

Polimorfismos del gen de ankirina asociados a esferocitosis hereditaria

Ankyrin Gene Polymorphisms Associated with Hereditary Spherocytosis

Mariela Solano Vargas¹, Walter Rodríguez Romero^{1,2}

¹ Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA-UCR), Universidad de Costa Rica, Costa Rica

² Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica

Correspondencia: mariela.solanovargas@ucr.ac.cr

Recibido: 25/11/2020; aceptado para publicación: 05/04/2021.

Resumen

La esferocitosis hereditaria es la membranopatía más común a nivel mundial. Se caracteriza por una gran heterogeneidad clínica y genética que puede ser un reto a la hora del diagnóstico de pacientes asintomáticos o sin historia familiar previa. Se presenta en este estudio la determinación de dos polimorfismos genéticos del gen de la ankirina *G199A* y *NCOI* en pacientes, familiares y controles, con el fin de determinar su utilidad como marcadores genéticos. Los resultados obtenidos detallan una frecuencia alélica de más del 0.8 del alelo silvestre (*GG199*) en las tres poblaciones. Para *NCOI*, sí se presentó mayor frecuencia alélica del alelo mutado en los pacientes. Sin embargo, al realizar la comparación estadística para ambos polimorfismos, no se encontró suficiente evidencia estadística para establecer diferencias entre las poblaciones. Por tanto, para este estudio no se puede establecer la utilidad de estos polimorfismos como marcadores genéticos, aun así, se recomienda en futuras investigaciones aumentar el número de participantes en las poblaciones y aumentar el número de posibles marcadores genéticos utilizando otras herramientas, como las tecnologías de secuenciación de nueva generación. Todos los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio que sirven como apoyo diagnóstico de la esferocitosis hereditaria deben ser valorados dentro del contexto clínico del paciente.

Palabras clave

Ankirina, esferocitosis hereditaria, *NCOI*, *G199*

Abstract

Hereditary spherocytosis is the most common membranopathy worldwide. It is characterized for clinical and genetic heterogeneity. These features can result in a challenge for asymptomatic patients with negative familiar history. Determination of two genetic

polymorphisms of the Ankirin gene G199A and NCOI in patients, relatives and controls is presented in this study, in order to determine their usefulness as genetic markers. The results obtained show more than 0.8 of the wild type (GG199) allele in the 3 populations. For NCOI, there was a higher allele frequency of the mutated allele in the patients. However, when performing the comparison for both polymorphisms, insufficient statistical evidence was found to establish differences between the populations. Therefore, the usefulness of these polymorphisms as genetic markers cannot be established in this work. However, it is recommended in future research to increase the number of participants in the populations, and increase the number of possible genetic markers using other tools such as technologies of next-generation sequencing. All the results obtained in the laboratory tests that serve as diagnostic support for hereditary spherocytosis should be evaluated within the clinical context of the patient.

Keywords

Ankyrin, Hereditary Spherocytosis, NCOI, G199A

Introducción

Los eritrocitos deben ser capaces de llevar el oxígeno unido a la hemoglobina a todos los sitios del cuerpo. Para cumplir su función necesitan de un metabolismo eficiente durante su vida media y una membrana resistente y flexible que les permitan adentrarse incluso en los capilares más pequeños (1).

La membrana del glóbulo rojo se caracteriza por una bicapa lipídica y una red de proteínas que conforman el citoesqueleto que interactúan con proteínas integrales que le permiten mantener su forma de disco bicóncavo y flexibilidad (1). Existen defectos en los genes que codifican para las proteínas de membrana del eritrocito que pueden llevar a un grupo de entidades clínicas que se conocen como membranopatías. Entre estas se tiene la esferocitosis hereditaria.

Esferocitosis hereditaria (EH): Esta es la membranopatía más común con una prevalencia a nivel mundial de 1:2 000 (2,3); se estima, incluso mayor, si se utilizaran análisis

moleculares, esto debido a un número importante de personas asintomáticas o con una presentación leve de la enfermedad. Se ha descrito una herencia de tipo autosómica dominante en el 75% de los casos; también se han reportado pacientes con herencia autosómica recesiva, sin historia familiar positiva y mutaciones *de novo* (1).

