

Herència i anèmia falciforme



Guia docent

**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!

El primer que es farà es presentar el cas clínic de l'Aina i en Martí, el qual ens acompanyarà al llarg de tota l'activitat. Repartir el document titulat "**Teoria_Part1_AnemiaDaltonisme.pdf**". Un voluntari pot llegir el cas clínic en veu alta, i a continuació es responen tres preguntes individualment i/o en grup.

Imagina que ets assessor/a genètic del Servei de Genètica de l'Hospital Vall d'Hebron i venen a la consulta l'Aina i en Martí, una parella de 31 i 30 anys, respectivament. El motiu pel qual venen a la consulta és que s'estan plantejant tenir fills, però estan preocupats pels seus antecedents familiars. Per part d'en Martí, t'expliquen que té 2 germans, un dels quals pateix **anèmia falciforme**. L'altra germà té parella i una filla sana. Els seus pares també són aparentment sans. Per part de l'Aina, et diuen que el seu pare té **daltonisme** i que malauradament la seva mare va morir d'un accident de cotxe farà uns anys. L'àvia paterna encara és viva, i és aparentment sana. A més, l'Aina té una germana que ha tingut 2 fills, la filla petita afecta d'anèmia falciforme i el fill gran amb daltonisme. Per tant, tant el germà del Martí com la neboda de l'Aina pateixen anèmia falciforme, mentre que el pare i el nebot de l'Aina tenen daltonisme.

Respon les tres preguntes següents primer individualment, i després en grup.

Han fet bé d'anar a un Servei de Genètica? Per què?

Sí que han fet bé d'anar a un Servei de Genètica, perquè podran avaluar el cas concret de la seva família, així com explicar-los el risc de recurrència d'aquestes dues malalties (daltonisme i anèmia falciforme) i les diverses opcions disponibles.

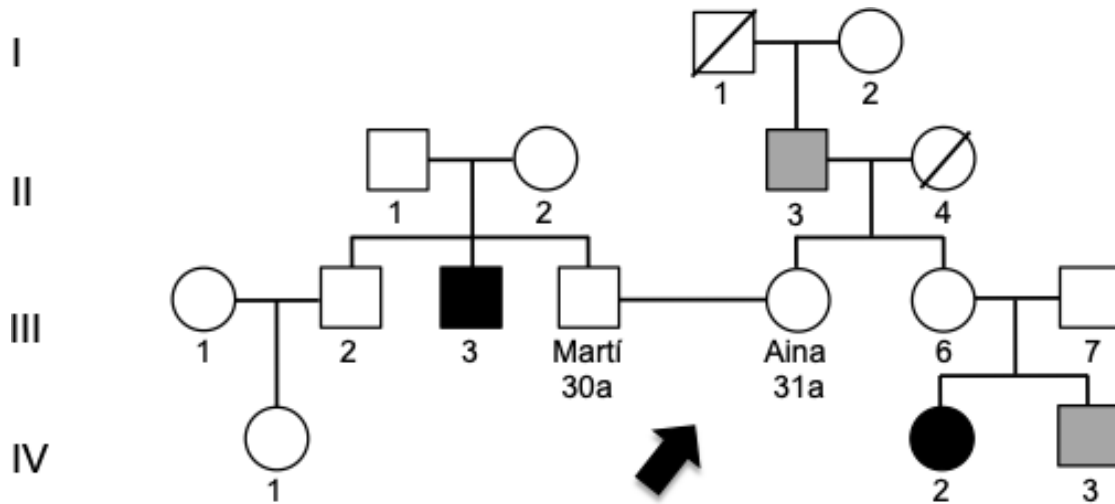
Com sabem que es tracta d'una malaltia hereditària?

Perquè es pot observar que hi ha diversos membres de la família afectats per aquestes malalties. Tot i així, s'haurien de dur a terme proves genètiques per tal de comprovar que es tracta d'una malaltia hereditària.

Quin és el paper d'un assessor/a genètic?

Un assessor/a genètic s'encarrega de donar informació sobre la malaltia, les proves genètiques i les opcions disponibles, recull la història mèdica i familiar; calcula el risc de recurrència i/o ocurrència; ajuda a prendre decisions tenint en compte el risc, les opcions disponibles i els principis ètics i/o religiosos; comunica els resultats de proves genètiques, en cas que s'hagin realitzat; i finalment, és un suport psicològic i emocional per a la família durant tot el procés.

