

# Diagnóstico de anemia falciforme

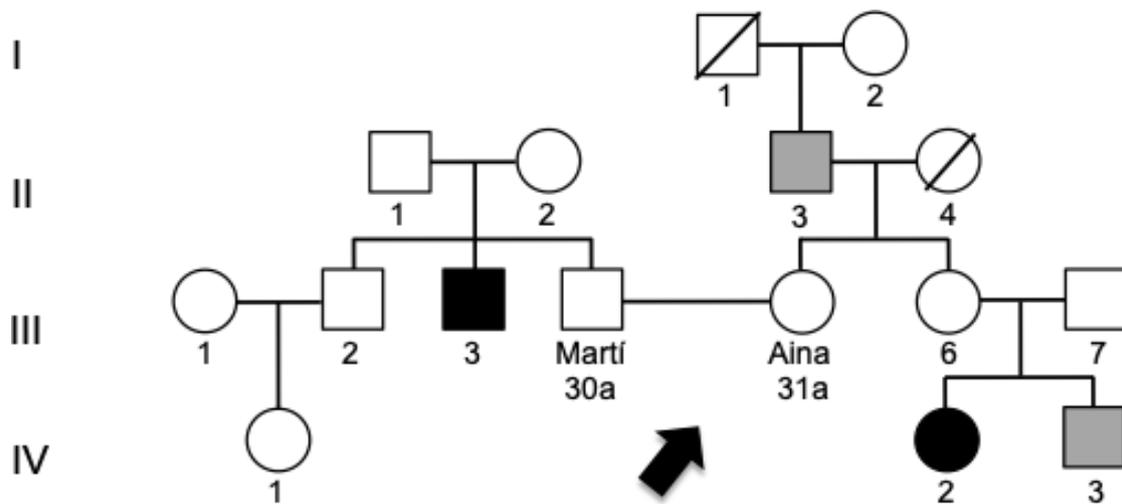


Práctica para realizar en el laboratorio

**Estos materiales didácticos son para uso docente y de investigación.  
Queda prohibida su comercialización o modificación.**

## 1. Caso clínico: ¿eres asesor/a genético/a!

Imagina que eres asesor/a genético/a del Servicio de Genética del Hospital Vall de Hebron y vienen a la consulta en Martí (III.4) y Aina (III.5), una pareja de 30 y 31 años, respectivamente. El motivo por el que acuden a la consulta es que se están planteando tener hijos, pero están preocupados por sus antecedentes familiares. Te explican que tanto el hermano de Martí (III.3) como la sobrina de Aina (IV.2) sufren **anemia falciforme**. En cuanto al resto de la familia, todos están aparentemente sanos por parte de Martí, mientras que por la rama familiar de Aina, su padre (II.3) y su sobrino (IV.3) sufren daltonismo. Desgraciadamente, la madre de Aina (I.4) murió de un accidente de coche dos años atrás. A continuación, se muestra el árbol genealógico que hemos podido dibujar gracias a la información que nos han facilitado. **¿Cuál crees que es la pregunta clave que te harán Aina y en Martí a tu consulta como asesor/a genético?**



Completa el recuadro con la que crees que puede ser la pregunta clave:

## 2. Objectivos

---

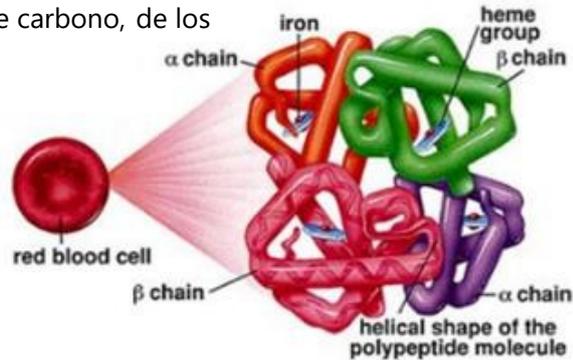
Los objetivos de esta práctica son los siguientes:

- a) Familiarizarse con la anemia falciforme y las hemoglobinopatías.
- b) Conocer el funcionamiento de la cromatografía.
- c) Relacionar los resultados de la cromatografía con el tipo de hemoglobina.
- d) Aprender el proceso que se podría llevar a cabo en una consulta de asesoramiento genético.