Esta es una enfermedad heterogénea en el contexto genético y clínico. La presentación clínica clásica se comporta como una anemia hemolítica, regenerativa, con ictericia, anemia, parámetros bioquímicos elevados como bilirrubinas, deshidrogenasa láctica (DHL) y urobilinógeno (4). Algunas de sus complicaciones pueden llevar a esplenomegalia y por ende esplenectomías, transfusiones en anemia severa y cálculos biliares. No se debe olvidar que podría encontrarse hasta un 20-30% de pacientes asintomáticos con una esferocitosis leve y compensada (5).

En la EH se han identificado cinco genes principales asociados: *SPTA1*, *SPTB*, *ANK1*, *SLC4A1* y *EPB42*, los cuales codifican respectivamente para las proteínas de alfa espectrina, beta espectrina, ankirina, banda 3 y proteína 4.2 (6).

En el gen *ANK1* se han descrito más de 60 mutaciones asociadas a pacientes con la enfermedad, se ha reportado que los defectos en la ankirina son los responsables de aproximadamente el 50 % de los casos (6).

El diagnóstico clínico de la enfermedad se realiza mediante la evidencia de signos de hemólisis, de predominio extravascular, con prueba de Coombs directa negativa y con el apoyo de pruebas de tamizaje como la fragilidad osmótica y prueba rosada de lisis con glicerol (*pink test*), con sus modificaciones de incubación para aumentar la sensibilidad.

También se cuenta con la determinación por citometría de flujo de eosina meleimida (EMA) en donde los pacientes con deficiencias de proteínas de membrana presentan una disminución en la fluorescencia de este marcador (4).

Todas las pruebas presentan limitaciones y se ha recomendado hacerlas de manera conjunta para aumentar las probabilidades de llegar al diagnóstico certero. Con respecto a las pruebas moleculares, debido a la heterogeneidad genética, se ha considerado el uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación, sin embargo, su aplicación en la clínica no se ha considerado factible hasta el momento (2).

El presente trabajo pretende estudiar dos polimorfismos del gen *ANK1* con el propósito de valorar su utilidad como marcadores genéticos para la identificación de pacientes y portadores (familiares asintomáticos), con el fin de aumentar las herramientas de apoyo diagnóstico, en especial en aquellos casos en donde las pruebas de rutina no han podido esclarecer la etiología.

Materiales y métodos

Este es un estudio de tipo descriptivo y exploratorio. Para la convocatoria se utilizó la base de datos del CIHATA, los pacientes que decidieron participar fueron reclutados y firmaron el consentimiento informado aprobado por el Consejo Ético Científico (CEC) de la Universidad de Costa Rica.

Para el análisis genético se extrajo ADN genómico a partir de muestras de sangre total de pacientes previamente diagnosticados con EH (N=8) y sus familiares (N=12). El ADN

utilizado como control se obtuvo del banco de ADN del CIHATA de pacientes sin antecedentes de membranopatías o hemoglobinopatías (N=17).

A todas las muestras se le realizó la determinación de los polimorfismos *G199A* y *NCOI* del gen de la ankirina, según Camacho *et al.*, 2006, Eber *et al.*, 1996 y Gallagher *et al.*, 1992 (7-9). Para la visualización de los fragmentos de restricción se utilizó un gel de agarosa al 4%, a 100 v con un tiempo de corrida aproximado de una hora. Se utilizaron dos marcadores de peso molecular de 100 y 25 pb.

Para el análisis de datos se muestran las frecuencias de los polimorfismos en tres grupos (pacientes, familiares y controles); además, se realiza una prueba de Fisher para su comparación estadística.

Resultados

Se realizó el análisis de los polimorfismos *NCOI* y *G199A* del gen de ankirina, para las tres poblaciones de estudio. Sus resultados se muestran con detalle en valores absolutos en la figura 1. En el caso del polimorfismo *G199A* en su conformación silvestre (*GG199*), obtuvo mayor proporción de individuos, tanto para la población de pacientes, familiares, familiares y controles.

Para el polimorfismo *NCOI*, se observa un comportamiento diferente; en este, la mayor cantidad de individuos en todos los grupos de estudio son en la conformación heterocigota.

