

Diagnòstic d'anèmia falciforme

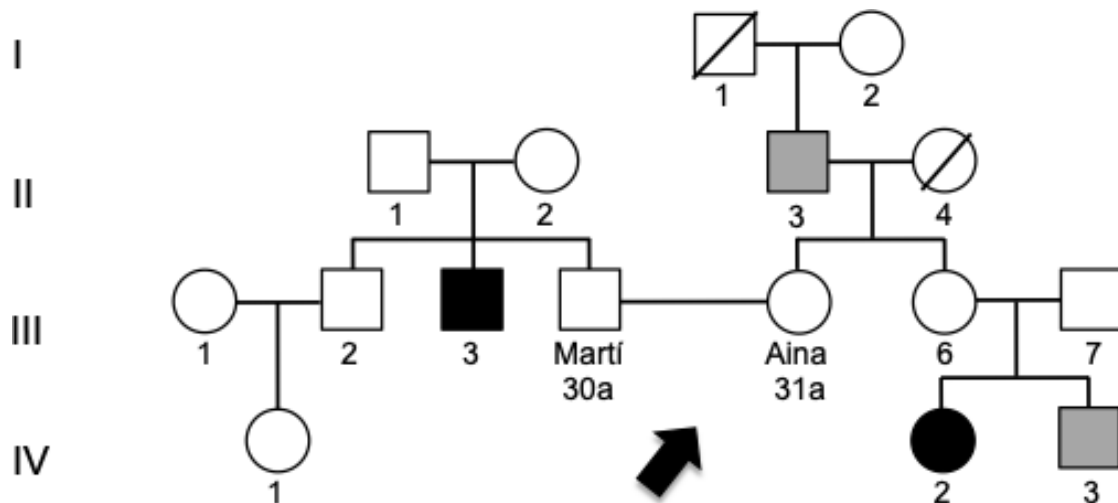


Pràctica per fer al laboratori

**Aquests materials didàctics són per a ús docent i d'investigació.
Resta prohibida la seva comercialització o modificació.**

1. Cas clínic: ets assessor/a genètic!

Imagina que ets assessor/a genètic del Servei de Genètica de l'Hospital Vall d'Hebron i venen a la consulta en Martí (III.4) i l'Aina (III.5), una parella de 30 i 31 anys, respectivament. El motiu pel qual venen a la consulta és que s'estan plantejant tenir fills, però estan preocupats pels seus antecedents familiars. T'expliquen que tant el germà del Martí (III.3) com la neboda de l'Aina (IV.2) pateixen **anèmia falciforme**. Pel que fa a la resta de la família, tots són aparentment sans per part del Martí, mentre que per la branca familiar de l'Aina el seu pare (II.3) i el seu nebot (IV.3) pateixen daltonisme. Malauradament, la mare de l'Aina (I.4) va morir d'un accident de cotxe dos anys enrere. A continuació, es mostra l'arbre genealògic que hem pogut dibuixar gràcies a la informació que ens han facilitat. **Quina creus que és la pregunta clau que et faran l'Aina i en Martí a la teva consulta com a assessor/a genètic?**



Omple el requadre amb la que creus que pot ser la pregunta clau:

2. Objectius

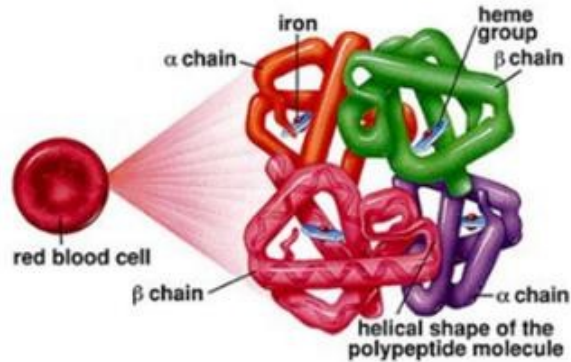
Els objectius d'aquesta pràctica són els següents:

- a) Familiaritzar-se amb l'anèmia falciforme i les hemoglobinopaties.
- b) Conèixer el funcionament de la cromatografia.
- c) Relacionar els resultats de la cromatografia amb el tipus d'hemoglobina.
- d) Aprendre el procés que es podria dur a terme en una consulta d'assessorament genètic.

