

# Déficit de cobalamina hereditario juvenil causado por mutaciones en el gen *GIF*

M.<sup>a</sup>C. García Jiménez<sup>a</sup>, A. Baldellou Vázquez<sup>a</sup>, M.<sup>a</sup>T. Calvo Martín<sup>b</sup>,  
G. Pérez-Lungmus<sup>c</sup> y J. López Pisón<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Metabolismo. <sup>b</sup>Unidad de Genética. <sup>c</sup>Servicio de Hematología. <sup>d</sup>Unidad de Neuropediatría.  
Hospital Universitario Infantil Miguel Servet. Zaragoza. España.

Los errores congénitos del metabolismo de la cobalamina afectan a su absorción, transporte o metabolismo intracelular. La anemia megaloblástica hereditaria juvenil por déficit de vitamina B<sub>12</sub> está causada por una malabsorción de cobalamina. En la anemia perniciosa congénita por déficit de factor intrínseco, y en la anemia megaloblástica 1 por malabsorción de vitamina B<sub>12</sub>, causada por un defecto en el receptor vitamina B<sub>12</sub>/factor intrínseco o síndrome de Imerslund-Gräsbeck, existe un déficit de vitamina B<sub>12</sub>. El diagnóstico diferencial entre estas dos entidades no puede ser completado únicamente mediante la clínica y los datos de laboratorio. Presentamos un paciente español con anemia megaloblástica hereditaria juvenil por déficit de factor intrínseco, heterocigoto compuesto para dos mutaciones distintas en el gen *GIF*. La identificación de mutaciones causantes de la enfermedad en genes específicos ha mejorado nuestra capacidad de diagnóstico y tratamiento de estas situaciones.

## Palabras clave:

*Anemia megaloblástica. Gen GIF. Síndrome Imerslund-Gräsbeck. Anemia perniciosa juvenil. Malabsorción de vitamina B<sub>12</sub>*

## HEREDITARY JUVENILE COBALAMIN DEFICIENCY DUE TO MUTATIONS IN *GIF* GENE

Inborn errors of cobalamin (Cbl) metabolism affect its absorption, transport, as well as its intracellular metabolism. Hereditary juvenile megaloblastic anaemia due to cobalamin deficiency, results from defects in Cbl absorption. There is a lack of vitamin B<sub>12</sub> in congenital pernicious anaemia due to intrinsic factor deficiency and megaloblastic anaemia 1 due to selective intestinal malabsorption of vitamin B<sub>12</sub> or Imerslund-Gräsbeck syndrome. Differential diagnosis can't be accomplished only by clinical and biochemical findings. We present a patient from Spain with a megaloblastic anaemia due to intrinsic factor deficiency

(IFD). The patient is a compound heterozygous in *GIF* gene for a splice site mutation inherited from his mother and a missense change inherited from his father. The identification of disease-causing mutations in specific genes has improved our ability to diagnose many of these conditions.

## Key words:

*Megaloblastic anaemia. GIF gene. Imerslund-Gräsbeck. Pernicious anaemia. Malabsorption of vitamin B<sub>12</sub>*

## INTRODUCCIÓN

La malabsorción de cobalamina puede ser debida a diferentes causas, tanto adquiridas como hereditarias<sup>1,2</sup>. En los países desarrollados el déficit de cobalamina en los niños es casi siempre una enfermedad hereditaria. Los errores congénitos del metabolismo de la cobalamina pueden afectar a su absorción, transporte y procesamiento intracelular<sup>3</sup>. La anemia perniciosa congénita (OMIM #261000), o déficit de factor intrínseco, es un defecto autosómico recesivo, raro en la infancia, caracterizado por la falta de factor intrínseco (FI), con secreción ácida normal, sin existencia de anticuerpos antifactor intrínseco, y citología de la mucosa del estómago normal<sup>4-6</sup>. Este déficit o deficiencia de FI produce una malabsorción de cobalamina y, por lo tanto, una anemia megaloblástica. A diferencia de las formas adquiridas de anemia perniciosa, no existen anticuerpos anti-FI. Diferentes autores han identificado mutaciones en el gen *GIF* (11q13) que se asocian con pérdida de función del FI<sup>4-7</sup>. La anemia megaloblástica 1 (OMIM #261100) o síndrome de Imerslund-Gräsbeck<sup>8,9</sup> está causada por un defecto en el receptor en el nivel de íleon terminal del complejo vitamina B<sub>12</sub>/factor intrínseco (cobalamina/FI). Ni los hallazgos clínicos, ni las determinaciones bioquímicas, ni el test de absorción de radiocobalamina o test de Schilling. El test de Schilling consiste

