

Relación entre genotipo y fenotipo en el déficit de piruvato quinasa: dependencia transfusional basal y respuesta a la esplenectomía

Genotype-phenotype relationship in pyruvate kinase deficiency: baseline transfusion dependency and splenectomy response

Jorge Martínez Nieto¹, Marta Molina-Pérez¹, Eduardo José Salido Fierrez², David Beneitez-Pastor³, María de la O Abío⁴, Inés Hernández Rodríguez⁵, Salvador Payant-Pernía⁶, Inmaculada Pérez de Soto⁶, Rafael del Orbe Barreto⁷, Julián Sevilla⁸, Anna Ruiz Llobet⁹, María Ordóñez García¹⁰, Fernando Ataúlfo González Fernández¹¹, Ana Sánchez Quintana¹², Héctor González Méndez¹³, Mónica López Duarte¹⁴, María del Carmen Mendoza Sánchez¹⁵, Leonor Senent¹⁶, Silvia de la Iglesia¹⁷, Sandra Gómez Rojas¹⁸, María Tenorio¹⁹, Miguel Gómez Álvarez¹¹, Paloma Ropero¹, Celina Benavente¹¹, Ana Villegas¹¹ y Marta Morado Arias²⁰

¹Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid; ²Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), Murcia; ³Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona; ⁴Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario de Toledo, Toledo; ⁵Servicio de Hematología, Institut Català d'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona; ⁶Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Sevilla; ⁷Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario de Cruces, Baracaldo, Vizcaya; ⁸Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid; ⁹Servicio de Oncología y Hematología, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona; ¹⁰Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario de Móstoles, Madrid; ¹¹Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid; ¹²Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Nuestra Señora de la Candelaria, Santa Cruz de Tenerife; ¹³Servicio de Hematología Pediátrica, Hospital Nuestra Señora de la Candelaria, Santa Cruz de Tenerife; ¹⁴Servicio de Hematología Pediátrica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander; ¹⁵Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca; ¹⁶Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia; ¹⁷Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Las Palmas; ¹⁸Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid; ¹⁹Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid; ²⁰Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

Resumen

Introducción: El déficit de piruvato quinasa es una anemia congénita tratada principalmente con soporte transfusional y esplenectomía. Clásicamente, la relación genotipo-requerimientos transfusionales se ha estudiado considerando si las mutaciones determinan o no un cambio de aminoácido, obviando otros mecanismos moleculares relevantes. **Objetivo:** Reclasificar las mutaciones según su gravedad y estudiar la asociación de genotipos frente a la dependencia transfusional (DT) basal y su evolución tras la esplenectomía. **Método:** Se ha analizado una cohorte de 58 pacientes con déficit de piruvato quinasa. Sus mutaciones se han clasificado en graves (G), intermedias (I) o leves (L), de acuerdo con estudios previos y el resultado de análisis bioinformáticos. **Resultados:** Para la DT basal existen diferencias significativas entre los pacientes sin mutación leve (genotipos I/I, G/I y G/G; 94% de DT) frente al grupo con al menos una mutación leve (genotipos L/L, L/I y L/G; 36% de DT) ($p = 0,000$). La DT en esplenectomizados no se resuelve en el 67% de los pacientes con genotipos G/G y G/I, mientras que para el resto de los genotipos esto ocurre en el 17,6% de los casos ($p = 0,025$). **Conclusiones:** Nuestra clasificación permite establecer asociaciones significativas genotipo-fenotipo. Estos hallazgos pueden ser útiles para valorar otros tratamientos en pacientes con DT basal.

Palabras clave: Anemia hemolítica congénita. Esplenectomía. Piruvato quinasa. Transfusión sanguínea. Genotipo.

*Correspondencia:

Jorge Martínez Nieto
E-mail: jorgemartinezniето@gmail.com

Fecha de recepción: 07-03-2023

Fecha de aceptación: 15-03-2023

DOI: 10.24875/SANGRE.23000005

Disponible en internet: 13-07-2023

Sangre. 2023;42(1):30-38

www.revistasangre.com

0036-4355 / © 2023 Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Publicado por Permanyer. Éste es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abstract

Introduction: Pyruvate kinase deficiency is a congenital anemia treated mainly with transfusion support and splenectomy. Classically, the genotype-transfusion requirement relationship has been studied by considering whether mutations do or do not determine an amino acid change, ignoring other relevant molecular mechanisms. **Objective:** To reclassify mutations according to severity and to study the association of genotypes with transfusion dependence (TD) at baseline and after splenectomy. **Method:** We analyzed a cohort of 58 patients with pyruvate kinase deficiency. Their mutations have been classified as severe (G), intermediate (I), or mild (L), based on previous studies and the results of bioinformatic analyses. **Results:** For baseline TD, there are significant differences between patients without mild mutations (genotypes I/I, G/I, and G/G; 94% TD) compared to the group with at least one mild mutation (genotypes L/L, L/I, and L/G; 36% TD) ($p = 0.000$). In splenectomized patients, TD is not resolved after the procedure in 67% of patients with genotypes G/G and G/I, which only occurs in 17.6% of other patients ($p = 0.025$). **Conclusions:** Our classification allows for significant genotype-phenotype associations to be established. These findings may be useful in evaluating other treatments in patients with baseline transfusion dependence.

