

Análisis de los microsatélites ac y ctt del gen g6pd en muestras de individuos g6pd deficientes del noroeste de México

Noemí García, Fred Luque, Veronica Picos, Enrique Romo y Eliakym Arámbula

N. García, F. Luque, V. Picos, E. Romo y E. Arámbula

Universidad Politecnica De Sinaloa, Ingeniería en Biotecnología, Carretera Municipal Libre Mazatlán Higuera Km 3, 82199 Mazatlan, Sinaloa, México.

Universidad Autonoma de Sinaloa, Culiacan, Sinaloa, México, Laboratorio de Genética y Biología Molecular Ciudad Universitaria SN, Ciudad Universitaria, 80040 Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

ngarcia@upsin.edu.mx

M. Ramos., V.Aguilera., (eds.).Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

Abstract

Deficiency of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is the most common enzymopathy. It is estimated to affect over 330 million people worldwide, more frequently observed in Africa, Europe, Southeast Asia and Latin America. Epidemiologic Studies in Mexico estimate a prevalence of 0.95%. The most common variants that cause deficiency include G6PD A-202A/376G, G6PD A-376G/968C and G6PD-376G/542T. We have also identified five new variants (G6PD San Luis Potosí376T, G6PD Zacatecas770T, G6PD Veracruz1094A, G6PD Yucatán1285G and G6PD Mexico DF193G). Studies in this gene have identified three highly polymorphic microsatellite repeats (CA), (AT) and (CTT) which are in linkage disequilibrium. Microsatellites are widely used as molecular markers in genetic studies because they are codominates, multiallelic and highly reproducible. The aim of this study was to identify and CTT AC microsatellites in individuals positive for G6PD deficiency originating from the north-northwest of Mexico region. Samples were included in this study correspond to a total of 27 DNA samples from individuals deficient DNA samples and 50 randomly selected individuals with negative screening. Were amplified by PCR and CTT AC G6PD gene microsatellite were separated by size using polyacrylamide gels at 10%, the results were examined using the Arlequin v3.5 software, showing variations in G6PD deficient individuals G6PD A-202A / 376G, G6PD A-376G/968C and G6PD Santamaría376G/542T relate to the most common variants of Sub-Saharan Africa. The new variant G6PD Mexico DF193A> G was not observed in any other region so you can think you have a different origin.

7 Introducción

La deficiencia de glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G6PD) es la enzimopatía eritrocitaria más común de todos los defectos enzimáticos heredables y clínicamente significativos (Mason, Bautista, & Gilsanz, 2007). Se correlaciona geográficamente con áreas habitadas por poblaciones históricamente expuestas a la malaria incluyendo: África, Europa, Asia Sur-Oriental y América Latina. Se estima que afecta a más de 330 millones de personas en el mundo (Nkhoma, Poole, Vannappagari, Hall, & Beutler, 2009).

La G6PD es una enzima citoplásmica que cataliza la primera reacción de la vía pentosa fosfato; esta reacción provee poder reductor a la célula en forma de NADPH (Celik, Gunbey, Unal, Gumruk, & Yurdakok, 2013). En el eritrocito la principal función del NADPH consiste en mantener los niveles adecuados de glutatión en estado reducido (GSH), además de que es un componente estructural de la enzima catalasa. A su vez, el GSH y la catalasa participan en la detoxificación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Así pues, la defensa de las células contra el H_2O_2 depende de la enzima G6PD principalmente en los eritrocitos (Cappellini & Fiorelli, 2008).

Por lo tanto, una deficiencia en la enzima puede ocasionar manifestaciones como: Anemia Hemolítica No Esferocítica Crónica (AHNEC) y anemia hemolítica aguda (AHA) inducida por drogas. La consecuencia clínica más severa es la hiperbilirrubinemia neonatal la que puede conducir a kernicterus (infiltración de bilirrubina al cerebro) o aún a la muerte (de Gurrola et al., 2008).