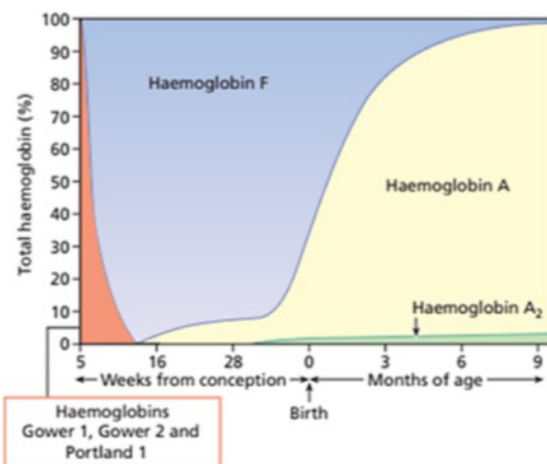


3. Hemoglobinopaties i anèmia falciforme

A la nostra sang, la proteïna encarregada de transportar l'oxigen des dels òrgans respiratoris fins als teixits, i el diòxid de carboni, dels teixits als pulmons, és l'**hemoglobina (Hb)**, la qual es troba dins dels eritròcits o glòbuls vermells. La seva estructura consisteix en quatre cadenes polipeptídiques (globines) on s'uneix un grup hemo amb un àtom de ferro que té capacitat d'unió a una molècula d'oxigen. La combinació d'aquestes quatre subunitats, permet la formació de diferents tipus d'Hb:



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



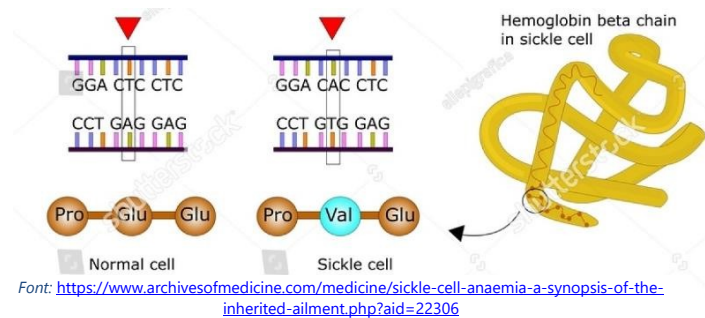
Font: <https://www.seqc.es/download/tema/13/4413/803351306/2167177/cms/tema-5-diagnositco-diferencial-de-las-hemoglobinopatas.pdf/>

- Hemoglobina fetal (HbF): 2 cadenes α i 2 cadenes γ . Majoritària durant l'etapa de gestació i a partir dels 6 mesos es redueix a només a <1%.
- Hemoglobina normal (HbA): 2 cadenes α i 2 cadenes β . Majoritària a partir dels 6 mesos amb uns valors de referència al voltant del 85-98%.
- Hemoglobina A₂ (HbA₂): 2 cadenes α i 2 cadenes δ . Es sintetitza en poques quantitats des del naixement, i segueix sent minoritària (2,5-3,5%) la resta de la vida.

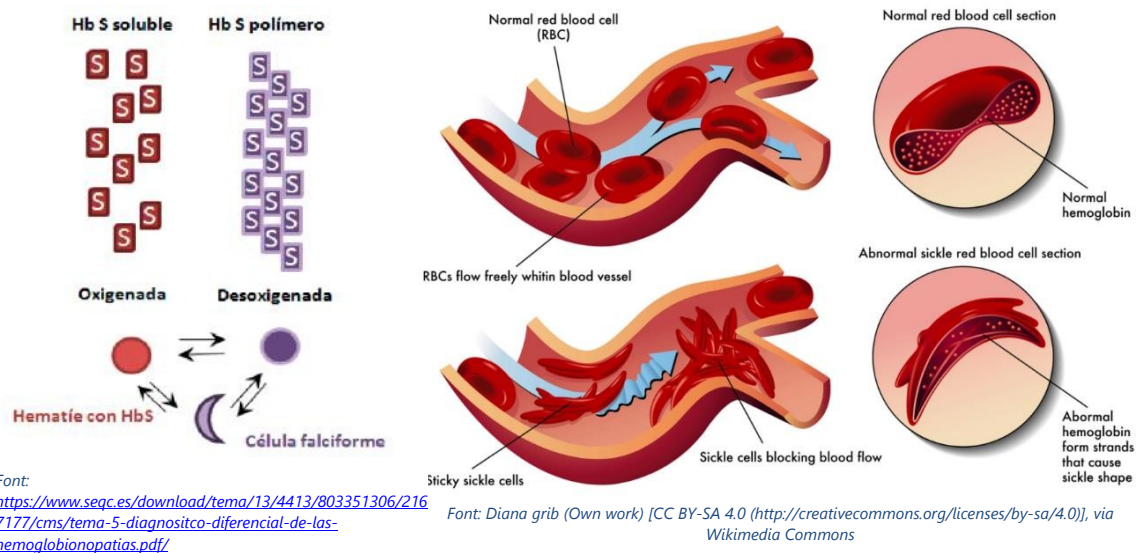
Les **hemoglobinopaties** són un grup de malalties genètiques d'herència autosòmica recessiva que afecten les cadenes de globina de la molècula d'Hb. Són les malalties monogèniques més freqüents i aproximadament el 7% de la població mundial és portador de mutacions genètiques causants d'hemoglobinopaties. S'estima que cada any neixen més de 500.000 nats afectes d'hemoglobinopaties greus. Es caracteritzen en dos grans grups: les talassèmies i les hemoglobines variants o estructurals.

