

Diagnóstico prenatal molecular de anemia falciforme. 2010-2016

García-Heredia M, Collazo-Mesa T, Gómez-Martínez M
Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba.

Email: mary@cngen.sld.cu

RESUMEN

La anemia falciforme es una enfermedad genética con un patrón de herencia autosómico recesivo que constituye un problema de salud a nivel mundial. Esta causada por mutaciones puntuales en el gen HBB localizado en el brazo corto del cromosoma 11. Se presenta asociada con episodios de dolor agudo y daños progresivos en diferentes órganos. Las variantes alélicas βS y βC son la causa más común de anemia falciforme, siendo más frecuente en poblaciones con componente étnico africano. En el período comprendido entre 2010-2016 llegaron al laboratorio de Biología Molecular, procedentes de los diferentes centros provinciales de genética del país, 1855 muestras de líquido amniótico de para el estudio molecular de anemia falciforme. Estas 1855 muestras corresponden a parejas en riesgo de Anemia Falciforme detectadas por el método de electroforesis de hemoglobina. Se realizó la extracción de ADN mediante el método de precipitación salina a partir de 20mL de líquido amniótico. Para detectar la presencia de los alelos βA , βS y βC se utilizaron los métodos de PCR-ARMS y PCR-RFLP. Se obtuvo el genotipo de todas las muestras estudiadas en el laboratorio, excepto 7 muestras que presentaron elevada contaminación con sangre materna. De las muestras estudiadas, 1451 presentaron el alelo βA , de los cuales 536 lo mostraron en estado homocigótico y 915 heterocigótico, lo que arrojó una frecuencia alélica de 0,54. Por otra parte, el alelo βS fue hallado en 1132 muestras de los fetos estudiados, siendo 263 de ellos homocigóticos para esa mutación, 121 heterocigóticos compuestos y 748 heterocigóticos, con una frecuencia alélica de 0,38. El alelo βC se encontró en 301 fetos, de los cuales solo 13 resultaron ser homocigótico para esta mutación, 121 heterocigóticos compuestos y 167 heterocigóticos, proporcionando una frecuencia alélica para el alelo βC de 0,08. Las técnicas empleadas en el estudio molecular de la anemia falciforme aseguran el diagnóstico prenatal en todo el país, lo que permite el adecuado asesoramiento genético a las parejas en riesgo y una atención médica especializada a los nacidos con la enfermedad.

Palabras clave: anemia falciforme, diagnóstico molecular prenatal, HBB.

INTRODUCCIÓN

La anemia falciforme es una enfermedad genética de transmisión autosómica recesiva que constituye un problema de salud a nivel mundial. Se presenta asociada a daños progresivos en diferentes órganos y episodios de dolor agudo de origen isquémico. La hemólisis también juega un papel central en la fisiopatología, contribuyendo significativamente a la anemia, la vasculopatía e inflamación.¹ La enfermedad es originada por mutaciones en el gen HBB, aunque otras mutaciones presentes en este gen son la causa de patologías como la β -talasemia.² El gen está compuesto por 1606 pares de bases distribuidos en tres exones, se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 11, locus 15.5 y codifica para una proteína llamada β -globina, componente esencial en la hemoglobina normal adulta.³ Las variantes alélicas β S y β C, mutaciones frecuentes en el gen, son la causa más común de anemia falciforme. La mutación β S está dada por la sustitución de una adenina por timina en el sexto codón del gen de β globina, mientras que la variante alélica β C se debe a la sustitución de guanina por adenina.⁴ Esta enfermedad es uno de los trastornos genéticos más frecuentes en poblaciones con componente étnico africano, de ahí la vital importancia de contar con el diagnóstico molecular prenatal en nuestro país.

OBJETIVOS

General: Realizar el diagnóstico molecular prenatal de la anemia falciforme en el período 2010-2016.

Específicos:

1. Describir el diagnóstico molecular prenatal de la anemia falciforme.
2. Calcular la frecuencia de las muestras estudiadas entre 2010-2016.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedentes de los diferentes Centros Provinciales de Génica Médica del país, llegaron al laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica, 1 855 muestras de líquido amniótico de parejas en riesgo de anemia falciforme para la detección de los alelos β A, β S y β C. Se realizó la extracción de ADN, mediante el método de precipitación salina, partiendo