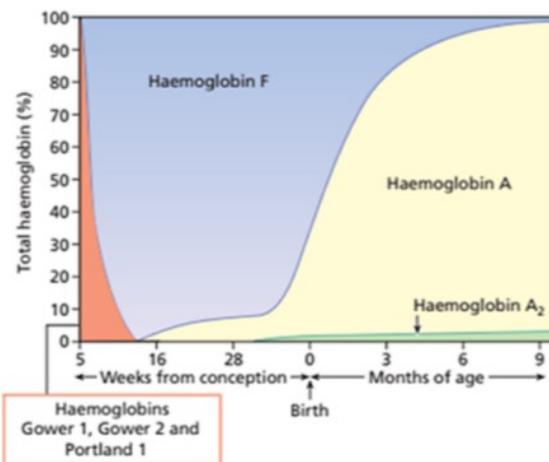
### 3. Hemoglobinopatías y anemia falciforme

En nuestra sangre, la proteína encargada de transportar el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, y el dióxido de carbono, de los tejidos en los pulmones es la **hemoglobina (Hb)**, que se encuentra dentro de los eritrocitos o glóbulos rojos. Su estructura consiste en cuatro cadenas polipeptídicas (globinas) donde se une un grupo hemo con un átomo de hierro que tiene capacidad de unión a una molécula de oxígeno.



Fuente: Hemoglobin Molecule. Structure and function of hemoglobin (<https://es.slideshare.net/asifzeb2/structure-and-function-of-hemoglobin/9>)

La combinación de estas cuatro subunidades permite la formación de diferentes tipos de Hb:



Fuente:

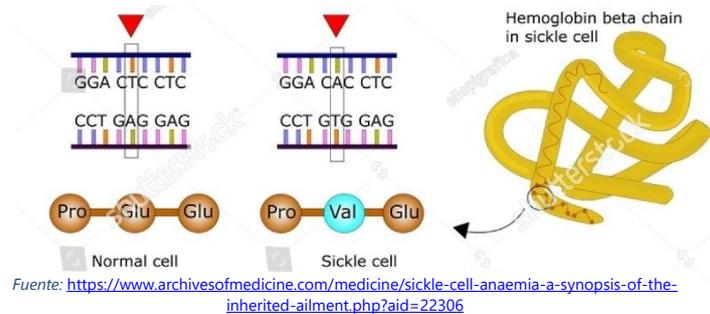
<https://www.seqc.es/download/tema/13/4413/803351306/2167177/cms/tema-5-diagnostico-diferencial-de-las-hemoglobinopatias.pdf/>

- Hemoglobina fetal (HbF): 2 cadenas  $\alpha$  y 2 cadenas  $\gamma$ . Mayoritaria durante la etapa de gestación y a partir de los 6 meses se reduce a solo a <1%.
- Hemoglobina normal (HbA): 2 cadenas  $\alpha$  y 2 cadenas  $\beta$ . Mayoritaria a partir de los 6 meses con unos valores de referencia alrededor del 85-98%.
- Hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>): 2 cadenas  $\alpha$  y 2 cadenas  $\delta$ . Se sintetiza en pocas cantidades desde el nacimiento y sigue siendo minoritaria (2,5-3,5%) el resto de la vida.

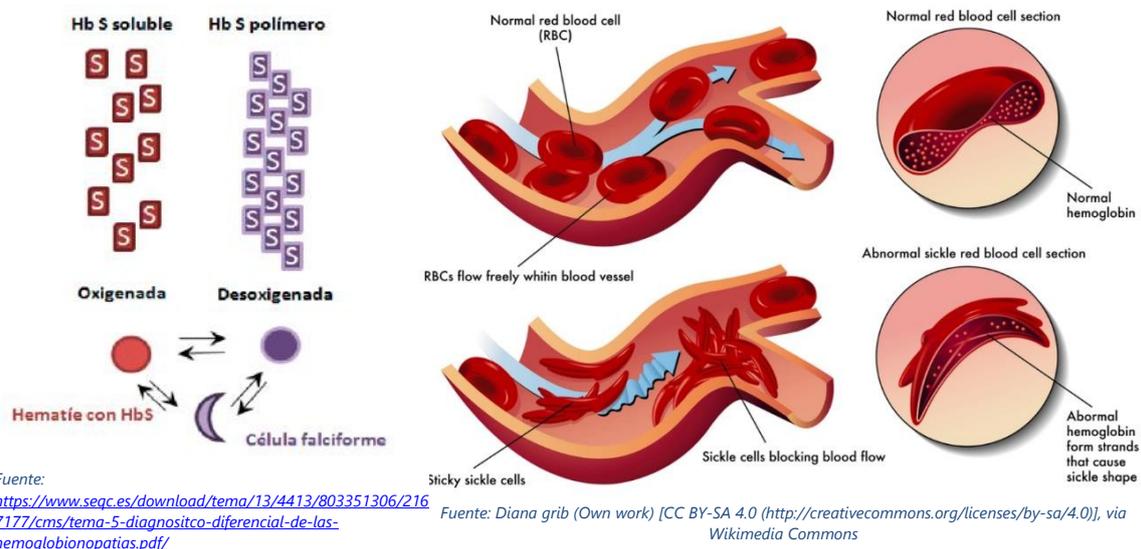
Las **hemoglobinopatías** son un grupo de enfermedades genéticas de herencia autosómica recesiva que afectan a las cadenas de globina de la molécula de Hb. Son las enfermedades monogénicas más frecuentes y aproximadamente el 7% de la población mundial es portadora de mutaciones genéticas causantes de hemoglobinopatías. Se estima que cada año nacen más de 500.000 neonatos afectados de hemoglobinopatías graves. Se caracterizan en dos grandes grupos: las talasemias y las hemoglobinas variantes o estructurales.

