037	0.120
	1.0-2.0 (29/0.700)	0.667	0.778	0.760
	2.0-2.6 (6/0.150)	0.000	0.185	0.120
Presencia de ictericia (proporción)	No	0.167	0.296	0.280
	Sí	0.833	0.704	0.720
Bilirrubina sérica (mg/dl)	Promedio, DE (amplitud)	12.8 ± 3.2 (8.4-16.0)	10.4 ± 4.3 (5.6-21.0)	11.3 ± 3.5 (5.7-18.0)

DE: desviación estándar.

*Alelo T968C versus resto de alelos. Prueba de Kruskal-Wallis significancia 0.020.

diferencias estadísticamente significativas en la ocurrencia de ictericia neonatal o en la concentración sérica de bilirrubinas por variante alélica (Tabla 4).

La combinación alélica más frecuente fue G202A/A376G, con 19 neonatos (proporción de 0.460), de los cuales 18 varones fueron hemicigotos mutados y una niña homocigota mutada; la concentración enzimática promedio fue de 1.77 ± 0.41 U/g de Hb (amplitud de 0.8 a 2.2). La segunda combinación más común fue G202A, en ocho casos, siete niños hemicigotos mutados y una niña heterocigota mutada (proporción de 0.195), presentando concentración enzimática promedio de 1.83 ± 0.37 U/g de Hb (amplitud 1.30 a 2.50). La tercera variante fue A376G/T968C, con seis casos, seis niños hemicigotos mutados (proporción de 0.146) y concentración enzimática de 1.10 ± 0.44 U/g de Hb (amplitud de 0.5 a 1.8). Finalmente, la variante

WT se presentó en ocho casos, todos ellos varones (proporción de 0.195) y con concentración enzimática de 1.58 ± 0.87 U/g de Hb (amplitud de 0.2 a 2.6). El orden de frecuencia en las combinaciones alélicas de las 39 madres evaluadas fue para el alelo G202A/A376G, en 16 casos heterocigotos mutados (proporción de 0.440). En 27 neonatos se determinaron las concentraciones de bilirrubinas séricas totales, sin observarse diferencia estadísticamente significativa en relación a la combinación alélica (Tabla 5).

En la evolución neonatal, 27 casos presentaron hiperbilirrubinemia indirecta. La bilirrubina sérica total promedio fue de 11.2 ± 4.1 mg/dl (amplitud de 5.6-21); en 16 casos se requirió del tratamiento con fototerapia (proporción de 0.600). El seguimiento clínico de los casos se mantuvo de los 2 a 30 meses de edad, proporcionando asesoría y educación sobre esta condición.

Tabla 5. Combinaciones alélicas de la deficiencia de G6PD, concentración enzimática y bilirrubinas séricas totales

Combinación alélica	Actividad enzimática (U/g de Hb)*	Casos evaluados	Bilirrubina sérica (mg/dl)†
G202A/A376G (n = 19/0.460)	1.77 ± 0.41 (0.80-2.60)	11	10.58 ± 3.6 (5.70-18.0)
G202A (n = 8/0.195)	1.83 ± 0.37 (1.30-2.50)	7	9.76 ± 5.2 (5.60-21.0)
WT (n = 8/0.195)	1.58 ± 0.87 (0.20-2.60)	4	13.2 ± 3.9 (8.20-18.0)
A376G/T968C (n = 6/0.146)	1.10 ± 0.44 (0.50-1.80)	5	12.79 ± 3.2 (8.40-16.0)
Total (n = 41)	1.65 ± 0.56 (0.20-2.60)	27	11.6 ± 4.1 (5.60-21.0)

Prueba estadística seleccionada por distribución asimétrica (no gaussiana) de los datos.

Valores expresados en media, desviación estándar, rango mínimo y máximo.

*Valor de p = 0.020 obtenido por Kruskal-Wallis.

En el seguimiento pediátrico, en un caso se documentó un solo evento de crisis hemolítica asociada al consumo de habas, pero sin requerir manejo transfusional. Se realizó el estudio materno en todos los casos, todas ellas nacidas en México, al menos en las tres generaciones previas, con excepción de una madre que nació en la República de Cuba y cuenta con antecedentes de abuela materna de origen africano. De las 39 madres y 41 hijos (dos madres con dos hijos reactivos cada una), en nueve casos no se pudo identificar la variante molecular de la G6PD involucrada a pesar de contar con estimaciones de la actividad enzimática disminuida (datos no presentados).