Keywords: Congenital hemolytic anemia. Splenectomy. Pyruvate kinase. Blood transfusion. Genotype.

Introducción

El déficit de piruvato quinasa es una enfermedad autosómica recesiva que produce anemia hemolítica con manifestaciones clínicas muy variables. Los pacientes pueden mostrar desde hemólisis compensada hasta dependencia transfusional (DT). Además, la hemólisis puede agravarse por infecciones agudas, situaciones de estrés o durante el embarazo. La esplenomegalia, la ictericia, la coleditiasis y la sobrecarga férrica también son comunes en estos pacientes. El tratamiento se basa principalmente en soporte transfusional y esplenectomía, siendo necesaria la vigilancia y el manejo de la sobrecarga férrica en todos los pacientes, trasfundidos o no¹. No obstante, uno de cada cinco pacientes esplenectomizados sigue en DT tras el procedimiento^{2,3}. En la actualidad, el trasplante de progenitores hematopoyéticos es la única opción curativa que existe para la enfermedad, aunque ya se han realizado ensayos clínicos de terapia génica para el déficit de piruvato quinasa. Por último, recientemente se ha aprobado el uso de un activador de la enzima piruvato quinasa, mitapivat, que aumenta los niveles de hemoglobina basales o disminuye los requerimientos transfusionales en algunos pacientes adultos^{4,5}.

El gen de la piruvato quinasa (PKLR) codifica las dos isoformas de la enzima (la hepática y la eritrocitaria) gracias al uso de promotores alternativos específicos de cada tejido. El promotor eritrocitario da lugar a una proteína de 574 aminoácidos, que se agrupan en tetrámeros formando la forma funcional de la enzima. La piruvato quinasa cataliza la reacción de fosfoenolpiruvato (sustrato de la reacción) a piruvato, produciendo además trifosfato de adenosina que es necesario para

el equilibrio catiónico del eritrocito, para mantener la estructura de la membrana celular y, en general, para que el hematíe sea viable. Para que la piruvato quinasa funcione correctamente necesita un activador alostérico (fructosa bifosfato) y cationes K^+ o Mn^{2+} . Los aminoácidos de la enzima que son clave para la unión de dichas moléculas (sustrato, cofactor, cationes, etc.) se conocen gracias a estudios de cristalografía realizados sobre la piruvato quinasa eritrocitaria⁶. Como veremos más adelante, estos aminoácidos son importantes en la metodología utilizada en nuestra investigación.

Históricamente, la relación entre genotipo y fenotipo en el déficit de piruvato quinasa se ha estudiado de distintas formas. El efecto de algunas mutaciones concretas se ha podido establecer a partir de pacientes que presentan una mutación en homocigosis, ya sea en casos clínicos o en cohortes pequeñas^{2,7,8}. Algunas mutaciones se asocian de manera sistemática a fenotipos leves, y otras a fenotipos graves. Con los estudios *in vitro* de proteínas mutantes fue posible entender los mecanismos que producen el déficit enzimático en ciertos casos, en general con las mutaciones más frecuentes^{9,10}. Por ejemplo, la mutación R510Q provoca que el tetrámero sea inestable, lo que reduce sustancialmente la actividad enzimática¹¹.

En otras ocasiones es más sencillo conocer el mecanismo y la magnitud del déficit enzimático que va a producir una mutación. Esto ocurre sobre todo cuando la mutación determina un codón de parada prematuro de la traducción o si el cambio de nucleótido afecta a las secuencias consenso del procesamiento de los intrones (*splicing*), de forma que la síntesis de la enzima se reduce sustancialmente. En definitiva, conocemos el efecto de varias mutaciones y si se asocian

a fenotipos leves o graves. Sin embargo, en el déficit de piruvato quinasa hay descritas cerca de 300 mutaciones¹² y la mayoría de los pacientes son heterocigotos compuestos por dos mutaciones distintas. El número de posibles combinaciones es muy alto. Esto, unido a la rareza de la enfermedad, con pocos pacientes disponibles para aportar evidencia estadística, dificulta enormemente saber cómo va a ser el comportamiento clínico a partir de las mutaciones en la mayoría de los pacientes.

En el estudio de la historia natural del déficit de piruvato quinasa se ha analizado de forma más amplia la relación genotipo-fenotipo de esta enfermedad^{2,3}. Para simplificar el número posible de genotipos, cada mutación se clasifica según si produce o no un cambio de aminoácido. Las que producen un cambio de aminoácido en la enzima se denominan *missense* (M), y el resto de las mutaciones se clasifican como *no-missense* (NM). De esta forma pueden existir tres genotipos o combinaciones distintas de mutaciones en los pacientes: M/M si el paciente tiene dos mutaciones *missense*, M/NM cuando presenta una mutación de cada tipo, y NM/NM si las dos alteraciones son del tipo *no-missense*. En cohorte de 195 pacientes de dicho estudio internacional³ se encontró que los pacientes NM/NM tienen un fenotipo más grave que aquellos con los otros genotipos. Los pacientes NM/NM tienen niveles menores de hemoglobina tras la esplenectomía, hay un mayor porcentaje de pacientes con sobrecarga férrica y un mayor porcentaje de esplenectomizados, y el número de transfusiones a lo largo de la vida es mayor en este grupo que en el resto. El grupo NM/NM también presenta con más frecuencia otras complicaciones, como hipertensión pulmonar y hematopoyesis extramedular. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ningún parámetro entre los grupos M/M y M/NM, que suponen el 85% de los pacientes con esta enfermedad. También hay que destacar que en el estudio de historia natural no se exploró la relación entre genotipos y la DT basal de los pacientes. Tampoco se comunicaron resultados en cuanto a si el genotipo del paciente se asocia con la resolución de la DT tras la esplenectomía.