Las **talasemias** son causadas por mutaciones genéticas que afectan a los genes de las cadenas de globina produciendo una disminución o ausencia de la síntesis de una o más cadenas de globina (alteración cuantitativa). Esto provoca que se reduzca la formación de Hb haciendo que los glóbulos rojos sean de menor tamaño y con menor contenido de Hb. Las talasemias más comunes son la  $\alpha$  o  $\beta$ -talasemia, en las que la mutación genética afecta al gen de la  $\alpha$  o  $\beta$ -globina, respectivamente.

Se han descrito más de 1.200 variantes estructurales de la Hb, pero la hemoglobinopatía estructural más frecuente es la causada por la **hemoglobina S (HbS)**, que tiene una mayor incidencia en África, Oriente Medio, India y la cuenca del Mediterráneo. Resultado de una mutación en el gen de la  $\beta$ - globina (HBB), que consiste en un cambio de un solo nucleótido (A en vez de T) que comporta un cambio de aminoácido en la posición 6, de un ácido glutámico (GAG) a una valina (GTG) (**p.Glu6Val**).

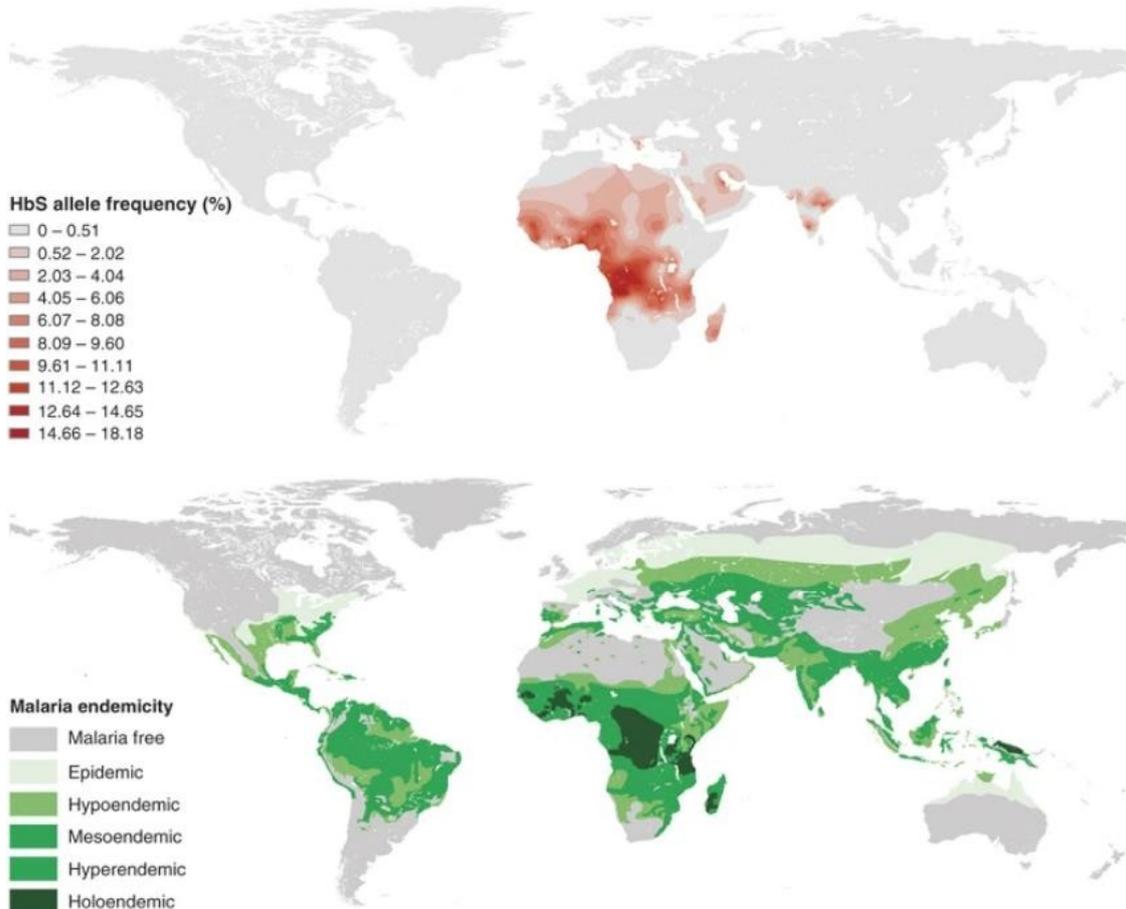


El cambio de aminoácido altera las características físico-químicas de la HbS, de forma que en situaciones de oxigenación la HbS es igual de soluble que la HbA, pero en ausencia de oxígeno la solubilidad de HbS disminuye haciendo que precipite en forma de polímeros. Estos se acumulan en el glóbulo rojo distorsionando su aspecto normal (bicóncavo) a una forma de media luna o falciforme. Ciclos repetidos de oxigenación y desoxigenación causan un daño irreversible en la forma de la célula. Además, se reduce su vida mediana de 90-120 días, hasta solo 10-20 días.



Las manifestaciones clínicas por la presencia de HbS se dan con el estado homocigoto (**HbSS**) causando la **anemia falciforme**. Así pues se trata de una enfermedad autosómica **recesiva** donde se necesitan ambas copias del gen con la mutación HBB: p.Glu6Val. Clínicamente, los pacientes empiezan a mostrar los síntomas durante el primer año de vida cuando disminuyen los niveles de HbF.