Discusión

Los alelos de origen ancestral africano son predominantes en los resultados observados; los alelos G202A y A376G en conjunto representan la frecuencia alélica predominante (0.896). En nuestro medio se han identificado alrededor de 14 variantes genotípicas^{16,17}. Los datos que presentamos no difieren significativamente de los reportes nacionales, donde se tiene documentado el predominio del origen africano de las variantes alélicas de la G6PD^{10,17}. En el reporte de sujetos mestizo-mexicanos, se observó que la combinación G202A/A376G se presentó en el 45% de los casos evaluados y representó el triple más que los casos con la combinación A376G/T968C¹⁸. Existen diferencias geográficas relacionadas con el predominio de las variantes de G6PD en la población mexicana; la variante B o mediterránea de la G6PD se ha reportado en neonatos originarios del noreste de la República Mexicana, mientras que la variante A-, de origen africano, predomina en la región del golfo de México¹⁰.

La Organización Mundial de la Salud ha propuesto la clasificación de las variantes de la G6PD de acuerdo a las características bioquímicas y clínicas. Las variantes alélicas que se presentan en este estudio pertenecen a la clase II y III con datos clínicos de moderados a severos de ictericia neonatal y favismo¹².

La identificación molecular de las variantes de la G6PD en neonatos se cumplió en cerca del 80% de los casos evaluados, resultados que coinciden con lo señalado por otros autores para nuestro país¹³. El 20% de los casos restantes, donde se tiene disminución en la actividad de la G6PD, puede deberse a que solamente estudiamos cuatro variantes moleculares, por lo que es conveniente aumentar la cantidad de polimorfismos de la deficiencia de la G6PD en la estrategia molecular.

La estrategia combinada de tamizar con una prueba colorimétrica y confirmar con un grupo de variantes moleculares dirigidas hacia la detección de las variantes africanas de G6PD A- (G202A; A376G) y las variantes mediterráneas (C563T) con otras combinaciones más ha sido reportada en la literatura, identificando hasta el 90% de los polimorfismos causantes de la disminución de la G6PD detectada en el TN¹⁹.

Existen diferentes metodologías empleadas en el TN para identificar a los portadores de deficiencia de G6PD, entre las que se encuentran la semicuantificación de la enzima mediante un método colorimétrico, la prueba de fluorescencia, la espectrofotometría de masas en tándem o la identificación molecular confirmatoria de las mutaciones del gen *G6PD*³.

Es importante tomar en cuenta que los neonatos pretérmino pueden generar resultados falsos negativos en la detección semicuantitativa de la G6PD. La heterogeneidad entre los estimados de la prevalencia global de G6PD ha sido evaluada en un metaanálisis de 280 estudios en 88 países⁴. El alto grado de heterogeneidad también depende de la diversidad de la metodología en la medición analítica de la enzima. La magnitud de la variación global, regional o dentro de cada país sobre la prevalencia de la deficiencia de G6PD es importante para la salud pública, particularmente en la planeación de los programas para mejorar la atención y salud neonatal².

La discusión sobre la inclusión de nuevas pruebas en el TN es tema de controversia por su posible impacto en el sistema de salud, los aspectos éticos para el consentimiento bajo información, el repositorio de las muestras obtenidas o la protección contra la discriminación²⁰, al igual que por aspectos particulares como el momento de la toma de la muestra, la condición de nacimiento pretérmino, el efecto de la transfusión o la nutrición parenteral en los resultados del TN²¹.

La detección de la deficiencia de la G6PD no es una prueba obligatoria en el TN en México. Sin embargo, en nuestra institución se incorporó al TN para dar respuesta al estudio de aquellos casos de HBN indirecta y eventualmente enfermedad hemolítica neonatal, cuya etiología no se pudo precisar con los recursos tecnológicos disponibles en ese momento. Así, el paso inicial fue conocer la prevalencia de la deficiencia de la G6PD en la población neonatal, seguido de la estrategia molecular de su estudio y evaluar posteriormente la utilidad clínica de la prueba diagnóstica.

La utilidad clínica de identificar a los neonatos deficientes de la G6PD ayuda a reconocer un factor de

riesgo genético para el desarrollo de hiperbilirrubinemia indirecta en el periodo neonatal²².

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ocasiona episodios súbitos de hemólisis y asociada con otros factores de riesgo puede condicionar un aumento exponencial en las concentraciones séricas de bilirrubinas y producir daño neurológico, por lo que la HBN deberá considerarse como el resultado de complejas interacciones entre genes y medio ambiente. Los programas de tamizaje neonatal, más la atención médica neonatal y la educación a los padres, pueden tener éxito en limitar la severidad de la enfermedad²³.

