

Diagnóstico molecular neonatal de la mutación $\beta 6$ Glu \rightarrow Val del gen de la β -Globina (Hb S) a partir del DNA extraído de micromuestras de sangre en soporte de papel*

M. García Vitoria¹, C. Aulesa Martínez¹, S. Bullich Marín¹, J. M. Tusell Puigbert², G. Javier³, R. Galimany Solé¹

Resumen

El empleo de técnicas de biología molecular para el estudio de hemoglobinopatías permite realizar una detección precoz, segura y rápida de estas alteraciones. Una de estas hemoglobinas anómalas, la S, debida a una mutación en el gen de la β -globina, es una anomalía hereditaria de claro predominio en la raza negra y que en nuestro medio era poco frecuente hasta la llegada de la inmigración procedente del África Central. Una detección temprana de la misma en individuos homocigotos permite iniciar un tratamiento profiláctico de las infecciones desde los primeros meses de vida. El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar una técnica para el diagnóstico molecular neonatal de esta mutación. Para ello hemos empleado sangre total en filtros de papel de neonatos de raza negra que previamente por HPLC habían sido clasificados como normales o como portadores del gen falciforme pero dudosos entre homocigotos y heterocigotos. En primer lugar hemos realizado la microextracción de DNA genómico de la sangre en filtros de papel, seguido de una amplificación por PCR del gen de la β -globina y posterior digestión con la enzima de restricción Dde I. Tras ajustar las condiciones óptimas de cada una de las técnicas hemos obtenido un fragmento de 381 pb en individuos homocigotos, en lugar de los fragmentos de 201 y 180 pb que aparecen en un individuo normal, mientras que en heterocigotos encontramos los tres fragmentos. Con este protocolo precisamos de un reducido volumen de sangre, estudiamos directamente la mutación y al simplificar la PCR respecto a otros protocolos y ser una técnica no radiactiva, disponemos de una herramienta muy útil para el diagnóstico neonatal de esta patología.

Palabras clave: hemoglobina S, diagnóstico molecular neonatal, PCR, filtros de papel.

Introducción

La aplicación de técnicas de biología molecular para el estudio de hemoglobinopatías permite realizar una detección precoz, segura y rápida de estas alteraciones. Una de estas hemoglobi-

Summary

The use of molecular genetic techniques for study of hemoglobinopathies allows a early, sure and rapid diagnosis of these genetic diseases. One of these abnormal hemoglobines, the S, caused by a mutation in the β -globin gene, is a genetic disorder very common in the black population, which was unusual in our area until the arrival of Central-African immigration. An early detection of this mutation in homozygous individuals allows a prophylactic treatment of the infections to begin from the first months of life. The objective of this work is to develop a technique for neonatal molecular genetic diagnosis of this mutation. We have used whole blood spots in filter paper blotters from black newborns that have previously been classified, by HPLC, as normal or carriers for the sickle gene but doubted between that of homozygous and heterozygous. First, we have made the DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters, followed by amplification by PCR of the β -globin gene and finally a digestion of each PCR product with the restriction enzyme Dde I. After applying these techniques, we have obtained a fragment of 381 bp in homozygous individuals, instead of two fragments of 201 and 180 bp in normal individuals, whereas we have found the three bands in heterozygous. With the use of this molecular technique only a small amount of blood is needed to make a direct DNA diagnosis and how we simplify this technique, which is a non-radiative technique, in relation to others authors, we have a very useful tool to neonatal diagnosis of this genetic disorder.

nas (Hb) anómalas, la S (mutación en el codón para el sexto aminoácido de la subunidad β de la Hb), es una anomalía hereditaria de claro predominio en la raza negra y que en nuestro medio era poco frecuente hasta la llegada de la inmigración procedente sobre todo del Magreb y de países subsaharianos como Gambia y Senegal (1, 2). Una detección temprana de la

*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Cáceres el 3, 4 y 5 de octubre de 2001.

¹Laboratoris Clínics.

²Departamento Hematología Pediátrica. Hospital «Vall d'Hebron». Barcelona.

³Departamento Pediatría. Hospital Universitari «Germans Trias i Pujol». Badalona (Barcelona).