**Correspondencia:** Dra. M.<sup>a</sup>C. García Jiménez.  
Avda. Juan Carlos I, 61, 4.<sup>º</sup> A. 50009 Zaragoza. España.  
Correo electrónico: igarciaji@salud.aragon.es

Recibido en octubre de 2007.

Aceptado para su publicación en marzo de 2008.

en la administración de B<sub>12</sub> por vía oral marcada radiactivamente; previamente se inyecta 1 mg de vitamina B<sub>12</sub> por vía intramuscular para saturar la transcobalamina II y, por ello, la absorción de la B<sub>12</sub> marcada se detectará en la orina (lo normal es el 5-35% a las 24 h).

En el estudio del déficit hereditario de absorción de cobalamina, el análisis de las mutaciones de los genes *CUBN*, *AMN* y *GIF* puede proporcionar el diagnóstico molecular del defecto subyacente, ayudando así a planificar el adecuado tratamiento y seguimiento de estos pacientes. Algunos autores proponen el estudio de molecular de estos genes como el método diagnóstico de elección para la anemia megaloblástica por malabsorción de vitamina B<sub>12</sub><sup>6</sup>.

### OBSERVACIÓN CLÍNICA

Se trata de un niño de 4 años de edad, primer hijo de padres sanos no consanguíneos. El embarazo, el parto y el período neonatal fueron normales; y el desarrollo ponderoestatural hasta la fecha también es normal. Consulta en nuestro hospital para estudio de anemia megaloblástica detectada en su centro de salud. Presentaba clínicamente desde hacía 1 mes anorexia, palidez y fatiga. Entre los hallazgos físicos destacaba importante palidez de piel y mucosas y un soplo sistólico de grado I/VI. Se realizaron las siguientes determinaciones en sangre y orina: recuento leucocitario y fórmula, hemoglobina, hematocrito, índices eritrocitarios, plaquetas, reticulocitos, ferritina, vitamina B<sub>12</sub> sérica, ácido fólico, lactato deshidrogenasa, homocisteína, ácido metilmalónico en orina, metionina, estudio de función renal, inmunoglobulinas, marcadores de enfermedad celíaca, anticuerpos anti-FI. Los hallazgos hematológicos y en orina fundamentales para la orientación diagnóstica del paciente se hallan resumidos en la tabla 1 (las determinaciones se realizaron a su ingreso y

tras 15 días de tratamiento). No se detectó proteinuria tubular y la función renal fue normal; los anticuerpos anti-factor intrínseco y el estudio de marcadores celíacos fueron negativos; las inmunoglobulinas y el estudio de malabsorción intestinal fueron normales. El estudio hematológico mostró hallazgos compatibles con anemia megaloblástica. Se realizó el test de Schilling en dos ocasiones, y no se detectó eliminación de vitamina B<sub>12</sub> en orina de 24 h, lo cual es compatible con un defecto de absorción de la misma. La falta de existencia de anticuerpos anti-FI descartaba un déficit de FI de causa adquirida. Dentro de las causas de malabsorción de vitamina B<sub>12</sub> por déficit congénito de FI y dada la existencia de hiperhomocisteinemia y aciduria metilmalónica, el diagnóstico diferencial debería ser realizado entre mutaciones de los genes *GIF*, *CUBN*, *AMN* y *TCN* y defectos congénitos del metabolismo de las cobalaminas F, C, D.

Con el diagnóstico de anemia megaloblástica por posible déficit de factor intrínseco (FI), se inició tratamiento con ácido fólico (5 mg/día) y vitamina B<sub>12</sub> intramuscular (50 µg de hidroxicobalamina diariamente durante 7 días con posterior disminución, según pauta que indicó el servicio de hematología, hasta el momento actual en que recibe 250 µg intramusculares una vez cada 3 semanas).

