

“IMPLEMENTACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA LA MEJORA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS CORPUSCULARES”.

Proyecto presentado por: Rafael Andrés del Orbe Barreto (especialidad Hematología)

Grupo de Investigación: Cáncer Hematológico

Jefe de grupo: Juan Carlos García Ruíz

Tutora: Beatriz Arrizabalaga Amutxastegi

Las anemias hemolíticas de causa corpuscular constituyen un grupo heterogéneo de entidades raras, caracterizadas por un acortamiento en la vida media del hematíe en sangre periférica o por un aumento de la apoptosis intramedular por eritropoyesis ineficaz. La mayoría de estas anemias congénitas de carácter hereditario y el hematíe presenta características estructurales o funcionales alteradas. Tienen en común una alteración en la morfología del eritrocito y una fragilidad osmótica aumentada.

Los eritrocitos son elementos celulares altamente especializados en el transporte de oxígeno, por lo cual su estructura está notablemente simplificada para el desarrollo de dicha función. Su membrana presenta características únicas en cuanto a deformabilidad para atravesar los capilares hasta 10 veces más estrechos que su diámetro, y su citoplasma carente de núcleo consta de un reducido metabolismo enzimático para mantener la integridad funcional de la hemoglobina (Hb).

Las anemias corpusculares pueden ser debidas a alteraciones en la síntesis de hemoglobina, del sistema enzimático o a alteraciones en la composición de la membrana. En éste grupo también se incluyen otras entidades como la Hemoglobinuria paroxística nocturna y el Síndrome hemolítico urémico atípico, en donde existen alteraciones genéticas que predisponen al eritrocito a la hemólisis mediada por el sistema del complemento

La clínica de esta enfermedad es de intensidad variable, hay tres manifestaciones del síndrome hemolítico crónico –anemia, esplenomegalia e ictericia. Las formas moderadas son las más frecuentes y generalmente se detectan en el curso de los primeros años de vida. Presentan la tríada diagnóstica y, ocasionalmente, pueden requerir alguna transfusión. Hay formas graves, que aunque son menos frecuentes presentan hemólisis intensa y requerimiento de transfusiones y pueden tener complicaciones muy severas.

Aproximadamente el 50% de los pacientes con formas moderadas y todos los afectados por formas graves presentan hiperbilirrubinemia en el período neonatal. En este período no siempre el examen morfológico y las pruebas de fragilidad osmótica son concluyentes, por lo que es preciso un seguimiento de todos los neonatos con hiperbilirrubinemia y anemia de etiología no inmune.

En el curso de la enfermedad, los pacientes pueden presentar crisis de anemia intensa, que pueden ser de tres tipos: hemolíticas, que suelen seguir a infecciones generalmente virales; aplásicas, que pueden llegar a ser muy intensas y megaloblásticas.

El tratamiento de soporte consiste en la administración continuada de ácido fólico y de transfusiones de concentrados de hematíes en fases de anemia extrema. La esplenectomía produce la curación clínica de la enfermedad, pero también requiere la valoración de las posibles complicaciones. Sus beneficios deben contrapesarse con los riesgos de producir sepsis fatales. En algunos casos el tratamiento es el trasplante alogénico.

El diagnóstico morfológico y bioquímico de las anemias hemolíticas corpusculares, se lleva a cabo en muchos laboratorios asistenciales de hematología, sin embargo en ocasiones puede ser muy complejo, sobre todo en aquellos casos transfusión-dependientes. El estudio de las membranopatías y la dosificación enzimática se hace difícil en pacientes transfundidos, además existen condiciones subyacentes que pueden modificar los resultados, tales como la presencia de reticulocitos e incompatibilidad ABO materno-fetal.

Un diagnóstico acertado y a tiempo es de suma importancia, sobre todo por los efectos deletéreos de la hiperbilirrubinemia en el recién nacido, la cual capaz de ocasionar daño neurológico irreversible (Kernicterus), así como también de la sobrecarga férrica en aquellos pacientes que presentan dependencia transfusional, tanto como en los que no reciben transfusiones de manera periódica, debido al efecto de los bajos niveles de hepcidina que

favorece la absorción intestinal de hierro y su consecuente acumulación en el hígado, así como en otros órganos vitales.

En muchos de éstos casos la única posibilidad curativa es el trasplante alogénico de médula ósea, aunque recientemente investigaciones apuntan a la inminente aplicación de terapia génica, por lo que el diagnóstico genético es una necesidad en ésta situación.

Además en la actualidad en España no se cuenta con un centro de referencia para el diagnóstico genético de las anemias hemolíticas de origen corpuscular, lo que obliga a remitir las muestras para dichos estudios a otros países, conllevando un incremento de los costes y retraso en la obtención de resultados.

Por estas razones consideramos que implementar un método diagnóstico novedoso, eficaz, rápido y coste-competitivo, como lo es la identificación de mutaciones por medio de secuenciación masiva será un avance en el manejo de ésta patología.

El desarrollo en los últimos años de las denominadas tecnologías de secuenciación masiva (NGS) permite actualmente obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a un coste cada vez más reducido. Estas tecnologías están permitiendo la consecución de logros científicos trascendentales, con la identificación de nuevos genes y la resolución de las bases genéticas de enfermedades mendelianas a la cabeza. Su potencial ha permitido el desarrollo de nuevas aplicaciones y pruebas biológicas que van a revolucionar, en un futuro próximo, el diagnóstico postnatal y prenatal de enfermedades genéticas.

En estos momentos ya es factible resecuenciar masivamente un gran número de genes de un determinado paciente por un coste similar a lo que sería la secuencia de 2-3 genes por métodos convencionales. Además, debemos tener en cuenta, que la resolución que ofrece el empleo de la secuenciación masiva es muy superior al de los microarrays, ya que no se limita a las mutaciones conocidas. Se convierte en la tecnología más apropiada para diagnóstico de enfermedades con heterogeneidad génica, estudios de perfiles tumorales y su respuesta a fármacos y, por supuesto, para la identificación de nuevos genes asociados a enfermedades genéticas mediante la resecuenciación del Exoma completo.

Actualmente la mayoría de las aplicaciones de la secuenciación masiva están dirigidas a responder preguntas de investigación. No obstante la tecnología NGS promete ser muy relevante en la identificación de factores de susceptibilidad con finalidad preventiva, en estudios de farmacogenómica para determinar respuesta a fármacos y en la realización de pruebas genéticas para diagnóstico y evolución de las enfermedades.

En USA ya se han comunicado datos sobre la factibilidad del uso de NGS en el diagnóstico genético de anemias hemolíticas y su aplicabilidad en la práctica clínica diaria.

OBJETIVO GENERAL: Implementar una técnica diagnóstica genética basada en secuenciación masiva para la detección de mutaciones involucradas en la patogénesis de las anemias hemolíticas corpusculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Diseñar un panel de genes que permitan detectar por medio de secuenciación masiva mutaciones en los genes involucrados en la patogénesis de anemias hemolíticas corpusculares.
- Confirmar las mutaciones identificadas por medio de secuenciación directa por método Sanger como método de validación.
- Correlacionar las mutaciones identificadas en los diferentes pacientes con el diagnóstico clínico y basado en otras técnicas de laboratorio.