Abreviaturas no estandarizadas:

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

DNA: ácido desoxirribonucleico

PCR: reacción en cadena por la polimerasa

pb: pares de bases

misma en individuos homocigotos (SS) para el gen falciforme (gen mutado) permite la instauración precoz de medidas profilácticas que reducen considerablemente la morbilidad y la mortalidad (10 % en la primera década, concentrada en los 3 primeros años) (3, 4). El objetivo de este trabajo ha sido adaptar una técnica descrita por Monk y Holding (5) para el diagnóstico molecular de esta mutación, pero que ellos aplicaron para estudios de fecundación *in vitro* y nosotros la hemos empleado para diagnóstico neonatal de esta mutación partiendo de DNA extraído de sangre en filtros de papel.

Material y métodos

Se recogieron 2 mL de sangre, en tubos con EDTA, de neonatos de raza negra que el departamento de Anemias del Hospital «Vall d'Hebron» (Barcelona) había estudiado por HPLC y había clasificado como normales o como portadores del gen falciforme pero no podía determinar su condición de homocigotos u heterocigotos en el momento del nacimiento. A estos niños, al margen de nuestro estudio, se les hizo el seguimiento habitual y se les repitió la determinación por HPLC entre los 2-4 meses de edad para poder determinar si eran homocigotos u heterocigotos. De cada neonato se impregnaron 3 papeles de filtro (Schleider & Schuell 903, 8 mm; Schleider & Schuell, Dassel, Alemania) con unos 40 µL de sangre por filtro.

Se aplicaron las siguientes técnicas:

1. *Microextracción de DNA genómico* de sangre total utilizando el kit QIAamp® Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) incubando previamente 3 filtros por individuo en 300 µL de agua destilada durante 24 h a temperatura ambiente y pasando directamente a la incubación con la proteinasa K (Qiagen, Hilden, Alemania). La elución se hizo en 100 µL de solución amortiguadora de elución.

2. *Amplificación por PCR* de la secuencia del gen de la β-globina de 721 pb (Figura 1) según el protocolo de Monk y Holding (5) pero modificado. Amplificación de 50 µL del DNA extraído con 100 pmol de cada cebador (Ecogen, Barcelona, España) (secuencia de los cebadores en figura 1), 25 mM de nucleótidos (Ecogen, Barcelona, España), 12,5 mM Cl₂Mg (Ecogen, Barcelona, España) y 5 UI de la enzima de amplificación Ecotaq (Ecogen, Barcelona, España) para una mezcla de reacción de 100 µL en un termociclador Gene Cycler™ (Bio Rad, Madrid, España). El control negativo se preparó con agua destilada en lugar de DNA. Se realizaron 35 ciclos de amplificación (94°C 1min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) y posteriormente 10 min a 72°C. 24 µL de cada producto de PCR fue mezclado con 2 µl de azul de bromofenol (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y se aplicó a un gel de agarosa al 2 % que contenía 2 µg/mL de bromuro de etidio y se realizó la electroforesis a 120 V durante 30 min. Posteriormente fue fotografiado bajo luz ultravioleta.

3. *Digestión* de 40 µL de cada producto de PCR con 5 unidades de la enzima de restricción *Dde* I (cat. n° 835307; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y 5 µL del tampón de restricción de la enzima durante 3 h a 37 °C. Posteriormente se realizó la electroforesis de los 50 µL de cada producto de digestión en un gel de agarosa al 3 % que contenía 2 µg/mL de bromuro de etidio a 120 V durante 70 min. El gel fue fotografiado después bajo luz ultravioleta. Se utilizó DNA φX174 digerido con *Hae* III (cat. n.º 1449460 Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) como marcador de peso molecular de DNA.

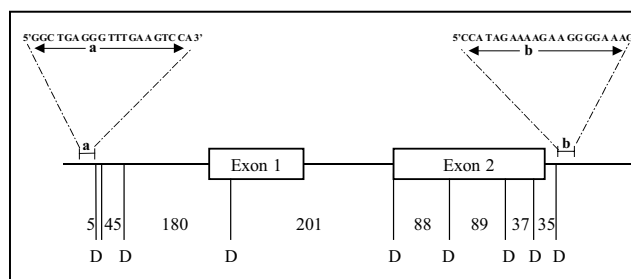


Figura 1. Secuencia de cebadores (a y b), puntos de corte de la enzima *Dde* I (D) y tamaño de los fragmentos digeridos en la secuencia del gen de la β-globina amplificado por PCR.