Una vez instaurado el tratamiento se observó mejoría clínica y bioquímica; asimismo se normalizaron los parámetros hematológicos y urinarios (tabla 1).

Previamente a la biopsia de piel para la realización de estudios de complementación genética para el estudio del metabolismo intracelular de la cobalamina, se contactó con un centro extranjero para la realización del estudio molecular en ADN (previa firma del consentimiento informado) de los genes implicados en la malabsorción de la vitamina B<sub>12</sub> (análisis del gen *GIF*, *CUBN* y *AMN*), en el

TABLA 1. Parámetros en sangre y orina en el paciente a su ingreso y tras el tratamiento (1 mes tras el inicio del tratamiento) con vitamina B<sub>12</sub> intramuscular

	Ingreso	1 mes tras tratamiento	Valores normales
Hemoglobina	7,8 g/dl	14,1 g/dl	13-18 g/dl
Leucocitos	6,0 10 × 3/µl	10,3 10 × 3/µl	3.8-10.0 10 × 3/µl
Fórmula	Normal	Normal	
Plaquetas	121 10 × 3/µl	431 10 × 3/µl	125-450 10 × 3/µl
Reticulocitos	5%	0,8%	0,8-2,5%
Volumen corpuscular medio	100 fl	74,6 fl	82-98 fl
Hematocrito	22,8%	41,3%	40-52%
Ferritina	130,8 µg/l	17,7 µg/l	40-280 µg/l
Vitamina B <sub>12</sub> sérica	32 ng/l	> 1.500 ng/l	180-914 ng/l
Ácido fólico	12 µg/l	> 20 µg/l	3-20 µg/l
Lactato deshidrogenasa	4.894 U/l	321 U/l	110-295 U/l
Homocisteína	75,9 µmol/l	5 µmol/l	2,8-5 µmol/l
Metionina	14,68 µmol/l	25,3 µmol/l	15-40 µmol/l
Ácido metilmalónico en orina	1.683 mmol/mol creatinina	3,2 mmol/mol creatinina	0,2-8,5 mmol/mol creatinina

probando, en sus padres y hermana con el fin de intentar tipificar adecuadamente el defecto genético subyacente, y llegar al diagnóstico correcto del paciente, que nos permitiera proporcionar un tratamiento y un consejo genético adecuado. El estudio molecular del ADN del probando detectó dos mutaciones en el gen *GIF*, una de *splicing* y otra *missense* (cambio de sentido). Su padre y su madre eran portadores sanos de cada una de ellas y su hermana portadora sana de la mutación de *splicing*. Dado este resultado no se realizó la biopsia de piel. A continuación se detallan las mutaciones encontradas:

Paciente: c.256 + 2T > G (mutación de *splicing*)/c.659T > C; p.I220T (mutación *missense*).

Padre: c.659T > C; p.I220T (mutación *missense*).

Madre: c.256 + 2T > G (mutación de *splicing*).

Hermana: c.256 + 2T > G (mutación de *splicing*).

El paciente es controlado periódicamente en la unidad de hematología presentando buena evolución con absoluta normalidad de los índices hematológicos.

## DISCUSIÓN

A pesar de que un test de absorción de radiocobalamina (test de Schilling) adecuadamente realizado debería distinguir entre los pacientes con anemia megaloblástica por déficit de factor intrínseco<sup>14</sup> y el síndrome de Imerlund-Gräsbeck, en la práctica esta diferenciación es muy difícil, debido principalmente a que en muchos países este test no está disponible para su realización (como actualmente en España)<sup>1,6</sup>. El estudio molecular de los genes *CUBN*, *AMN* y *GIF* es el método diagnóstico de elección en la anemia megaloblástica hereditaria por déficit de vitamina B<sub>12</sub> para llegar al diagnóstico correcto. En nuestra familia, que procede de España, se han descrito dos mutaciones en el gen *GIF*: una mutación de *splicing* heredada de su madre y otra *missense* heredada de su padre. La hermana del probando ha heredado la mutación de *splicing* y es una portadora sana, al igual que sus padres. Creemos que la mutación *missense* es patológica basándonos en el hecho de que produce un cambio de una cadena no polar a una polar del aminoácido isoleucina en posición 220 (este residuo aminoácido suele estar altamente conservado), traduciendo en un defecto de formación del FI. Esta mutación *missense* no ha sido detectada hasta el momento en más de 400 cromosomas estudiados. No se han encontrado alteraciones en ningún otro exón. Todo ello apoya el hecho de que la mutación c.659T > C puede constituir junto con la mutación de *splicing* la causa, en nuestro paciente, del déficit o deficiencia en el factor intrínseco que afecte de alguna forma (no conocida hasta el momento) a la unión de la cobalamina al FI o a la unión de la cobalamina-FI con el CUBAM, produciéndose una malabsorción de la cobalamina.