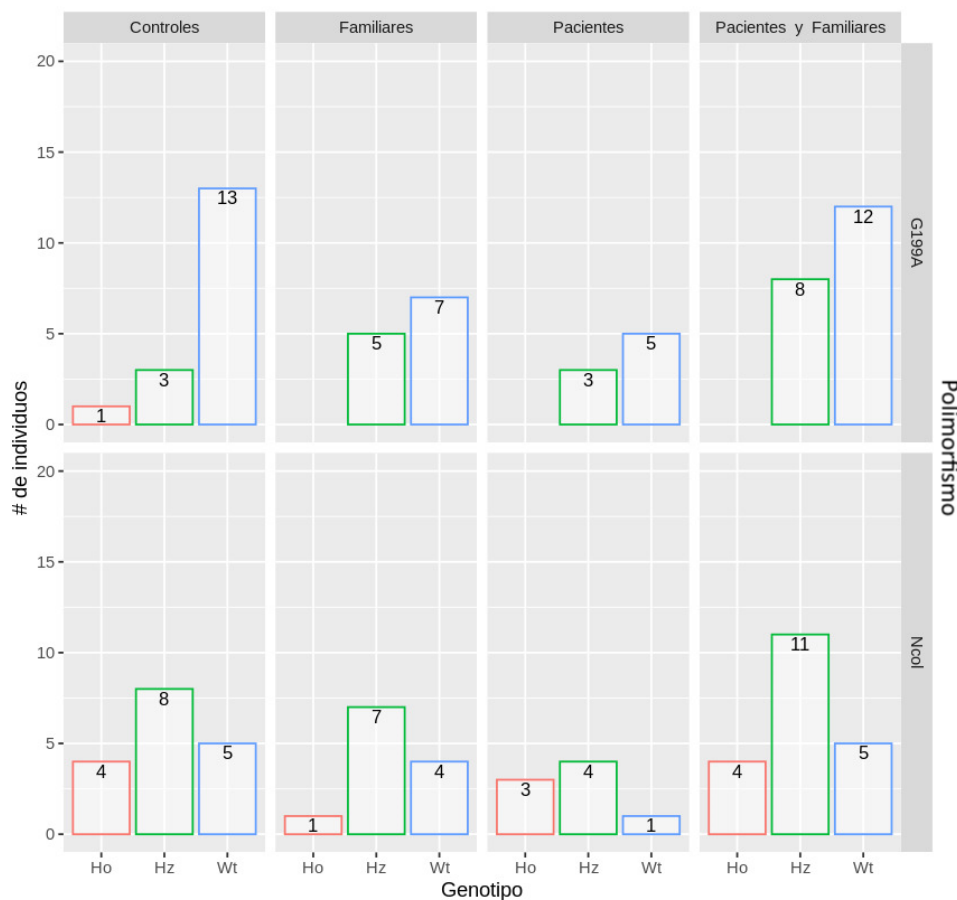


Figura 1. Distribución genotípica por grupo de estudio de los polimorfismos *G199A* y *NCOI*

Para ambos polimorfismos, se calcularon las frecuencias alélicas en las poblaciones de control, pacientes y pacientes y familiares. *G199A* mostró frecuencias por encima de 0.8 para el alelo silvestre en las tres poblaciones, mientras que en *NCOI* se obtuvo un 0.62 para el alelo mutado en el grupo de pacientes y 0.47 en el grupo de controles (ver figura 2).

Para la comparación estadística de las frecuencias alélicas, se realizó el test de Fisher. Al comparar las frecuencias de *G199A* entre los grupos de pacientes versus controles y entre pacientes y familiares versus controles no se obtuvo suficiente evidencia estadística para rechazar que las frecuencias son iguales entre poblaciones ($p=0.70$ y $p=0.76$, respectivamente).

La comparación entre poblaciones para *NCOI* se realizó de la misma manera que para *G199A*. En este caso, también, se obtuvieron valores estadísticos que no permiten establecer diferencia significativa de las frecuencias alélicas entre poblaciones ($p=1$ para controles versus pacientes y familiares y $p=0.37$ pacientes versus controles).