de 20mL de líquido amniótico recolectado en un tubo estéril. Para detectar la presencia de los alelos βA , βS y βC se utilizó el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Amplificación Refractaria de Mutaciones Específicas (PCR-ARMS, por sus siglas en inglés). Fue utilizado un juego de cebadores como control interno de amplificación y un cebador común para amplificar los alelos A, S y C a 1,5 μM , además del cebador específico de cada alelo a 0,85 μM , dNTPs a 0,1 mM, 1X del tampón correspondiente a la polimerasa empleada, 1,0 mM de $MgCl_2$, 100 ng de ADN y 1U de Taq Polimerasa, para un volumen final de 25 μL . La amplificación se realizó en un termociclador *MJ Research* e incluyó un primer ciclo de desnaturalización de 94°C por 15 min, seguido de 29 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 56°C y 1 min a 72 °C y, una extensión final de 5 min a 72°C. Para realizar la corrida electroforética fueron mezclados 25 μL del producto de PCR obtenido con 5 μL de bromofenol azul (BFA) como frente de corrida que fueron aplicados en un gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio. Se utilizó el tampón TBE a 0,5X (0,5 M de Tris, 10 mM de EDTA, 0,5 mM de ácido bórico). La corrida electroforética fue realizada durante 30 min a 250 V. Para la visualización de las bandas obtenidas el gel fue expuesto a luz ultravioleta en un transiluminador. Los fetos que mediante este método, resultaron SS, fueron corroborados con la técnica PCR-polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*RFLP*, de sus siglas en inglés). Las condiciones utilizadas en este método fueron las siguientes: 100 ng de ADN, 1U de Taq ADN polimerasa por reacción, 1X del tampón de la enzima, 0,75 μM de los cebadores, dNTPs a 0,2 mM, $MgCl_2$ a 1,5 mM en un volumen final de 25 μL . Las condiciones del PCR fueron 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C en un termociclador *MJ Research*. La digestión enzimática se efectuó en un volumen final de 35 μL , con 10 U de la enzima de Restricción *Bsu36I*, 1X del tampón *CutSmart* de la enzima y 10 μL del producto amplificado y fue incubada a 37°C por 15 min. El producto digerido fue mezclado con 7 μL de BFA, aplicado en un gel de agarosa al 2 % y sometido a una corrida electroforética con el tampón de corrida TBE 0,5X, a 250 V durante 30 min. Finalmente, los fragmentos fueron visualizados al exponer a luz ultravioleta el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Mediante la utilización de estos métodos se obtuvo el genotipo de todas las muestras enviadas al laboratorio, excepto siete muestras que presentaron elevada contaminación con sangre materna. De las muestras estudiadas, 1 451 presentaron el alelo βA , de los cuales 536 lo mostraron en estado homocigótico y 915 heterocigótico, lo que arrojó una frecuencia alélica de 0,54. Por otra parte, el alelo βS fue hallado en 1 132 muestras de los fetos estudiados, siendo 263 de ellos homocigóticos para esa mutación, 121 heterocigóticos compuestos y 748 heterocigóticos, con una frecuencia alélica de 0,38. El alelo βC se encontró en 301 fetos, de los cuales solo 13 resultaron ser homocigótico para esta mutación, 121 heterocigóticos compuestos y 167 heterocigóticos, proporcionando una frecuencia alélica para el alelo βC de 0,08. Los valores de frecuencia de los alelos βA , βS y βC de esta investigación coinciden con lo reportado en un estudio previo realizado en año 2010.⁵

CONCLUSIONES

Las técnicas empleadas en el estudio molecular de la anemia falciforme aseguran el diagnóstico prenatal de las muestras en todo el país, lo que permite el adecuado asesoramiento genético a las parejas en riesgo y una atención médica especializada a los nacidos con la enfermedad. La variante alélica más frecuente resultó ser βA con una frecuencia de 0,54, seguida de βS con 0,38; mientras que el alelo βC presentó una menor frecuencia con 0,08.

RECOMENDACIONES

Utilizar las nuevas tecnologías adquiridas en el laboratorio para ampliar el estudio de la anemia falciforme, mediante la detección de otras mutaciones presentes en el gen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Spandan Chaudhary, Dipali Dhawan, Prashanth G. Bagali, Pooja S.Chaudhary, Abhinav Chaudhary, Sanjay Singh, Srinivas Vudathala. Compound heterozygous β^+ β^0 mutation of

HBB gene leading to β -thalassemia major in a Gujarati family — A case study. Mol Genet Metab Rep. 2016; 7:51-53.

2. Tewari S, Brousse V, Piel FB, Menzel S, Rees DC. Environmental determinants of severity in sickle cell disease. *Haematologica.*2015;100(9):1108-16. doi:10.3324/haematol.2014.120030.
3. Turner A, Sasse J, Varadi A. Rapid detection of pathological mutations and deletions of the hemoglobin beta gene (*HBB*) by High Resolution Melting (HRM) analysis and Gene Ratio Analysis Copy Enumeration PCR (GRACE-PCR). BMC Med Genet. 2016; 17:75.
4. Alvarez-Dominguez JR, Amosova O, Fresco JR. Self-catalytic DNA Depurination Underlies Human β -Globin Gene Mutations at Codon 6 That Cause Anemias and Thalassemias. *JBiol Chem.* 2013; 288(16): 11581–11589.
5. Cervera García Ismael, García Heredia Marisleivis, Collazo Mesa Teresa. Estudio molecular de anemia falciforme. Frecuencia de los alelos β S y β C en pacientes estudiados en el año 2010. *Medisur [Internet].* 2012 Oct [citado 2017 Ene 20]; 10(5): 365-9.