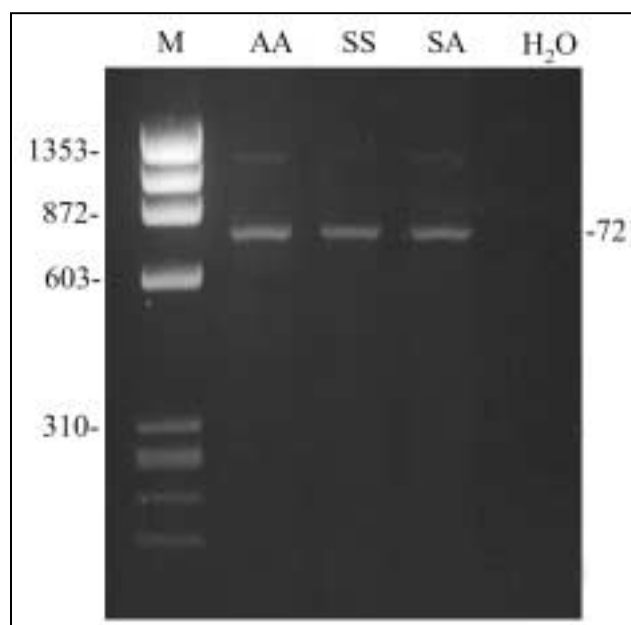


Figura 2. Producto de amplificación de la PCR de 721 pb en todos los individuos: normal (AA), homocigoto (SS) y heterocigoto (SA) para el gen falciforme. Control negativo (H₂O). Marcador φX174 digerido con *Hae* III (M).

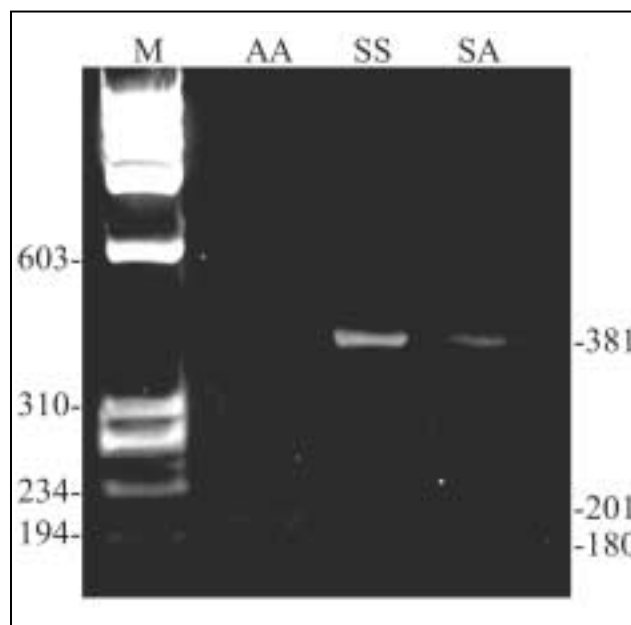


Figura 3. Productos de la digestión con *Dde* I del producto de PCR. Se observan dos fragmentos de 180 y 201 pb en un individuo normal (AA), un único fragmento de 381 pb en un homocigoto (SS) y los tres fragmentos en un individuo heterocigoto (SA) para el gen falciforme. Marcador φX174 digerido con *Hae* III (M).

Resultados

La región del gen de la β -globina amplificada, la secuencia del par de cebadores usados, así como el tamaño de los fragmentos obtenidos tras la digestión con la enzima *Dde* I vienen descritos en la figura 1.

Los resultados obtenidos tras la amplificación por PCR del DNA extraído de los distintos tipos de neonatos se muestran en la figura 2, observándose un fragmento de 721 pb en todos ellos.

Los fragmentos resultantes de la digestión con la enzima *Dde* I de los productos de PCR se muestran en la figura 3. Bandas del tamaño esperado se producen en los tres tipos de neonatos. La mutación puntual que origina la Hb S elimina el punto de corte de la enzima *Dde* I en el exón 1 (Figura 1) produciendo un fragmento de 381 pb en lugar de los dos fragmentos de 201 y 180 pb que se producen en un gen normal, por lo tanto un individuo heterocigoto (AS) presentará los tres fragmentos, dado que tiene un gen normal y otro mutado, mientras que uno homocigoto (SS) sólo presentará el de 381 pb y uno normal (AA) los dos fragmentos de 201 y 180 pb.