Con la clasificación basada en si hay o no cambio de aminoácido se pierde información sobre el impacto de las mutaciones. Por ejemplo, algunas mutaciones M pueden dar lugar a que la enzima sea incapaz de activarse o a que sea inestable^{6,11}. Por otro lado, algunas de las mutaciones NM pueden tener un efecto leve sobre la transcripción o la expresión de la proteína^{13,14}.

Para resolver este problema, aquí planteamos una nueva forma de clasificar las mutaciones causantes de déficit de piruvato quinasa de acuerdo con su gravedad. Posteriormente utilizaremos esta clasificación para buscar posibles asociaciones entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes de una cohorte multicéntrica española. Esta clasificación está basada tanto en las publicaciones previas como en predicciones realizadas con herramientas bioinformáticas. En teoría, esto generaría información de la relación genotipo-fenotipo que fuera aplicable a una mayor proporción de pacientes con esta enfermedad.

Método

Para este trabajo hemos recopilado datos clínicos y genéticos de 58 pacientes, de 20 hospitales distintos, con diagnóstico clínico y molecular de déficit de piruvato quinasa. Las variables recogidas en todos los pacientes son edad, sexo, mutaciones en el gen PKLR (anotadas según la versión Hg19 del genoma humano), genotipo (según el efecto que tienen las mutaciones), DT basal (≥ 6 transfusiones al año), esplenectomía, DT tras la esplenectomía (≥ 6 transfusiones al año) y sobrecarga férrica (según el laboratorio de referencia de cada centro). En los pacientes que nunca han tenido DT hemos recopilado sus valores basales de hemoglobina, mientras que en los pacientes esplenectomizados disponemos de sus valores de hemoglobina actuales.

El genotipo de los pacientes lo hemos anotado de dos formas distintas para analizar su relación con la DT basal y tras la esplenectomía. La primera clasificación, la clásica para esta enfermedad, divide las mutaciones en M y NM, dando lugar a tres posibles genotipos: M/M, M/NM y NM/NM. La segunda clasificación que proponemos se basa en analizar el efecto de la mutación más allá de ver si se produce un cambio de aminoácido o no, dividiendo las mutaciones en graves (G), intermedias (I) y leves (L). Los criterios para clasificar las mutaciones en estas categorías se muestran en la [tabla 1](#). En general, consideramos como graves aquellas mutaciones que anulan la producción de la piruvato quinasa, agrupamos en mutaciones intermedias las que afectan a sitios importantes de la enzima y las mutaciones exónicas en las que se predice un defecto del *splicing*, y por último clasificamos como leves las mutaciones NM intrónicas y las mutaciones M que no cumplen criterios para las dos categorías previas. Respecto a la predicción de alteraciones del *splicing* en las mutaciones exónicas, realizamos varios estudios *in silico* mediante tres programas distintos: Human Splice Finder¹⁵, MutationTaster¹⁶

Tabla 1. Criterios para la nueva clasificación de las mutaciones según su gravedad estimada

Clasificación	Criterios*	Metodología	Ref.
Grave	Codón stop prematuro, alteración del codón de iniciación o del codón stop y pequeñas inserciones/deleciones que alteren el marco de lectura de la traducción	Se deduce a partir de la secuencia	-
	Cambios en las secuencias consenso de <i>splicing</i> (nucleótidos ± 1 o ± 2 de las secuencias donadoras/aceptoras)	Se deduce a partir de la secuencia	-
	Grandes deleciones que afecten a uno o varios exones	Se deduce a partir de la secuencia	-
Intermedia	Variantes exónicas que afectan al <i>splicing</i>	Predicción <i>in silico</i> [†]	15-17
	Niveles de antígeno PKLR reducidos en variantes M en homocigosis o en TRANS a una variante NM	Revisión bibliográfica	10,18
	Proteína termoinestable; aminoácidos afectados: 332, 364, 510 o 532	Revisión bibliográfica	7,11
	Unión alterada del sustrato (fosfoenolpiruvato, PEP); aminoácidos: 116, 315, 338, 339 o 371	Revisión bibliográfica	6,9
	Unión alterada del activador alostérico (fructosa bifosfato, FBP); aminoácidos: 532, 475-477, 480 o 557-566	Revisión bibliográfica	6,9
	Unión alterada del K ⁺ o del Mn ²⁺ a la enzima; aminoácidos: 118, 120, 156, 157, 315 o 339	Revisión bibliográfica	6,9
	Alteración de puentes de hidrógeno o salinos necesarios para la activación; aminoácidos: 281, 337, 389 o 390	Revisión bibliográfica	6,7
	Variantes del promotor del gen PKLR	Se deduce a partir de la secuencia	-
	Pequeñas deleciones/inserciones que no afecten al marco de lectura	Se deduce a partir de la secuencia	-
Leve	Mutaciones M que no cumplan criterios para ser incluidas en la categoría intermedia	Se deduce a partir de la secuencia	-
	Variantes intrónicas que no afectan a las secuencias consenso de <i>splicing</i>	Se deduce a partir de la secuencia	-
	Variantes de las regiones que se transcriben, pero que no se traducen (UTR)	Se deduce a partir de la secuencia	-

*Aplicados en variantes clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas según el American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)¹⁹.