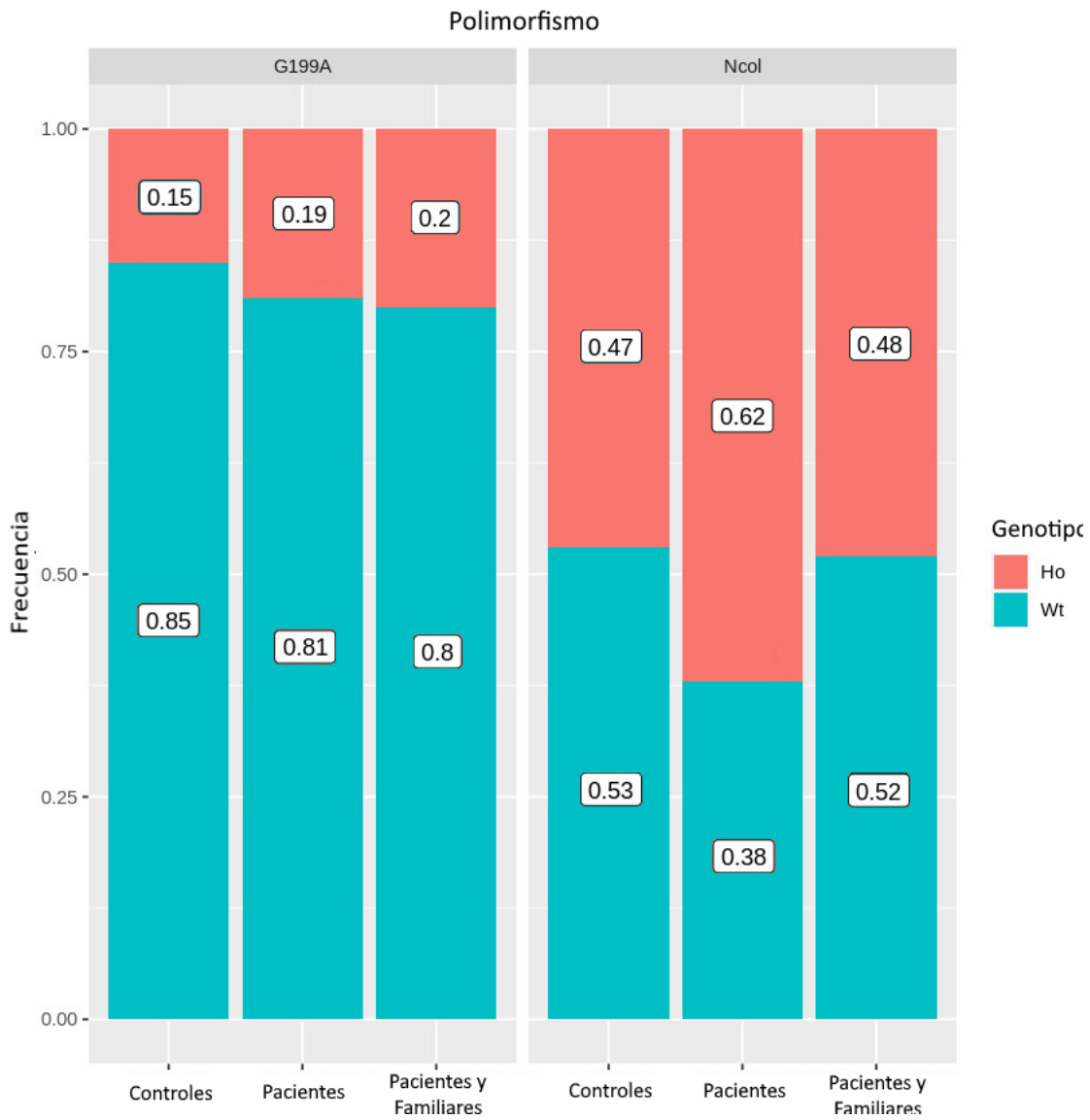


Figura 2. Distribución de frecuencias alélicas por grupo de estudio de los polimorfismos *G199A* y *NCOI*