A continuació, s'aprofundirà en la construcció d'un pedigrí. S'explicarà la nomenclatura que s'utilitza per crear aquests arbres genealògics i es deixarà un temps per a que construeixin ells mateixos l'arbre de la família.



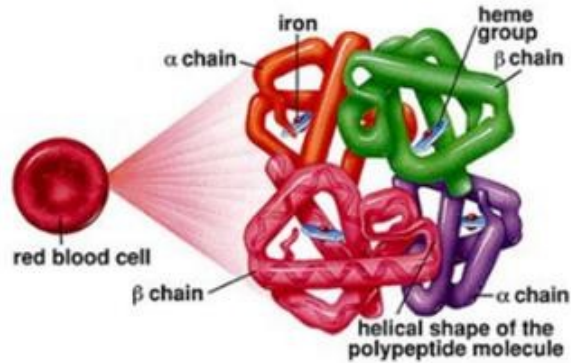
2. Com podem saber el tipus d'herència?

En aquesta secció de l'activitat es repartiran 4 casos clínics ("Teoria_Part2_CasosClínic.pdf"), un per grup i es deixarà una estona per a la seva resolució. Finalment, una persona de cada grup explicarà els resultats en veu alta, i cada grup haurà d'omplir el quadre final mostrat a continuació:

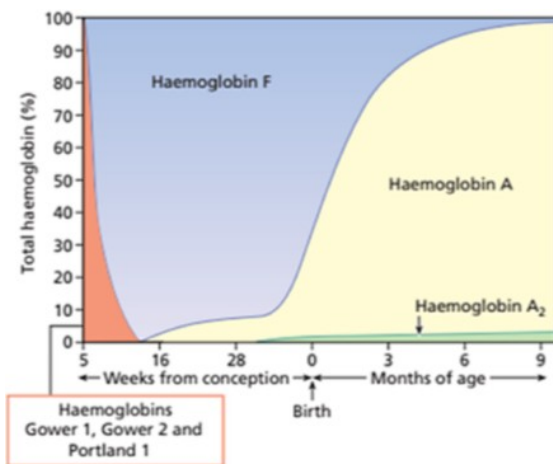
	Malaltia	Tipus d'herència	Càlcul de probabilitat que s'ha plantejat
Cas 1	Càncer de mama	Autosòmica dominant	Probabilitat de que Angelina Jolie hagués tingut 2 germans/es més i els dos haguessin heretat la mutació a <i>BRCA1</i> : $\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$
Cas 2	Malaltia de Günther	Autosòmica recessiva	Probabilitat de que els individus II.1 i II.2 tinguin dos descendents més, ambdós afectes per malaltia de Günther: $\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$
Cas 3	Acondroplàsia	Autosòmica dominant	Probabilitat que en Tyrion Lannister tingui dos descendents afectes amb una parella d'estatura normal: $\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$
Cas 4	Adreno-leucodistròfia	Lligada al X recessiva	Probabilitat que en Lorenzo hagués tingut un germà afecte: $\frac{1}{4}$ (si ja sabem que és nen es podria dir $\frac{1}{2}$) Probabilitat que en Lorenzo hagués tingut una germana afectada: 0

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>)



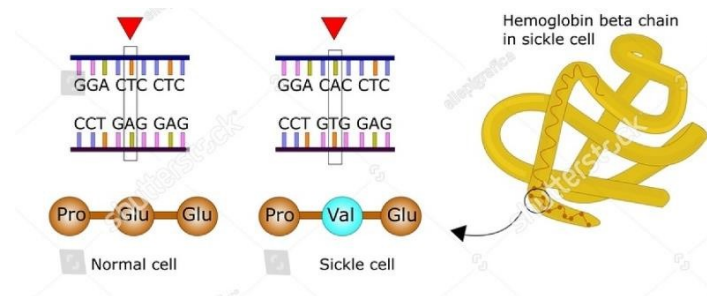
Font: <https://www.seqc.es/download/tema/13/4413/803351306/2167177/cms/tema-5-diagnostico-diferencial-de-las-hemoglobinopatas.pdf/>

- 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.