La anemia falciforme se caracteriza por acontecimientos vaso-oclusivos y anemia hemolítica crónica, que produce isquemia de los tejidos dando lugar a dolor agudo y crónico así como también daño interno en los órganos. También puede generar sepsis, accidentes cerebrovasculares o hipertensión pulmonar.



Font: [https://www.researchgate.net/figure/Global-distribution-of-the-sickle-cell-gene-Distribution-of-the-data-points-Red-dots\\_fig2\\_47661711](https://www.researchgate.net/figure/Global-distribution-of-the-sickle-cell-gene-Distribution-of-the-data-points-Red-dots_fig2_47661711)

Los individuos heterocigotos (**HbAS**) son portadores de una mutación en una de las dos copias del gen HBB y fenotípicamente presentan lo que se denomina **rasgo de células falciforme**. No presentan manifestaciones clínicas, pero el hecho de tener algunos glóbulos rojos con forma falciforme los protege de morir por malaria. Esto se atribuye probablemente al hecho de que tienen una vida media mucho más corta, de forma que el parásito causante de la malaria (*Plasmodium falciparum*) no puede completar su ciclo vital. Por este motivo, los heterocigotos por HbS son más frecuentes en África que en el resto del mundo, coincidiendo con el lugar donde hay más malaria.

## 4. Hipótesis y predicciones

---

Para poder solucionar el caso de Aina y Martí, nos tenemos que plantear unas cuantas preguntas. Responde de manera individual, y posteriormente, las pondremos en común con toda la clase.



**¿Cómo podríamos identificar los genotipos relacionados con la anemia falciforme?**

**¿Qué miembros de la familia se deberían analizar?**

## 5. Diseño del experimento

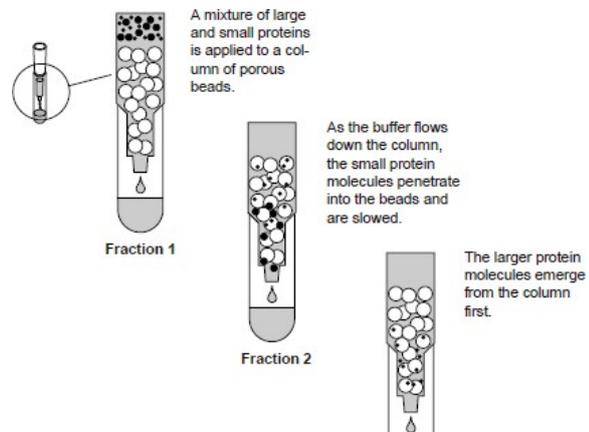
La mutación HBB: p.Glu6Val provoca un cambio en la solubilidad de la hemoglobina (Hb), pero también un cambio en el **tamaño**. La masa molar del ácido glutámico es 147,13 g/mol, mientras que la masa molar de la valina es 117,15 g/mol. Por tanto, la **HbA tendrá un peso superior a la HbS**. Además, como se trata de dos proteínas diferentes, tendrán un color ligeramente diferente. Mientras que la HbA tiene un color rojo oscuro, la HbS es de un tono más rosado.