En México, varios estudios epidemiológicos de nuestro grupo de investigación permitieron definir la frecuencia de la deficiencia de G6PD en mestizos de los estados de Nayarit (1.26%), Veracruz (1.17%), Guerrero (1.03%), Yucatán (0.80%), Sinaloa (0.78%), San Luis Potosí (0.59%), Coahuila- Durango (0.52%), Tamaulipas (0.52%), Colima (0%); para la zona nor-noroeste de México; Baja California (0.45%), Baja California Sur (0.42%), Sonora (0.51%), y Chihuahua (2.4%), así como en varios grupos indígenas (0.57%) (Vaca, Arambula, & Esparza, 2002).

El genoma humano contiene una gran cantidad de repeticiones no codificantes. Los microsatélites conocidos como Repeticiones de Secuencia Simple (SRR) o Repeticiones Cortas en Tándem (STR), se pueden clasificar en dos formas: a) estructural según los tipos de secuencia de repeticiones en perfectos, imperfectos e interrumpidos ó compuestos y en b) raros ó comunes (Oliveira, Pádua, Zucchi, Vencovsky, & Vieira, 2006). Los SRR son pequeñas secuencias de ADN cuyo tamaño va desde uno hasta seis pares de bases que se repite de manera consecutiva, compensando el 3% del genoma humano, la variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos permitiendo el análisis de éstas secuencias o la determinación de la longitud de las mismas generando datos de polimorfismos, los cuales son muy populares ya que proporcionan ideas sobre demografía de la población, sus estructuras genéticas y ayudan a la comprensión de las causas de la diversidad intraespecífica (Subramanian, Mishra, & Singh, 2003).

Para reconstruir la historia de la evolución de las mutaciones en el gen G6PD, se han estudiado tres repeticiones de microsatélites altamente polimórficos siendo estos AT, AC y CTT con 10, 26, y 8 alelos que van desde 164 hasta 188 pb, 125 a 179 pb y de 195 a 216 pb respectivamente en la región 19 kb río abajo del gen G6PD (Tishkoff et al., 2001; Vaca, 2007). Los microsatélites se encuentran en desequilibrio de ligamiento con varias mutaciones en secuencias codificantes y polimorfismos silenciosos, por estos motivos son particularmente útiles para estimar la edad de los alelos.

Aunque se ha demostrado que la mayoría de las mutaciones causantes de la deficiencia tienen un origen recurrente, es necesario realizar análisis en otras regiones del gen que se encuentran en desequilibrio de ligamiento.

7.1 Materiales y métodos

Materiales

Se utilizó ADN de individuos provenientes del Nor- noroeste de México clasificándolo en tres grupos.

Grupos A. Individuos provenientes de los estados de Chihuahua, Sonora, Baja California Norte y Sur con deficiencia enzimática de G6P y previa identificación de la variante de G6PD y sus haplotipos correspondientes.

Grupo B. Muestras de individuos deficientes de G6PD provenientes de la ciudad de México remitidos al laboratorio de Genética y Biología Molecular de la FCQB.

Métodos

Se amplificaron las secuencias relevantes para el análisis de microsatélites AC y CTT del gen G6PD mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, "Polymerase Chain Reaction"), se utilizaron las secuencias de iniciadores de un estudio previamente realizado para el análisis de dichos microsatélites (Tishkoff et al., 2001).

Para ver la amplificación del producto, se corrieron en geles de agarosa a 2.0% (anexo 11.6.2) con GelRED al 0.15X, para hacer visible los amplicones, 5 µl del producto de reacción y 2 µl de marcador de peso molecular de 100pb, a 100 volts por 1 hora con buffer TBE 1X. Finalmente se visualizaron en un transiluminador a la máxima intensidad y se tomó una imagen con una cámara fotográfica.