[†]Por al menos dos de los tres programas utilizados (ver Método).

y Trap¹⁷. Consideramos que el *splicing* está alterado en una variante exónica cuando se predice, por al menos dos de los tres programas, que se pierde o se genera una nueva secuencia aceptora/donadora del *splicing*. Para valorar el efecto del *splicing* no tuvimos en cuenta otras posibles alteraciones menores, como la formación de nuevas secuencias potenciadoras del *splicing*.

Tras clasificar los genotipos según los criterios anteriores procedimos a realizar los estudios estadísticos para comprobar si había una asociación significativa entre los distintos genotipos y fenotipos. En todos los análisis se consideró significativa una $p < 0,05$. Para los estudios de genotipos frente a DT basal y tras la esplenectomía realizamos la prueba de ji al cuadrado. Para los estudios de genotipos frente a niveles de hemoglobina basales y posesplenectomía realizamos la prueba de ANOVA de un factor.

Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética para el análisis y la publicación de datos clínicos.

Resultados

Descripción de las características genéticas de la cohorte

Los 58 pacientes de esta cohorte presentan mutaciones en ambas copias del gen PKLR y en total hemos encontrado 50 variantes genéticas distintas en esos 116 genes estudiados. Solo hay cinco casos con mutación en homocigosis (dos con R486W, dos con R510Q y uno homocigoto para R385K) y el resto de los casos son heterocigotos compuestos para distintas mutaciones. Con diferencia, la mutación más frecuente en nuestro medio es la variante *missense* R486W ($n = 23$), mientras que la variante

no-missense más frecuente ($n = 10$) produce un codón de parada prematuro en la posición 241 (E241X).

En la **tabla 2** se muestran las características genéticas y clínicas de esta cohorte en comparación con los datos publicados en el registro de historia natural de la piruvato quinasa. En nuestra cohorte predominan los alelos *missense*, de tal forma que el 96% de los pacientes tienen al menos una de estas mutaciones. El 50% de los pacientes tienen genotipo M/NM, un 46% tienen genotipo M/M y tan solo dos pacientes tienen genotipo NM/NM.

Nueva clasificación de las mutaciones

Tras aplicar los criterios antes explicados para clasificar las mutaciones según su gravedad, las mutaciones de los 116 genes estudiados se han clasificado en leves ($n = 46$), intermedias ($n = 43$) y graves ($n = 27$). Al existir tres tipos de mutaciones con esta clasificación, se pueden combinar en seis posibles genotipos: L/L, L/I, L/G, I/I, I/G y G/G.

En la **tabla 3** se muestran las características clínicas de los pacientes según su genotipo clásico y según la nueva clasificación. Tras clasificar a los pacientes por estos dos métodos, realizamos los estudios estadísticos para establecer posibles relaciones entre el genotipo y el fenotipo.

Dependencia transfusional basal

DEPENDENCIA TRANSFUSIONAL BASAL SEGÚN LA CLASIFICACIÓN CLÁSICA

El 41% de los pacientes M/M requerían transfusiones, y este porcentaje aumenta hasta el 55% en los pacientes M/NM, pero no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p = 0,208$). Tampoco se han encontrado diferencias significativas entre el grupo NM/NM y el resto de los genotipos agrupados ($p = 0,115$), aunque esto podría deberse al escaso número de pacientes NM/NM en nuestra cohorte ($n = 2$).

DEPENDENCIA TRANSFUSIONAL BASAL SEGÚN LA CLASIFICACIÓN NUEVA

En nuestra cohorte, el 94% (16/17) de los pacientes que no tienen una mutación leve (genotipos I/I, I/G y G/G) se encuentran en DT. El único paciente que no es DT de este grupo tiene un genotipo con dos mutaciones intermedias, ambas con afectación de *splicing* inferida

por el estudio *in silico*. Es plausible que una de estas dos mutaciones afecte de forma más leve al *splicing* de lo que predecimos con el estudio *in silico*, aunque este paciente presenta anemia, esplenomegalia y sobrecarga férrica leve.

Dichas diferencias en la DT entre el grupo con mutaciones leves (L/L, L/I y L/G) y el grupo sin mutaciones leves (I/I, I/G y G/G) son estadísticamente significativas (36 vs. 94%; $p = 0,000$). En cuanto a los genotipos más leves, ningún paciente (0/6) con genotipo L/L es DT. En el grupo L/I hay 5 (28%) pacientes en DT, aunque dos de ellos también tienen una beta-talasemia *minor* confirmada genéticamente. Por último, 8 (47%) de los pacientes en el grupo L/G son DT. Como se verá más adelante, los dos pacientes L/G con el fenotipo más acusado (un fallecimiento al nacimiento y un paciente que no responde a la esplenectomía) presentan la misma mutación *missense* (Gly511Glu), posiblemente clasificada como leve de forma incorrecta por nuestro sistema.