La deficiencia de G6PD es un factor de riesgo bien conocido para la HBN significativa. En el estudio de neonatos deficientes en G6PD, el 11.1% mostró niveles de bilirrubina sérica total comparados con aquellos sin esta deficiencia. En el caso de los RN que requieren rehospitalización por hiperbilirrubinemia, en el 47% se detectó asociada la deficiencia de G6PD. Nock, et al. concluyeron que es útil el tamizaje neonatal para la G6PD en los RN americanos y de mayor utilidad en las poblaciones de mayor riesgo para hiperbilirrubinemia severa, como las poblaciones afroamericanas y asiáticas²⁴.

En conclusión, la estrategia en la detección de sujetos con deficiencia de la G6PD mediante una prueba colorimétrica y confirmada mediante un método molecular de PCR-TR permite identificar cerca del 80% de los sujetos deficientes. Es necesario realizar la validación externa de estos resultados mediante estudios multicéntricos colaborativos.

Bibliografía

1. Andermann A, Blancquaert I, Beauchamp S, Dery V. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ.* 2008;86(4):317-9.
2. American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system--executive summary. *Pediatrics.* 2006;117(5 Pt 2):S296-307.
3. Wang FL, Boo NY, Ainoon O, Wong MK. Comparison of detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency using fluorescent spot test, enzyme assay and molecular method for prediction of severe neonatal hyperbilirubinaemia. *Singapore Med J.* 2009;50(1):62-7.
4. 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.
5. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood.* 2008;111(1):16-24.
6. Medina MD, Vaca G, López-Guido B, Westwood B, Beutler E. Molecular genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexico. *Blood Cells Mol Dis.* 1997;23(1):88-94.
7. Lisker R, Loria A, Cordova MS. Studies on Several Genetic Hematological Traits of the Mexican Population. 8. Hemoglobin S, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, and Other Characteristics in a Malarial Region. *Am J Hum Genet.* 1965;17:179-87.
8. Nock ML, Johnson EM, Krugman RR, et al. Implementation and analysis of a pilot in-hospital newborn screening program for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the United States. *J Perinatol.* 2011;31(2):112-7.
9. Vaca G, Ibarra B, Hernández A, et al. Screening for inborn errors of the erythrocyte metabolism in Northwestern Mexico. *Acta Anthropogenet.* 1982;6(4):255-64.
10. González-Quiroga G, Ramírez-Del Río JL, Cerda-Flores RM, Garza-Chapa R. Frequency and origin of G-6-PD deficiency among icteric newborns in the metropolitan area of Monterrey, Nuevo Leon, Mexico. *Gene Geogr.* 1994;8(3):157-64.
11. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, et al. Strengthening the REporting of Genetic Association studies (STREGA)--an extension of the STROBE statement. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(4):247-66.
12. WHO-Working-Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. *Bull World Health Organ.* 1989;67(6):601-11.
13. Vaca G, Arambula E, Esparza A. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexico: overall results of a 7-year project. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;28(3):436-44.
14. Cobian JG, Sánchez-López JY, Magana MT, Chavez ML, Perea FJ, Ibarra B. Types and frequencies of hemoglobin disorders in the pacific coast of four states of Mexico. *Rev Invest Clin.* 2009;61(5):399-404.
15. Zhang DT, Hu LH, Yang YZ. Detection of three common G6PD gene mutations in Chinese individuals by probe melting curves. *Clin Biochem.* 2005;38(4):390-4.
16. Beutler E, Kuhl W, Ramírez E, Lisker R. Some Mexican glucose-6-phosphate dehydrogenase variants revisited. *Hum Genet.* 1991;86(4):371-4.
17. Vaca G, Arambula E, Monsalvo A, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) mutations in Mexico: four new G-6-PD variants. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;31(1):112-20.
18. Arambula E, Aguilar LJ, Vaca G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in Mexican Mestizos. *Blood Cells Mol Dis.* 2000;26(4):387-94.
19. Lin Z, Fontaine JM, Freer DE, Naylor EW. Alternative DNA-based newborn screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2005;86(1-2):212-9.
20. Simopoulos AP. Genetic screening: programs, principles, and research--thirty years later. Reviewing the recommendations of the Committee for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SIEM). *Public Health Genomics.* 2009;12(2):105-11.
21. Kaye CI, Accurso F, La Franchi S, et al. Newborn screening fact sheets. *Pediatrics.* 2006;118(3):e934-63.
22. Watchko JF. Identification of neonates at risk for hazardous hyperbilirubinemia: emerging clinical insights. *Pediatr Clin North Am.* 2009;56(3):671-87.
23. Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and severe neonatal hyperbilirubinemia: a complexity of interactions between genes and environment. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(3):148-56.
24. Nock ML, Johnson EM, Krugman RR, et al. Implementation and analysis of a pilot in-hospital newborn screening program for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the United States. *J Perinatol.* 2011;31(2):112-7.