7.2 Resultados y discusión

Se analizaron un total de 77 muestras de ADN, 27 muestras pertenecientes a individuos deficientes de G6PD y 50 muestras utilizadas como controles de las cuales se verificó su integridad observándose un producto íntegro representado por una sola banda compacta en la parte superior del gel. Mediante condiciones específicas, se amplificaron por PCR los microsatélites AC y CTT. Para el microsatélite AC en muestras deficientes de G6PD se encontraron 3 alelos diferentes: AC-166 pb, AC-168 pb y AC-170 pb, en controles se identificaron 4 alelos distintos: AC-166 pb, AC-168 pb, AC-170 pb, AC-162 pb .

Para el microsatélite CTT en individuos deficientes de G6PD se encontraron 3 alelos diferentes: CTT-195 pb, CTT-204 pb, CTT-210 pb, en controles se identificaron 2 alelos CTT-201 pb, CTT-204 pb.

El alelo más frecuente para el microsatélite AC fue AC-166 y el alelo para la nueva variante G6PD A193A>G AC-170 se observó también en muestras de controles, para el microsatélite CTT el alelo más frecuente en deficientes fue CTT-195 pb y en los controles CTT- 201 pb.

En las variantes deficientes se identificaron 6 haplotipos diferentes (cuadro 1) donde se incluyeron los microsatélites AC/CTT y los polimorfismos silenciosos Pvu-II, Pst-I, Bcl-I, Nla-III para su análisis.

Para la variante deficiente G6PD A-202A/376G se detectaron dos haplotipos diferentes asociados con los polimorfismos silenciosos y los microsatélites AC/CTT +/+/-/+ 166 pb/195 pb y +/+/-/+ 168 pb/195 pb, para G6PD Santamaría376G/542T se detectó un haplotipo de -/+/-/+ 166 pb/204 pb, las tres variantes concuerdan con los resultados encontrados en el sur del país de México realizado por Vaca en el 2007 (Vaca, 2007).

En las tres muestras con mutación desconocida se logró identificar el haplotipo -/-/+/- 168 pb/195 pb y la nueva variante G6PD A193A>G presentó el haplotipo +/++/+ 170 pb/210 pb haplotipo no observado en ninguna otra región, lo contrario a los microsatélites de la variantes deficientes G6PD A-202A/376G, G6PD Santamaría376G/542T, G6PD A-376G/968C registrados en África Sub-Sahariana.

Tabla 7 Haplotipos de muestras deficientes de G6PD

Haplotipo	Frecuencia	Total	E-4	E-5	E-6	E-9	E-4	I-5	E-10	E-11	I-11	Microsatélite pb	
			202 A	376 G	542T	968 C	193 A	611 G	1116 G	1311 T	93C	AC	CTT
			NlaII	FokI	BspE	NciI	*	PvuI	PstI	BclI	NlaII		
0			I		I			I			I		
1	0.74	20	+	+	-	-	-	+	+	-	+	166	195
2	0.04	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	168	195
3	0.04	1	-	+	+	-	-	-	+	-	+	166	204
4	0.11	3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	168	195
5	0.04	1	-	+	-	+	-	-	+	-	+	166	204
6	0.04	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	170	210
		Total =											
		27											

E: exón; *: no se utilizó enzima; 1 y 2: variante G6PD A202A/376G; 3: G6PD A376G/542T; 4: variante sin identificar; 5: G6PD A-376G/968C; 6: G6PD193>G

En los controles encontramos 7 haplotipos diferentes (cuadro 2), seis de los cuales son positivos para Pst-I (-/+/-/-), los diferentes haplotipos varían en el tamaño de sus microsatélites AC/CTT, con las combinaciones 166 pb/201 pb, 168 pb/201 pb, 168 pb/204 pb, 170 pb/201 pb, 166 pb/204 pb y 162 pb/201 pb. El último haplotipo presentó la distribución +/-/-/- 162/204 pb. La variabilidad en los haplotipos era la esperada, debido a la heterogeneidad genética en los individuos de nuestra población de estudio, los alelos concuerdan con los reportados por Vaca en el 2007. En dos muestras G6PD B encontramos el alelo AC-170 pb como en la nueva variante G6PD A193A>G.