Respuesta a la esplenectomía

DEPENDENCIA TRANSFUSIONAL TRAS LA ESPLENECTOMÍA SEGÚN LA CLASIFICACIÓN CLÁSICA

Veintitrés de los 29 pacientes con DT basal están esplenectomizados. El principal motivo para no realizar la esplenectomía en los pacientes con DT fue la edad (5 pacientes menores de 5 años). En total, 7 (30%) de los pacientes esplenectomizados siguen en DT tras la esplenectomía. Hay 9 esplenectomizados en el grupo M/M, de los cuales 2 siguen siendo DT. En el grupo M/NM, 4 de los 13 esplenectomizados tienen DT, al igual que el único paciente esplenectomizado en el grupo NM/NM. No obstante, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con genotipos M/M y M/NM (DT: 22 vs. 31%; $p = 0,523$), ni entre el grupo NM/NM y el resto de los genotipos (DT: 100 vs. 27%; $p = 0,304$).

En cuanto a los niveles de hemoglobina tras la esplenectomía, tampoco encontramos diferencias significativas entre los distintos genotipos.

DEPENDENCIA TRANSFUSIONAL TRAS LA ESPLENECTOMÍA SEGÚN LA NUEVA CLASIFICACIÓN

La mayoría de los pacientes con dos mutaciones graves (G/G) o con una mutación grave y otra intermedia (I/G) siguen en DT tras la esplenectomía. Esto ocurre en el 67% de los pacientes con estos genotipos y

Tabla 2. Comparación de las características genéticas y clínicas entre los estudios que relacionan el genotipo y el fenotipo en el déficit de piruvato quinasa

	Evolución natural^{2,3}	Este estudio
Pacientes en el estudio genotipo-fenotipo	195	58
Genotipos		
M/M	113 (58%)	27 (46,6%)
M/NM	52 (27%)	29 (50%)
NM/NM	30 (15%)	2 (3,4%)
Pacientes con al menos una mutación M	85%	96%
Alelos más frecuentes*		
M	R510Q (91), R486W (35)	R486W (23), R337Q (8), R510Q (7)
NM	E241X (26)	E241X (10)
En > 5 años		
Dependencia transfusional basal	85 de 202 (42,1%) [†]	24 de 51 (47,1%)
Esplenectomía	120 de 198 (60,6%) [†]	23 de 51 (45,1%)
Dependencia transfusional tras la esplenectomía	17 de 79 (21,5%) [†]	7 de 23 (30%)

*Datos de la cohorte del estudio de correlación genotipo-fenotipo, donde excluyen los casos Amish (son todos homocigotos para la mutación R479H).

[†]La *n* total cambia en el estudio de evolución natural dependiendo del número de pacientes con datos completos que hay en cada categoría. Se contabilizan los 79 pacientes esplenectomizados que se encontraban en dependencia transfusional antes de la esplenectomía. En el estudio de evolución natural hay recogidos 41 pacientes que fueron esplenectomizados pese a no estar en dependencia transfusional.

Tabla 3. Esplenectomía y dependencia transfusional según los genotipos encontrados en nuestra cohorte

Genotipo	n		Dependencia transfusional basal	Esplenectomía*	Dependencia transfusional tras la esplenectomía
M/M	27		11/27 (41%)	9/27 (33%)	2/9 (22%)
M/NM	29		16/29 (55%)	13/29 (45%)	4/13 (31%)
NM/NM	2		2/2 (100%)	1/2 (50%)	1/1 (100%)
		Genotipo clásico			
L/L	6	5 M/M y 1 M/NM	0/6 (0%)	0/6 (0%)	-
L/I	18	15 M/M y 3 M/NM	5/18 (28%)	3/18 (17%)	1/3 (33%)
L/G	17	17 M/NM	8/17 (47%)	6/17 (35%)	1/6 (17%)
I/I	9	7 M/M y 2 M/NM	8/9 (89%)	8/9 (89%)	1/8 (12,5%)
I/G	6	2 M/NM	6/6 (100%)	5/6 (83%)	3/5 (60%)
G/G	2	2 NM/NM	2/2 (100%)	1/2 (50%)	1/1 (100%)

*Algunos pacientes no han sido esplenectomizados pese a encontrarse en dependencia transfusional por ser menores de 5 años.

contrasta con que solo el 17,6% del resto de los pacientes esplenectomizados (genotipos I/I, L/I y L/G) siguen siendo DT ($p = 0,025$). También hay diferencias significativas en los valores de hemoglobina tras la esplenectomía entre ambos grupos (G/G e I/G: 7,55 g/dl, $n = 6$; I/I, L/I y L/G: 9,44 g/dl, $n = 17$; $p = 0,024$).

Hay dos pacientes con genotipo I/G que dejaron de ser DT tras la esplenectomía. Ambos mantienen niveles muy bajos de hemoglobina ajustada al sexo y al rango

de edad (más de 4 g/dl por debajo del límite inferior de la normalidad), y requieren transfusiones esporádicas tras eventos infecciosos.

Nuevas mutaciones encontradas en este estudio

Diez de las variantes genéticas en nuestra cohorte son nuevas (no publicadas previamente ni incluidas en

el registro de mutaciones del déficit de piruvato quinasa²⁰), de modo que el porcentaje de pacientes con al menos una mutación nueva es del 22% (13/58). Las variantes nuevas causantes de déficit de piruvato quinasa se muestran en la **tabla 4**.