Les **talassèmies** són causades per mutacions genètiques que afecten als gens de les cadenes de globina produint una disminució o absència de la síntesis d'una o més cadenes de globina (alteració quantitativa). Això provoca que es redueixi la formació d'Hb fent que els glòbuls vermells siguin de menor mida i amb menor contingut d'Hb. Les talassèmies més comuns són l' α o β -talassèmia, en les quals la mutació genètica afecta al gen de la α o β -globina, respectivament.

S'han descrit més de 1200 variants estructurals de l'Hb, però l'hemoglobinopatia estructural més freqüent és la causada per l'**hemoglobina S** (HbS), la qual té una major incidència a Àfrica, Orient Mig, Índia i la conca del Mediterrani. Resultat d'una mutació en el gen de la β -globina (*HBB*), la qual consisteix en un canvi d'un sol nucleòtid (A en comptes de T) que comporta un canvi d'aminoàcid en la posició 6, d'un àcid glutàmic (GAG) a una valina (GTG) (**p.Glu6Val**).



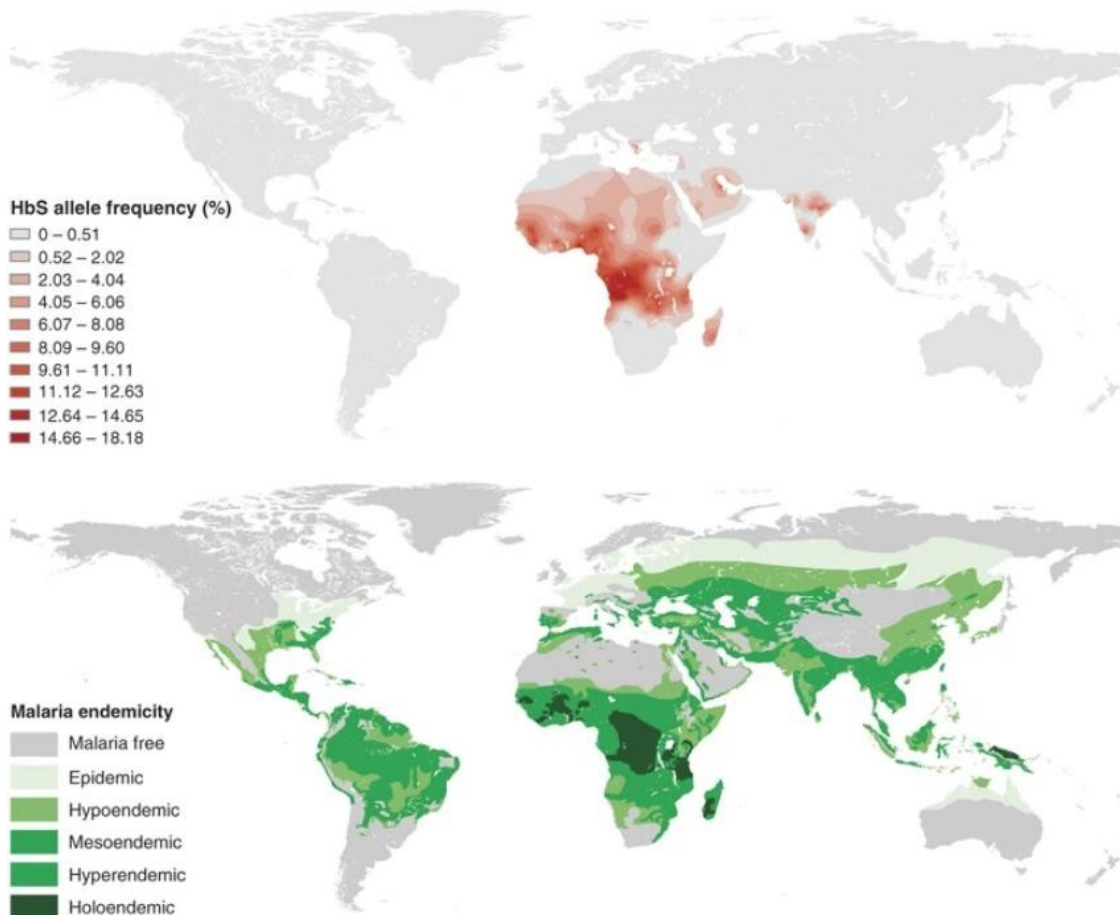
El canvi d'aminoàcid altera les característiques fisicoquímiques de l'HbS, de manera que en situacions d'oxigenació l'HbS és igual de soluble que l'HbA, però en absència d'oxigen la solubilitat d'HbS disminueix fent que precipiti en forma de polímers. Aquests s'acumulen en el glòbul vermell distorsionant el seu aspecte normal (bicòncav) a una forma de mitja lluna o falciforme. Cicles repetits d'oxigenació i desoxigenació causen un dany irreversible a la forma de la cèl·lula. A més, es redueix la seva vida mitjana de 90-120 dies, fins a només 10-20 dies.