Aprovechando la diferencia de tamaño entre ambas hemoglobinas, usaremos la técnica de la cromatografía para separarlas. Utilizaremos el **Kit de Cromatografía de exclusión por tamaño** de Bio-Rad (<https://www.bio-rad.com/es-es/product/size-exclusion-chromatography-kit?ID=7d8fb923-21a1-44ab-9077-a81c022cd6e8>).

A partir de la extracción de sangre de los individuos que queremos estudiar, y tras haber preparado estas muestras de manera adecuada y del todo segura para su manipulación en el laboratorio, realizaremos una cromatografía de exclusión por tamaño. Es una técnica que consiste en dos fases:

- Fase móvil: solvente con moléculas a separar
- Fase estacionaria: columna con una matriz porosa



Fuente: PowerPoint Presentation for Educational Use de la página del producto de Bio-Rad.

Los poros de la matriz actúan como trampas para las moléculas más pequeñas, que se quedan atrapadas en estos poros, mientras que las moléculas más grandes pasan de largo y son recogidas fuera de la columna. Al aplicar el buffer y recoger las diferentes fracciones, las moléculas más grandes saldrán primero de la columna, y más tarde las más pequeñas.

**¿Qué resultados esperas obtener en función del tipo de hemoglobina y por qué?**

## 6. Lista de material necesario

---

El material necesario para llevar a cabo esta práctica se encuentra casi en su totalidad incluido en el kit de Cromatografía de exclusión por tamaño, a excepción de los elementos señalados con un asterisco. Este material es suficiente para 8 grupos de estudiantes.

- Muestra (Sample)
- Tubos de recogida (collection tubas)
- Columnas Poly-Prep
- Tapones por las columnas (column caps)
- Buffer por las columnas (column buffer)
- Pipeta (1 ml)
- Rotulador permanente\*
- Soporte para los tubos\*

Dividíos en parejas. Cada grupo tiene que tener: 12 tubos de colección, 1 columna Poly-Prep, 1 tapón para la columna, 1 pipeta, 1 rotulador permanente y 1 soporte.

El vial con las muestras y la botella del buffer es común para todos los estudiantes, de forma que el profesor os lo repartirá. Habrá dos muestras correspondientes a Aina y Martí; cada grupo tiene que analizar una de las dos muestras. Os tenéis que organizar de forma que en el conjunto de la clase como mínimo se analice una muestra de cada persona, y, siempre que sea posible, que haya duplicados.

## 7. Protocolo

---

En un paso más del proceso, imagina que eres un/a técnico/a del laboratorio de Genética y te toca procesar las muestras. Una vez has preparado las muestras y te aseguras que tienes todo el material necesario, procede a abrir las instrucciones del kit y te encuentras que están en inglés. Como es un idioma que ya conoces, empiezas a leerlo y a realizar paso a paso el experimento:

[https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin\\_3056.pdf](https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin_3056.pdf)

## 8. Interpretación y comunicación de los resultados

A continuación, haremos una actividad en grupos de 4 que hayáis analizado muestras diferentes. Compartid vuestros resultados con el otro grupo y completad el cuadro siguiente:

	<b>Muestra de Aina</b>	<b>Muestra de Martí</b>
<b>Resultado</b>		
<b>Genotipo deducido</b>		

Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, imaginemos que estamos en la consulta de asesoramiento genético, acuden Aina y Martí para saber los resultados y aclarar algunas dudas. Por eso, os hacen las siguientes preguntas:

<b>¿Qué probabilidad tenemos de tener un hijo afecto de anemia falciforme? ¿Cómo habéis calculado este dato?</b>
<b>¿Nos podéis explicar la técnica que habéis utilizado? ¿Es fiable?</b>

Elaborad un guion de cómo sería la conversación en esta consulta y preparad una teatralización para representarla ante los compañeros.