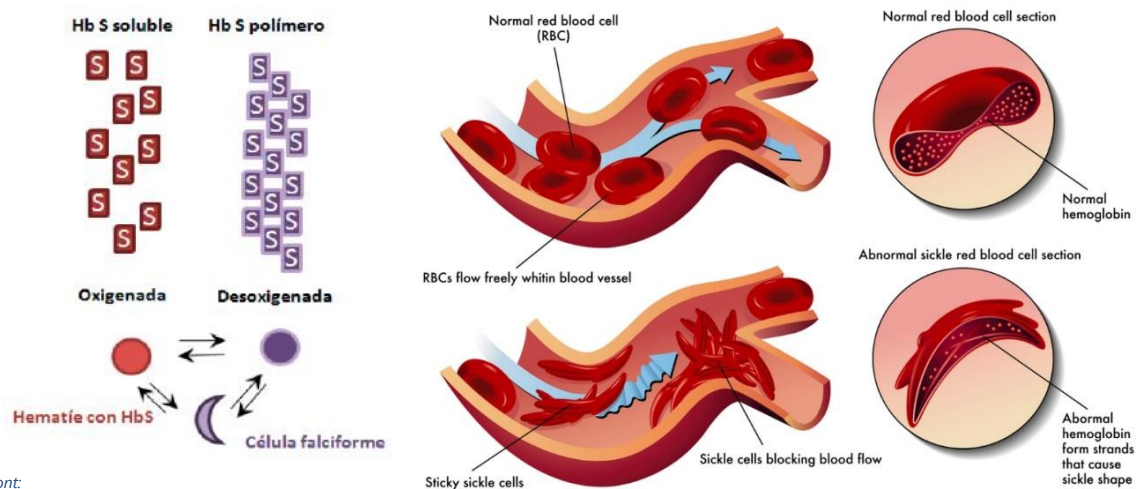
Les **talassèmies** són causades per mutacions genètiques que afecten als gens de les cadenes de globina produint una disminució o absència de la síntesis d'una o més cadenes de globina (alteració quantitativa). Això provoca que es redueixi la formació d'Hb fent que els glòbuls vermells siguin de menor mida i amb menor contingut d'Hb. Les talassèmies més comunssón 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**).



Font: <https://www.archivesofmedicine.com/medicine/sickle-cell-anaemia-a-synopsis-of-the-inherited-ailment.php?aid=22306>

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.



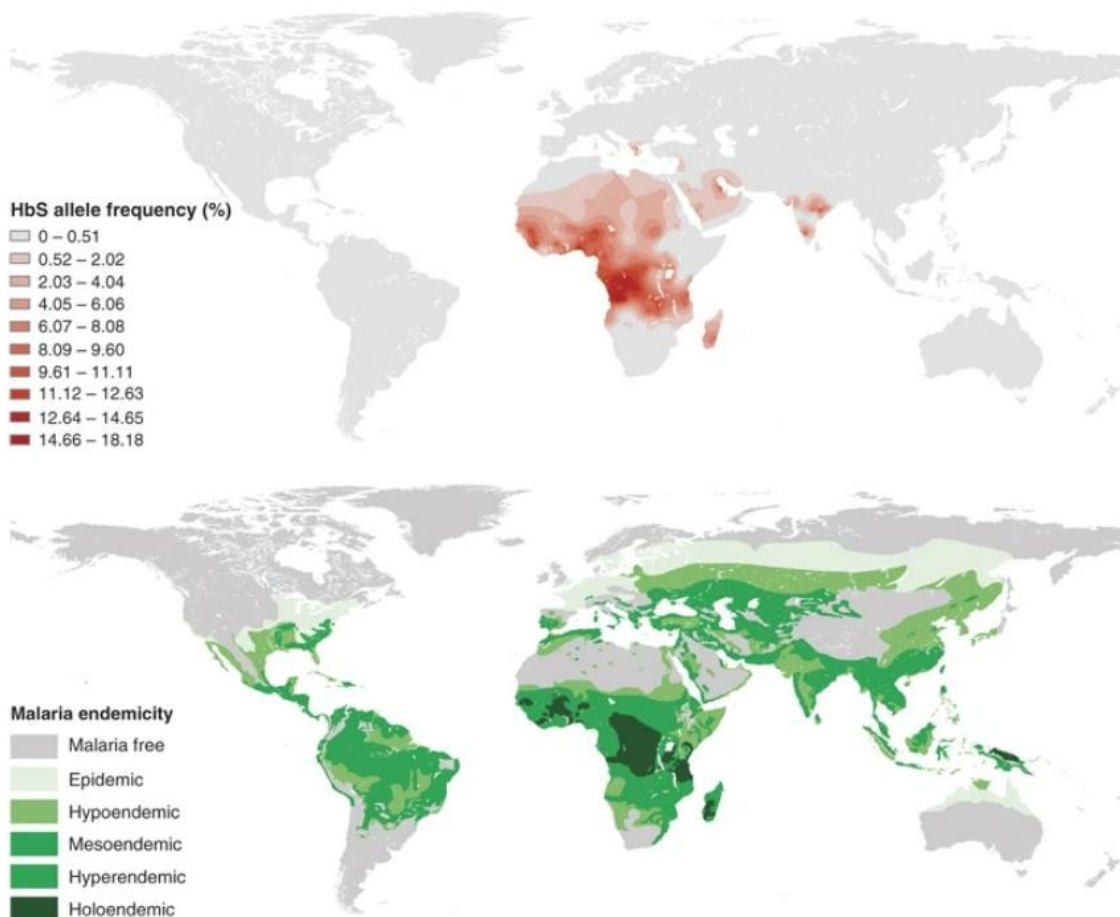
Font: <https://www.seqc.es/download/tema/13/4413/803351306/2167177/cms/tema-5-diagnostico-diferencial-de-las-hemoglobinopatias.pdf/>