Les manifestacions clíniques per la presència d'HbS es donen amb l'estat homozigot (**HbSS**) causant l'**anèmia falciforme**. Així doncs es tracta d'una malaltia autosòmica **recessiva** on es necessiten ambdues còpies del gen amb la mutació HBB: p.Glu6Val. Clínicament, els pacients comencen a mostrar els símptomes durant el primer any de vida quan disminueixen els nivells d'HbF.

L'anèmia falciforme es caracteritza per esdeveniments vaso-oclusius i anèmia hemolítica crònica, el qual produeix isquèmia dels teixits donant lloc a dolor agut i crònic així com també dany intern als òrgans. També pot generar sepsis, accidents cerebrovasculars o hipertensió pulmonar.

Els individus heterozigots (**HbAS**) són portadors d'una mutació en una de les dues còpies del gen HBB i fenotípicament presenten el que s'anomena **tret de cèl·lules falciforme**. No presenten manifestacions clíniques, però el fet de tenir alguns glòbuls vermells amb forma falciforme els protegeix de morir per malària. Això s'atribueix probablement al fet que tenen una vida mitjana molt més curta, de manera que el paràsit causant de la malària (*Plasmodium falciparum*) no pot completar el seu cicle vital. Per aquest motiu, els heterozigots per HbS són molt freqüents a l'Àfrica que a la resta del món, coincidint amb el lloc on hi ha més malària.



Font: https://www.researchgate.net/figure/Global-distribution-of-the-sickle-cell-gene-Distribution-of-the-data-points-Red-dots_fig2_47661711

4. Hipòtesis i prediccions

Per poder solucionar el cas de l'Aina i el Martí, ens hem de plantejar unes quantes preguntes. Responen de manera individual, i posteriorment, les posarem en comú amb tota la classe.



Com podríem identificar els genotips relacionats amb l'anèmia falciforme?
Quins membres de la família s'haurien d'analitzar?

5. Disseny de l'experiment

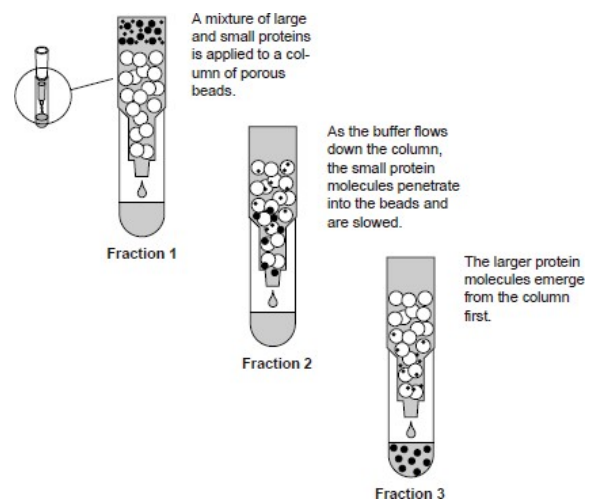
La mutació HBB: p.Glu6Val provoca un canvi en la solubilitat de l'hemoglobina (Hb), però també un canvi en la **mida**. La massa molar de l'àcid glutàmic és 147,13 g/mol, mentre que la massa molar de la valina és 117,15 g/mol. Per tant, l'**HbA tindrà un pes superior a la HbS**. A més, com es tracta de dues proteïnes diferents, tindran un color lleugerament diferent. Mentre que l'HbA té un color vermell fosc, l'HbS és d'un to més rosat.