Discusión

La clasificación clásica de las mutaciones en el déficit de piruvato quinasa no refleja en muchos casos su gravedad. En general, se asume que las mutaciones NM son más graves que las M, pero esto no tiene por qué ser necesariamente así. Algunas mutaciones que no producen cambio de aminoácido tienen repercusiones leves en la expresión de los genes, como se ha demostrado en otras enfermedades^{13,14}. Otras mutaciones pueden tener efectos muy pronunciados sobre la función de una proteína pese a que solo se altere un aminoácido¹¹. Con la clasificación que proponemos, algunas mutaciones NM pasan a catalogarse como de gravedad intermedia (aquellas que afectan al promotor o las que producen cambios en el número de nucleótidos sin que se vea afectado el marco de lectura de la traducción) y otras pasan a clasificarse como leves, como las que afectan a las regiones que se transcriben, pero que no se traducen (regiones UTR), y las mutaciones intrónicas que no afectan a las secuencias consenso del *splicing*. En contrapartida, algunas mutaciones M se han clasificado como intermedias, principalmente las que afectan a sitios de la enzima que sabemos que son clave para su correcto funcionamiento, y también aquellas en las que se predice que el cambio de nucleótido altera el *splicing*. Estos cambios permiten que la nueva clasificación capture más información sobre la intensidad del efecto que tiene cada mutación, facilitando que se encuentren relaciones estadísticamente significativas entre el genotipo y el fenotipo pese a la limitación en el número de pacientes en esta cohorte.

La clasificación de las mutaciones que proponemos tiene limitaciones que se ven reflejadas en varios ejemplos. Algunas mutaciones pueden ser más graves de lo que predecimos, como parece ser el caso de la mutación *missense* Gly511Glu, que clasificamos como leve, pero que se asocia a fenotipos graves tanto en nuestra cohorte como en dos casos publicados^{21,22}. Dicha mutación no afecta a ningún aminoácido clave para el funcionamiento de la enzima y tampoco se predice alteración del *splicing*. Es posible que esta mutación se asocie a un fenotipo grave porque produzca inestabilidad de la enzima, como ocurre con la

Tabla 4. Mutaciones encontradas en este estudio que no se habían descrito previamente

Posición genética	Efecto
PKLR:c.395C>T	p.Ala132Val
PKLR:c.1469G>A	p.Arg490Gln
PKLR:c.1321C>A	p.Leu441Ile
PKLR:c.1614A>C	p.Glu538Asp
PKLR:c.204del	p.Phe69SerfsTer39
PKLR:c.841del	p.Asp281ThrfsTer40
PKLR:c.1576del	p.Ala526GlnfsTer4
PKLR:c.1618+1G>A	<i>splicing</i>
PKLR:c.965+2T>G	<i>splicing</i>
PKLR:c.*445C>T	3'UTR

mutación R510Q que afecta al aminoácido contiguo. En otras ocasiones observamos un fenotipo más leve que el esperado; por ejemplo, con genotipo I/I hay un único caso que no presenta DT basal. Este paciente tiene dos mutaciones para las que se predice un defecto de *splicing* a partir del análisis bioinformático. Posiblemente el análisis bioinformático haya fallado para una de esas dos mutaciones y en realidad no se produzca una alteración del *splicing* significativa *in vivo*. En nuestro trabajo no hemos podido llevar a cabo estudios de expresión génica que permitan corroborar los resultados obtenidos con el análisis bioinformático del *splicing*. Otra limitación de esta clasificación por gravedad es que asumimos que cualquier cambio de aminoácido en la misma posición tiene un efecto similar, y esto no tiene por qué ser así. En la práctica no podemos saber cuál es el efecto de cada posible cambio de aminoácido en cada posición de la enzima. No obstante, la clasificación permite inferir el grado promedio de afectación cuando una posición concreta de la proteína se ve afectada.

Este trabajo presenta otras limitaciones no relacionadas con el nuevo método de clasificación. Al tratarse de una enfermedad rara, el número de pacientes disponible con ciertos genotipos es muy bajo, lo cual ha podido influir para no replicar las diferencias encontradas en el estudio de evolución natural, en el que se describen diferencias estadísticamente significativas en la gravedad de la enfermedad entre el genotipo NM/NM y el resto de los genotipos³. Por falta de datos, no hemos podido

realizar algunos estudios que serían interesantes. Por ejemplo, no hemos podido evaluar de forma cuantitativa la reducción de los requerimientos transfusionales por la esplenectomía, ni si hay diferencias entre los distintos genotipos en este aspecto.

Aunque el déficit de piruvato quinasa es una enfermedad autosómica recesiva, además del gen PKLR existen otros factores que influyen en el fenotipo. Esto se conoce a partir del estudio de cohortes de pacientes homocigotos para una misma mutación y de estudios familiares, en los que se observan variaciones fenotípicas a partir de un mismo genotipo³. Algunos pacientes pueden presentar variantes genéticas en otros genes asociados a otros tipos de anemias²³. El grado de esplenomegalia y las variaciones en el tratamiento de los pacientes con esta enfermedad también pueden afectar al fenotipo. La expresión residual en la línea eritroide de otras isoenzimas de la piruvato quinasa puede mitigar parcialmente el déficit enzimático en algunos casos⁷. Todos estos factores pueden influir en el fenotipo de los pacientes con déficit de piruvato quinasa, haciendo que sea difícil establecer una relación clara entre la genética del gen PKLR y el fenotipo.