La identificación de mutaciones patológicas en genes específicos *CUBN*, *AMN*, *GIF* ha mejorado nuestra capaci-

dad para el diagnóstico y el tratamiento de muchas de estas enfermedades, pudiendo evitar la realización de pruebas diagnósticas más agresivas para el estudio de defectos del metabolismo de la cobalamina que deben ser realizados en muestras obtenidas por biopsia de piel.

## Agradecimientos

Agradecemos a los doctores S.M. Tanner y A. de la Chapelle la realización del análisis genético de nuestro paciente y su familia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Whitehead VM. Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. *BJH*. 2006;134:125-36.
- Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematol Educ Program*. 2003;1:62-81.
- Morel C, Rosenblatt D. Inborn errors of folate and cobalamin transport and metabolism. En: Sarafoglou K, Hoffmann G, Moran T, editors. *Essential pediatric endocrinology and metabolism*. 1st ed. New York: McGraw-Hill; 2008.
- Gordon M, Brada N, Remacha A, Badell I, Del Río E, Baiget M, et al. A genetic polymorphism in the coding region of the gastric intrinsic factor gene (GIF) is associated with congenital intrinsic factor deficiency. *Hum Mutat*. 2004;23:85-91.
- Yassin F, Rothenberg SP, Rao S, Gordon M, Alpers D, Quadros EV. Identification of a 4-base deletion in the gene in inherited intrinsic factor deficiency. *Blood*. 2004;103:1515-7.
- Tanner SM, Zhongyuan L, Perko JD, Oner C, Cetin M, Altay C, et al. Hereditary juvenile cobalamin deficiency caused by mutations in the intrinsic factor gene. *Proc Natl Acad Sci*. 2005; 102:4130-3.
- Hewitt JE, Gordon MM, Taggart RT, Mohandas TK, Alpers DH. Human gastric intrinsic factor: Characterization of cDNA and genomic clones and localization to human chromosome 11. *Genomics*. 1991;10:432-40.
- Imerlund O. Idiopathic chronic megaloblastic anaemia in children. *Acta Paediatr Scand*. 1960;49 Suppl. 119:1-15.
- Gräsbeck R, Gordin R, Kantero I, Kuhlback. Selective vitamin B<sub>12</sub> malabsorption and proteinuria in young people. A syndrome. *Acta Med Scand*. 1960;167:289-96.
- Fyfe JC, Madsen M, Højrup P, Christensen EI, Tanner SM, De la Chapelle A, et al. The functional cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood*. 2004;103:1573-9.
- He Q, Madsen M, Kilkenney A, Gregory B, Christensen EI, Vorum H, et al. Fyfe amnionless function is required for cubilin brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) absorption in vivo. *Blood*. 2005;106:1447-53.
- Tanner SM, Aminoff M, Wright F, Liyanarachi S, Kuronen M, Saarinen A, et al. Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anemia. *Nat Genet*. 2003;33:426-9.
- Tanner SM, Li Z, Bisson R, Acar C, Oner C, Oner R, et al. Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B<sub>12</sub>: Founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. *Hum Mutat*. 2004;23:327-33.
- Schilling RF. Intrinsic factor studies II. The effect of gastric juice on the urinary excretion of radioactivity after the oral administration of radioactive vitamin B<sub>12</sub>. *J Lab Clin Med*. 1953; 42:860-6.