Aprofitant la diferència de mida entre ambdues hemoglobines, farem servir la tècnica de la cromatografia per separar-les. Utilitzarem el **Kit de Cromatografia d'exclusió per mida** de Bio-Rad (<https://www.bio-rad.com/es-es/product/size-exclusion-chromatography-kit?ID=7d8fb923-21a1-44ab-9077-a81c022cd6e8>).

A partir de l'extracció de sang dels individus que volem estudiar, i després d'haver preparat aquestes mostres de manera adequada i del tot segura per a la seva manipulació al laboratori, realitzarem una cromatografia d'exclusió per mida. És una tècnica que consisteix en dues fases:

- Fase mòbil: solvent amb molècules a separar
- Fase estacionària: columna amb una matriu porosa



Font: PowerPoint Presentation for Educational Use de la pàgina del producte de Bio-Rad.

Els porus de la matriu actuen com trampes per a les molècules més petites, les quals es queden atrapades en aquests porus, mentre que les molècules més grans passen de llarg i són recollides fora de la columna. A l'aplicar el buffer i recollir les diferents fraccions, les molècules més grans sortiran primer de la columna, i més tard les més petites.

Quins resultats esperes obtenir en funció del tipus d'hemoglobina i per què?

6. Llistat de material necessari

El material necessari per dur a terme aquesta pràctica es troba gairebé en la seva totalitat inclòs en el kit de Cromatografia d'exclusió per mida, a excepció dels elements assenyalats amb un asterisc. Aquest material és suficient per a 8 grups d'estudiants.

- Mostra (Sample)
- Tubs de recollida (collection tubes)
- Columnes Poly-Prep
- Taps per les columnes (column caps)
- Buffer per les columnes (column buffer)
- Pipeta (1 ml)
- Retolador permanent*
- Suport pels tubs*

Dividiu-vos en parelles. A cada grup ha de tenir: 12 tubs de col·lecció, 1 columna Poly-Prep, 1 tap per a la columna, 1 pipeta, 1 retolador permanent i 1 suport.

El vial amb les mostres i l'ampolla del buffer és comú per a tots els estudiants, de manera que el professor us ho repartirà. Hi haurà dues mostres corresponents a l'Aina i el Martí, cada grup ha de analitzar una de les dues mostres. Us heu d'organitzar de manera que en el conjunt de la classe com a mínim s'analitzi una mostra de cada persona, i sempre que sigui possible que hi hagi duplicats.

7. Protocol

En un pas més del procés, imagina que ets un tècnic del laboratori de Genètica i et toca processar les mostres. Un cop has preparat les mostres i t'assegures que tens tot el material necessari, procedeixes a obrir les instruccions del kit i et trobes que estan en anglès. Com és un idioma que ja coneixes comences a llegir-ho i a fer pas a pas l'experiment:

https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin_3056.pdf

8. Interpretació i comunicació dels resultats

A continuació, farem una activitat en grups de 4 que hagueu analitzat mostres diferents. Compartiu els vostres resultats amb l'altre grup i completeu el quadre següent:

	Mostra de l'Aina	Mostra d'en Martí
Resultat		
Genotip deduït		

Un cop finalitzat el treball de laboratori, imaginem que estem a la consulta d'assessorament genètic, venen l'Aina i en Martí per saber els resultats i aclarir alguns dubtes. Per això, us fan les següents preguntes:

Quina probabilitat tenim de tenir un fill afecte d'anèmia falciforme? Com heu calculat aquesta dada?
Ens podeu explicar la tècnica que heu utilitzat? És fiable?

Elaboreu un guió de com seria la conversa en aquesta consulta i prepareu una teatralització per representar-ho davant dels companys.