Font: Diana grib (Own work) [CC BY-SA 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)], via Wikimedia Commons

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 sepsi, 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

La única cura per l'anèmia falciforme és el transplantament de medul·la òssia o cèl·lules mare. Tot i així, actualment els únics tractaments que existeixen són per ajudar a millorar els símptomes, disminuir les complicacions i prolongar la vida. De fet, a la dècada dels 70 l'esperança de vida no superava els 14 anys, mentre que actualment la majoria de gent amb anèmia falciforme viu passats els 40 anys.

4. Bioètica: acord/desacord

En aquesta part final de la classe de teoria, es realitzarà una activitat d'acord/desacord amb temàtica de bioètica. Hi ha dos grans blocs temàtics: assegurances privades de salut familiar i *La decisió de Anne*. Es tracta de generar un debat ètic amb tota la classe. El professor actuarà de moderador.

A) Assegurances privades de salut familiar

Als EUA, algunes asseguradores privades de salut familiar, donada l'alta freqüència de l'al·lel HbAS, a la població afroamericana els hi demanen una mostra de sang per fer suposadament un anàlisi bioquímic, però en realitat també extreuen DNA (dels leucòcits) per tal de detectar mutacions en el gen HBB i excloure les persones amb el tret de cèl·lules falciformes. Una situació semblant es podria donar a Catalunya amb les talassèmies, les quals són molt freqüents al Mediterrani.

- Estàs d'acord amb que les asseguradores discriminin pel genotip? Per què?
- Les asseguradores sanitàries no deixen de ser empreses que han de vetllar pel seu benefici. Per tant, no poden acollir a tothom. Hi estàs d'acord? Per què?
- Les asseguradores sanitàries no haurien de discriminar a ningú, però donat que són empreses haurien de poder cobrar quotes diferents dependent del genotip de les persones. Hi estàs d'acord? Per què?

B) *La decisió de Anne (My sister's keeper)*

La família Fitzgerald té una filla de dos anys, la Kate, a qui diagnostiquen leucèmia promielocítica aguda. Com que ni ells dos ni el germà gran són compatibles amb la Kate, per tal de salvar-li la vida decideixen tenir una filla genèticament compatible, l'Anne.

- Esteu d'acord en que una parella engendri un descendent compatible per salvar la seva filla de dos anys? Per què?
- Després de néixer, l'Anne, s'haurà de sotmetre a diverses intervencions per tal de donar a la seva germana sang, òrgans i teixits compatibles. Anys després, haurà salvat a la seva germana a costa d'hospitalitzacions i medicacions contínues. Esteu d'acord amb el que han fet els pares? Per què?
- Quan la Kate té 15 anys pateix una insuficiència renal, la qual requerirà el transplantament d'un ronyó de l'Anne. Davant d'aquesta situació, l'Anne se n'adona que la qualitat de la seva vida es pot veure afectada i decideix demandar judicialment als seus pares en busca de l'emancipació mèdica. Esteu d'acord amb la decisió de l'Anne? Per què?