Discusión

Las frecuencias alélicas para *G199A* en las poblaciones de estudio (pacientes, familiares y controles) son similares entre sí (0.8, 0.81 y 0.85, respectivamente), situación ya reportada por Camacho y colaboradores en el 2005, en donde obtuvieron valores para la conformación silvestre de 0.87 en pacientes y 0.84 en controles. Estos mismos autores citan frecuencias en población de Alemania similares: conformación silvestre 0.87 en pacientes con esferocitosis y en personas sanas de 0.79 (7,8). Lo anterior no aporta información adicional o diferencial entre las poblaciones por lo que no se considera un candidato adecuado como marcador genético o apoyo en el diagnóstico de la esferocitosis hereditaria. Debe recalarse que esto podría variar si se aumentara la muestra o se analizaran sus resultados en combinación con otros marcadores genéticos.

En diferentes investigaciones, se ha considerado *NCOI* como un posible marcador genético relacionado a la esferocitosis hereditaria (7). En este estudio se observa una mayor frecuencia alélica del alelo mutado en pacientes con respecto a la población control, sin embargo, la comparación estadística mostró que no hay evidencia que sustente esto, por lo que se recomienda aumentar el número de individuos en cada uno de los grupos de estudio y reanalizar los datos.

Conclusiones

La esferocitosis hereditaria es una enfermedad heterogénea clínicamente y genotípicamente, de ahí la necesidad de buscar herramientas que apoyen en su diagnóstico, en especial en casos atípicos sin historia familiar y asintomáticos. Si bien es cierto que se

han relacionado los defectos en el gen de ankirina al 50% de los casos (2,4), el estudio aislado de los polimorfismos *G199A* y *NCOI* no parecen brindar información concluyente. Se recomienda continuar el estudio con mayor número de participantes y aumentar la cantidad de candidatos a marcadores genéticos; además, hacer uso de las tecnologías de secuenciación de nueva generación, con el fin de recabar mayor cantidad de información.

Es importante, además, destacar el uso de otras herramientas de diagnóstico como la fragilidad osmótica, determinación de EMA y, por supuesto, la interpretación de todas las pruebas dentro del contexto clínico de los pacientes.

Declaraciones bioéticas

Los participantes voluntariamente firmaron el consentimiento informado aprobado por el CEC de la Universidad de Costa Rica.

Agradecimientos

Se agradece a los participantes, al equipo del CIHATA y especialmente a los estudiantes de la carrera de Microbiología de la Universidad de Costa Rica: Gabriela Sandí y José Jiménez

Referencias

1. Iolascon A, Avvisati RA. Genotype/phenotype correlation in hereditary spherocytosis. *Haematologica*. 2008;93 (9):1283–8.
2. Agarwal AM. Ankyrin Mutations in Hereditary Spherocytosis. *Acta Haematol*. 2019; 141(2):63–4.
3. Trompeter S, King MJ. Hereditary spherocytosis. *Paediatr Child Heal* (United Kingdom). 2019; 29(8):359–64.
4. Gallagher PG. Abnormalities of the erythrocyte membrane. *Pediatr Clin North Am*. 2013; 60(6):1349–62.
5. Coetze T. Erythrocyte membrane disorders. En: Kaushansky K, Prchal J, Press O, Lichtman M, editores. *Williams Hematology 9th edition*. 9th ed. United States: Mc

- Graw Hill; 2016. p. 674.
6. He BJ, Liao L, Deng ZF, Tao YF, Xu YC, Lin FQ. Molecular Genetic Mechanisms of Hereditary Spherocytosis: Current Perspectives. *Acta Haematol.* 2018;139(1):60–6.
 7. Camacho-Torres AL, Sánchez-López JY, Mesa-Cornejo VM, Ibarra B. Análisis de los polimorfismos G199A, NcoI del gen ANK1 y Memphis I del gen SLC4A1 en Individuos sanos y Pacientes Mexicanos Con Esferocitosis Hereditaria. *Gac Méd Mex.* 2005;142(5):435–7.
 8. Eber SW, Gonzalez JM, Lux ML, Scarpa AL, Tse WT, Dornwell M et al. Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis. *Nat Genet.* 1996;13:214–8.
 9. Gallagher PG, Tse WT, FB. Polymerase chain reaction analysis of an NcoI polymorphism of the human erythrocyte ankyrin gene. *Blood.* 1992;80(1850–1852).