Discusión

El análisis molecular de DNA extraído de sangre en filtros de papel tiene cada vez más aplicaciones en el cribado neonatal (6, 7 y 8), y es que las ventajas de muestras de sangre en este medio de soporte son varias: la simplicidad a la hora de obtener las muestras, el poco volumen requerido, la facilidad de transporte y la estabilidad, entre otras.

En el período neonatal hay una elevada proporción de Hb fetal y una baja proporción de Hb adulta. Debido a que la expresión del gen falciforme permanece baja en este período, el estado de portador heterocigoto (SA) frente a homocigoto (SS), cuando se estudia con técnicas que analizan directamente los distintos tipos de Hb como es el caso de la técnica HPLC, permanece dudoso hasta que no se analizan nuevas muestras entre los 2-4 meses de edad (9). Este problema se puede resolver estudiando directamente el DNA de neonatos. La técnica de biología molecular que se emplea es el método basado en una PCR seguida de una hibridación con sondas de oligonucleótidos alelo-específicas marcadas radiactivamente (9) o no radiactivamente (10). Nosotros proponemos un método no radiactivo basado también en la PCR pero seguido de una digestión enzimática que es un proceso más sencillo que una hibridación. Este método fue aplicado por Monk y Holding (5)

para detectar el alelo falciforme en estudios de fecundación *in vitro* a partir de DNA extraído de oocitos y cuerpos polares humanos y nosotros lo hemos adaptado a nuestro DNA extraído de sangre de neonatos en filtros de papel. Para ello hemos tenido que ajustar las condiciones tanto de la extracción de DNA, como de la PCR y de la digestión, y hemos conseguido adaptar la PCR empleando un solo par de cebadores en lugar de los dos pares utilizados por Monk y Holding, lo cual simplifica y abarata la técnica.

Por lo tanto disponemos de una técnica que requiere poco volumen de sangre, que es independiente de que el gen esté más o menos expresado y es rápida, segura y sencilla de aplicar siendo muy útil para el diagnóstico neonatal de la hemoglobinopatía S.

Correspondencia:
Montserrat García Vitoria
Avda. Diagonal 297 6º-4º. 08013
Barcelona
e-mail: mvitoria@hg.vhebron.es

Bibliografía

1. Balanzó X, Fernández-Roura JLI, Cabot A. Desenvolupament d'una unitat d'atenció sanitària per a minories ètniques en un Hospital rural bàsic. VI Reunió anual Societat de Salut Pública de Catalunya i Balears, 16-17 octubre 1992, Barcelona.
2. Cabot, A. Problemes de salut en fills d'immigrants africans. Immigració negra d'origen centre-africa. *Pediatr Catalana* 1996;56: 6-10.
3. Lee A, Thomas P, Cupidore L, Serjeant B, Serjeant G. Improved survival in homozygous sickle cell disease: lessons from a cohort study. *BJM* 1995; 311: 1600-1602.
4. Gray A, Anionwu EN, Davies SC, Brozovic M. Patterns of mortality in sickle cell disease in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1991; 44: 459-463.
5. Monk M, Holding C. Amplification of a b-haemoglobin sequence in individual human oocytes and polar bodies. *Lancet* 1990; 335: 985-988.
6. McCabe ERB, Huang SZ, Seltzer WK, Law ML. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening. *Human Genetics* 1987; 75: 213-216.
7. McCabe ERB, Huang SZ, Descartes M, Zhang YH, Fenwick RG. DNA from Guthrie spots for diagnosis of DMD by multiplex PCR. *Biochem Med Metab Biol* 1990; 44: 294-295.
8. Seltzer WK, Accurso F, Fall MZ, Van Riper AJ, Descartes M, Huang Y, et al. Screening for cystic fibrosis: feasibility of molecular genetic diagnosis of dried blood specimens. *Biochem Med Metab Biol* 1991; 46: 105-109.
9. Jinks DC, Minter M, Tarver DA, Vanderford M, Hejtmancik JF, McCabe ERB. Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening. *Human Genetics* 1989; 81: 363-366.
10. Saiki RK, Chang CA, Leveson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH JR et al. Diagnosis of sickle cell anemia and b-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988; 319: 537-541.