5. Cas clínic: ets assessor/a genètic!

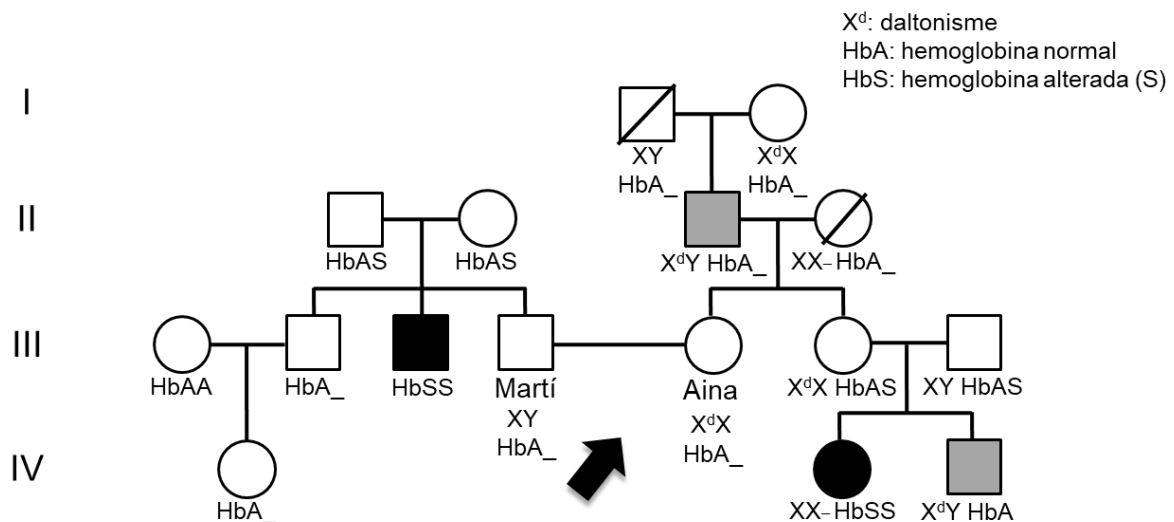
Tornem al cas clínic que s'ha explicat a l'inici de la classe teòrica.

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:

Quina probabilitat tenim de tenir un fill afecte d'anèmia falciforme?

Els alumnes tindran l'arbre familiar en el guió de pràctiques, però sense els genotips de cada membre de la família. **Quin és el genotip de la família de l'Aina i en Martí?**



Càlcul de risc empíric: quina és la probabilitat de tenir un fill afecte per anèmia falciforme?
 $2/3 \cdot 1/2 \cdot 1/4 = 1/12$

6. 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.



A continuació els alumnes tindran un resum de l'explicació feta sobre les hemoglobinopaties i l'anèmia falciforme al mateix guió, per si necessiten recordar alguna informació.

7. Hipòtesis i prediccions

Per poder solucionar el cas de l'Aina i el Martí, els alumnes s'han de plantejar unes quantes preguntes. Han de respondre de manera individual, i posteriorment, es posaran en comú amb tota la classe.



Com podríem identificar els genotips relacionats amb l'anèmia falciforme?

Escollir les propostes dels alumnes.

Possibles respostes:

- *Analitzar la sang per observar eritròcits en forma de falç*
- *Analitzar el DNA: com? Seqüenciació, buscar la mutació causant de l'anèmia falciforme.*
- ...

Quins membres de la família s'haurien d'analitzar?

Per respondre la pregunta de la pràctica, només caldria analitzar l'Aina i en Martí. Tot i així, com que la informació genètica no té una implicació individual, sinó familiar, podria ser beneficiós analitzar altres membres de la família com els germans/es de la parella. A més, tenir aquesta informació per un futur també podrà ser útil.