Pese a las limitaciones descritas, en este estudio hemos observado diferencias significativas entre los genotipos en lo referente a la DT basal y tras la esplenectomía. Esto se ha observado cuando hemos utilizado la nueva clasificación y no se cumple cuando se utiliza la clasificación *missense/no missense*. Hasta ahora solo se había conseguido establecer una relación entre la gravedad de la enfermedad y el genotipo NM/NM, sin encontrar diferencias significativas entre los requerimientos transfusionales y los genotipos M/M y M/NM^{2,3} (que son mucho más frecuentes en los pacientes con esta enfermedad). A partir de los estudios previos no hay resultados que se puedan usar para individualizar el manejo de la enfermedad según la genética del paciente. Con esta nueva forma de clasificar las mutaciones en el déficit de piruvato quinasa es posible encontrar asociaciones estadísticamente significativas según la gravedad de la enfermedad en un abanico más amplio de genotipos, lo que puede ser útil para un mayor porcentaje de pacientes.

La esplenectomía es un procedimiento que no está exento de complicaciones, en especial por un aumento del riesgo de padecer infecciones bacterianas y eventos trombóticos²⁴. Aquí describimos que la mayoría de los pacientes con genotipos G/G y G/I siguen siendo DT tras la esplenectomía (≥ 6 transfusiones al año). Aunque no hemos podido estudiar si la esplenectomía reduce el número de transfusiones que necesitan estos

pacientes, nuestros resultados podrían tenerse en cuenta al valorar la esplenectomía u otras terapias alternativas en los pacientes con genotipos que se asocian a respuesta pobre.

En nuestra cohorte de pacientes hay una mayor proporción de alelos *missense* que en el estudio de evolución natural. Esto se debe a que en nuestro medio es muy frecuente la mutación R486W, que supone un 20% de los genes mutados de esta cohorte. Pese a ello, la proporción de pacientes con dos mutaciones *missense* en nuestra cohorte es menor que en el registro internacional (46,6 vs. 58%) y solo tenemos registrados dos pacientes homocigotos para la mutación R486W. Se ha descrito que esta mutación en homocigosis se asocia a anemia leve que no requiere transfusiones^{2,25}. Es posible que en España se esté infradiagnosticando a los pacientes homocigotos para esta mutación, por lo que se estarían perdiendo casos índice para iniciar consejo genético en esta enfermedad. Esto es relevante porque, aunque los homocigotos para la mutación R486W tienen un fenotipo leve, cuando esta mutación se hereda junto a otra más grave puede dar lugar a fenotipos con DT que requieren esplenectomía³.

Los hallazgos de este trabajo ponen de manifiesto la importancia del estudio genético en esta enfermedad, no solo para confirmar el diagnóstico, sino también para establecer un pronóstico de los pacientes y planificar su manejo.

Conclusiones

La clasificación de las mutaciones basada en si se produce o no un cambio de aminoácido no permite establecer una relación entre el genotipo y la DT en nuestros pacientes. En la cohorte internacional tampoco se encuentran diferencias significativas en los requerimientos transfusionales entre los pacientes que tienen una o dos mutaciones *missense*, que comprenden más del 85% de los pacientes con déficit de piruvato quinasa.

Hemos desarrollado un sistema que permite asignar una categoría de gravedad a las mutaciones causantes de esta enfermedad. En nuestra cohorte, los pacientes con genotipos sin mutaciones leves tienen DT basal. Un amplio porcentaje de pacientes con dos mutaciones graves o con una mutación grave y otra intermedia siguen siendo DT incluso tras la esplenectomía.

Aunque se sigue encontrando variabilidad en el fenotipo dentro de cada posible genotipo, este nuevo sistema de clasificar las mutaciones permite establecer

qué pacientes tienen una mayor probabilidad de que la DT no se resuelva tras la esplenectomía.

Financiación

Este estudio se ha podido llevar a cabo gracias a la Beca de Investigación de la Fundación Española de Hematología y Hemoterapia, año 2020, concedida a Jorge M. Nieto, asociada al proyecto de investigación AP168922018 de la Fundación Mutua Madrileña. El estudio ha sido financiado parcialmente por Agios Pharmaceuticals (número de proyecto IST-2018-10329).

Conflicto de intereses

Jorge M. Nieto, Eduardo José Salido Fierez, David Beneitez, Salvador Payant-Pernía, Rafael del Orbe Barreto, Ana Villegas y Marta Morado Arias han recibido honorarios por participar en juntas de asesoría para Agios Pharmaceuticals. El resto de los autores no tienen conflictos de intereses que declarar.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido la aprobación del Comité de Ética para el análisis y publicación de datos clínicos obtenidos de forma rutinaria. El consentimiento informado de los pacientes no fue requerido por tratarse de un estudio observacional retrospectivo.