Tabla 7.1 Cuadro Haplotipos de controles

Haplotipo	Frecuencia	Total	E-4	E-5	E-6	E-9	E-4	I-5	E-10	E-11	I-11	Microsatélite pb	
			202 A NlaII	376 G FokI	542T BspE	968 C NciI	19 3	611 G PvuI	1116 G PstI	1311 T BclI	93C NlaII	AC	CTT
1	0.60	30	-	-	-	-	-	-	+	-	-	166	201
2	0.20	10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	168	201
3	0.08	4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	168	204
4	0.04	2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	170	201
5	0.02	1	-	-	-	-	-	+	+	-	-	162	204
6	0.04	2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	166	204
7	0.02	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	162	201
		Total =											
		50											

E: exón; *: no se utilizó enzima; 1-7: G6PD B

7.3 Conclusiones

Los microsatélites AC y CTT del gen G6PD en muestras de individuos G6PD deficientes del Nor-Noroeste de México y las variantes G6PD A-202A/376G, G6PD A376G/542T y G6PD A-376G/968C, se relacionan con los microsatélites de las variantes más comunes del África Sub-Saharan.

La nueva variante G6PD A193A>G generó un alelo AC/CTT 170/210 pb no observado en ninguna otra región, lo que apoya el origen de la nueva variante en México. Los resultados apoyan la hipótesis de que las variantes deficientes de G6PD A-202A/376G, G6PD A376G/542T y G6PD A-376G/968C muy probablemente se originaron a partir de la G6PD A376G con los haplotipos compuestos +/-/-/+ AC-166, CTT-201 pb, +/-/-/+ AC-166, CTT-204 pb respectivamente, sugiriendo un origen único para cada variante.

7.4 Agradecimientos

El trabajo fue apoyado por PROFAPI- UAS .

7.5 Referencias

- Cappellini, M. D., & Fiorelli, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 371(9606), 64-74. doi: 10.1016/s0140-6736(08)60073-2
- Celik, H. T., Gunbey, C., Unal, S., Gumruk, F., & Yurdakok, M. (2013). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in neonatal hyperbilirubinaemia: Hacettepe experience. *J Paediatr Child Health*, 49(5), 399-402. doi: 10.1111/jpc.12193
- de Gurrola, G. C., Arauz, J. J., Duran, E., Aguilar-Medina, M., Ramos-Payan, R., Garcia-Magallanes, N., . . . Meraz, E. A. (2008). Kernicterus by glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep*, 2, 146. doi: 10.1186/1752-1947-2-146
- Mason, P. J., Bautista, J. M., & Gilsanz, F. (2007). G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev*, 21(5), 267-283. doi: 10.1016/j.blre.2007.05.002
- Nkhoma, E. T., Poole, C., Vannappagari, V., Hall, S. A., & Beutler, E. (2009). The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis*, 42(3), 267-278. doi: 10.1016/j.bcmd.2008.12.005
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., & Vieira, M. L. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294-307.
- Subramanian, S., Mishra, R. K., & Singh, L. (2003). Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol*, 4(2), R13.
- Tishkoff, S. A., Varkonyi, R., Cahinhinan, N., Abbes, S., Argyropoulos, G., Destro-Bisol, G., . . . Clark, A. G. (2001). Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science*, 293(5529), 455-462. doi: 10.1126/science.1061573
- Vaca, G. (2007). G6PD (AC)_n and (CTT)_n microsatellites in Mexican Mestizos with common G6PD African variants. *Blood Cells Mol Dis*, 38(3), 238-241. doi: 10.1016/j.bcmd.2006.11.005
- Vaca, G., Arambula, E., & Esparza, A. (2002). Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexico: overall results of a 7-year project. *Blood Cells Mol Dis*, 28(3), 436-444.