8. Disseny de l'experiment

ATENCIÓ: El professor o la professora ha de saber que en aquesta pràctica **NO** estarem separant HbA i HbS, sinó hemoglobina i vitamina B12. Es tracta d'una simulació per tal que entenguin com es duria a terme aquest procés. La diferència de mida entre aquestes dues proteïnes és molt petita per poder-les separar amb aquest kit d'exclusió per mida, i en realitat s'utilitza una cromatografia molt específica que separa per càrrega elèctrica. Aquesta informació no se'ls hi ha de donar fins que hagin acabat la pràctica.

Altres consideracions:

- 15 minuts abans de començar la pràctica el professor/a ha de rehidratar la mostra (Protein Mixture) amb 0,5 ml d'aigua destil·lada. Barrejar suaument diverses vegades i mantenir en fred (gel o nevera) fins a l'inici de l'experiment.
- Als alumnes se'ls dirà que analitzaran una mostra corresponent a l'Aina i una altra corresponent a en Martí, però en realitat es tracta de la mateixa mostra que ve amb el kit (Protein mixture/sample), la qual s'ha de separar en dos tubs i retolar prèviament a l'inici de la pràctica.

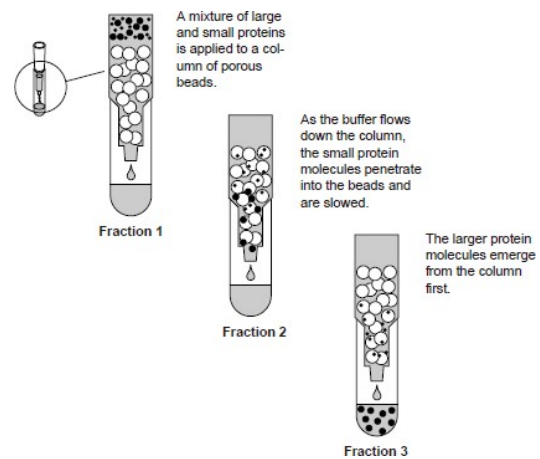
La mutació HBB: p.Glu6Val provoca un canvi en la solubilitat de l'hemoglobina (Hb), però també un canvi en la **mida**. La massa molar de l'àcid glutàmic és 147,13 g/mol, mentre que la massa molar de la valina és 117,15 g/mol. Per tant, l'**HbA tindrà un pes superior a l'HbS**. A més, com es tracta de 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 les dues 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 consisteixen 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?

Tenint en compte que la hemoglobina A és més gran que la hemoglobina S, esperariem que la hemoglobina A surti en les primeres fraccions (color vermell fosc), mentre que la hemoglobina S al ser més petita i quedar-se atrapada en els porus de la matriu, surti en les fraccions més tardanes (color rosat).

9. 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*

Els estudiants es dividiran en parelles. 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/a serà l'encarregat de repartir-ho. Hi haurà dues mostres corresponents a l'Aina i el Martí, cada grup ha de analitzar una de les dues mostres. S'han 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 hi hagi duplicats.

10. Protocol

En aquesta part se'ls dirà que imaginin que són tècnics del laboratori de Genètica i els hi toca processar les mostres. Un cop hagin preparat les mostres i s'hagin assegurat que tenen tot el material necessari, poden llegir les instruccions del kit que estan en anglès i que us podeu descarregar al següent enllaç:

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

11. 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	<i>Fraccions amb colors diferents (vermell marronós i rosa), indicant que presenten els dos tipus d'Hb. Poden indicar els números exactes de fraccions amb cada tipus d'hemoglobina.</i>	
Genotip deduït	<i>HbAS</i>	<i>HbAS</i>

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

Quina probabilitat tenim de tenir un fill afecte d'anèmia falciforme? Com heu calculat aquesta dada?

Si sabem, gràcies a l'experiment dut a terme, que tant l'Aina com en Martí són portadors d'anèmia falciforme amb genotip HbAS, la probabilitat que tenen de tenir un fill afecte és $\frac{1}{4}$ perquè el fill haurà d'heretar ambdós al·lels mutats per patir la malaltia.

Ens podeu explicar la tècnica que heu utilitzat? És fiable?

La tècnica utilitzada en aquesta pràctica és una cromatografia d'exclusió per mida, el qual vol dir que separa les molècules en funció de la mida. En aquest cas, hem separat HbA i HbS perquè l'HbA (en realitat hemoglobina) al ser més gran sortirà en les primeres fraccions, mentre que l'HbS (en realitat vitamina B12) quedarà a les fraccions finals.

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