Bibliografía

- Morado M, Villegas AM, de la Iglesia S, Martínez-Nieto J, del Orbe Barreto R, Beneitez D, et al. Documento de consenso para el diagnóstico y tratamiento del déficit de piruvato quinasa. *Med Clin*. 2021;157:253.e1-8.
- Grace RF, Bianchi P, van Beers EJ, Eber SW, Glader B, Yaish HM, et al. Clinical spectrum of pyruvate kinase deficiency: data from the Pyruvate Kinase Deficiency Natural History Study. *Blood*. 2018;131:2183-92.
- Bianchi P, Fermo E, Lezon-Geyda K, Beers EJ, Morton HD, Barcellini W, et al. Genotype-phenotype correlation and molecular heterogeneity in pyruvate kinase deficiency. *Am J Hematol*. 2020;95:472-82.
- Al-Samkari H, Galactéros F, Glenthøj A, Rothman JA, Andres O, Grace RF, et al. Mitapivat versus placebo for pyruvate kinase deficiency. *N Engl J Med*. 2022;386:1432-42.
- Glenthøj A, van Beers EJ, Al-Samkari H, Viprakasit V, Kuo KHM, Galactéros F, et al. Mitapivat in adult patients with pyruvate kinase deficiency receiving regular transfusions (ACTIVATE-T): a multicentre, open-label, single-arm, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2022;9:e724-32.
- Valentini G, Chiarelli LR, Fortin R, Dolzan M, Galizzi A, Abraham DJ, et al. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. *J Biol Chem*. 2002;277:23807-14.
- Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Chiarelli LR, Valentini G. Pyruvate kinase deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev*. 2007;21:217-31.
- Christensen RD, Yaish HM, Johnson CB, Bianchi P, Zanella A. Six children with pyruvate kinase deficiency from one small town: molecular characterization of the PK-LR Gene. *J Pediatr*. 2011;159:695-7.
- Kugler W, Willaschek C, Holtz C, Ohlenbusch A, Laspe P, Krugener R, et al. Eight novel mutations and consequences on mRNA and protein level in pyruvate kinase-deficient patients with nonspherocytic hemolytic anemia. *Hum Mutat*. 2000;15:261-72.
- van Wijk R, Huizinga EG, van Wesel ACW, van Oirschot BA, Hadders M, van Solinge WW. Fifteen novel mutations in PKLR associated with pyruvate kinase (PK) deficiency: structural implications of amino acid substitutions in PK. *Hum Mutat*. 2009;30:446-53.
- Wang C, Chiarelli LR, Bianchi P, Abraham DJ, Galizzi A, Mattevi A, et al. Human erythrocyte pyruvate kinase: characterization of the recombinant enzyme and a mutant form (R510Q) causing nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood*. 2001;98:3113-20.
- Bianchi P, Fermo E. Molecular heterogeneity of pyruvate kinase deficiency. *Haematologica*. 2020;105:2218-28.
- Al Zadjali S, Wali Y, Al Lawatiya F, Gravell D, AlKindi S, Al Falahi K, et al. The β -globin promoter -71 C>T mutation is a β + thalassemic allele: a mild β -globin gene promoter mutation (-71 C>T) in Oman. *Eur J Haematol*. 2011;87:457-60.
- Hino M, Ito H, Yamashiro Y, Hattori Y, Nitta T, Adhiyanto C. The +1,506 (A>C) mutation in the 3' untranslated region affects β -globin expression. *Hemoglobin*. 2012;36:399-406.
- Desmet F-O, Hamroun D, Lalonde M, Colod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:e67.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11:361-2.
- Gelfman S, Wang Q, McSweeney KM, Ren Z, La Carpi F, Halvorsen M, et al. Annotating pathogenic non-coding variants in genic regions. *Nat Commun*. 2017;8:236.
- Kung C, Hixon J, Kosinski PA, Cianchetta G, Histen G, Chen Y, et al. AG-348 enhances pyruvate kinase activity in red blood cells from patients with pyruvate kinase deficiency. *Blood*. 2017;130:1347-56.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405-24.
- Canu G, De Bonis M, Minucci A, Capoluongo E. Red blood cell PK deficiency: an update of PK-LR gene mutation database. *Blood Cells Mol Dis*. 2016;57:100-9.
- Svidnicki MCCM, Zanetta GK, Congrains-Castillo A, Costa FF, Saad STO. Targeted next-generation sequencing identified novel mutations associated with hereditary anemias in Brazil. *Ann Hematol*. 2020;99:955-62.
- van Straaten S, Bierings M, Bianchi P, Akiyoshi K, Kanno H, Serra IB, et al. Worldwide study of hematopoietic allogeneic stem cell transplantation in pyruvate kinase deficiency. *Haematologica*. 2018;103:e82-6.
- Nieto JM, Rochas-López S, González-Fernández FA, Villegas-Martínez A, Bolaños-Calderón E, Salido-Fiérrez E, et al. Next generation sequencing for diagnosis of hereditary anemia: experience in a Spanish reference center. *Clin Chim Acta*. 2022;531:112-9.
- Di Sabatino A, Carsetti R, Corazza GR. Post-splenectomy and hyposplenic states. *Lancet*. 2011;378:86-97.
- Zanella A, Bianchi P, Baronciani L, Zappa M, Bredi E, Vercellati C, et al. Molecular characterization of PK-LR gene in pyruvate kinase-deficient Italian patients. *Blood*. 1997;89:3847-52.