

IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES MOLECULARES DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA MÁS FRECUENTES EN NUESTRO MEDIO MEDIANTE REACCIÓN DE MINISECUENCIACIÓN (SNAPSHOT®)

S. Gamarra, J. Martínez-López, G. García-Effrón, I. López-Villar y F. Gilsanz

Servicio de Hematología. Hospital 12 de Octubre.

El defecto hereditario de G6PD, tiene una base molecular compleja ya que existen más de 100 mutaciones o combinaciones descritas de las cuales sólo 6, son frecuentes en España donde por el momento es una patología rara. La técnica de minisequenciación (SNaPshot[®], Applied Biosystem) se basa en la PCR fluorescente con análisis de fragmentos y la secuenciación, en la que un primer hibrida con el DNA próximo al cambio de nucleótido de interés, se extiende con la DNA polimerasa por medio de un ddNTP marcado que se une al nucleótido donde se encuentra la mutación. Su aplicación es la detección de múltiples mutaciones puntuales en una sola reacción de PCR.

Objetivos: Optimizar un método de minisequenciación (SNaPshot) para la detección de las 7 mutaciones más frecuentes causantes de anemia por déficit de G6PD en nuestro entorno, mediante una única PCR.

Pacientes y métodos: Se estudiaron 23 pacientes: 5 varones y 18 mujeres diagnosticados de anemia por déficit de G6PD. Se amplificó mediante PCR del fragmento del gen de G6PD donde se encuentran las mutaciones que corresponden a 3900 pb. Posteriormente se purificó el producto de amplificación con EXOSAP-IT[®] (Amersham Biosciences). En un segundo paso se realizó una segunda reacción de PCR de minisequenciación (SNaPshot[®]). Las mutaciones estudiadas fueron: G6PD A-^{376G/202A}, G6PD A-^{376G/680T},

G6PD A-^{376G/968C}, G6PD^{Seattle}^{844C}, G6PD A^{376G}, G6PD^{Union}^{1360T} y G6PD^{Mediterranea}^{563T}. Los productos de minisequenciación se separan y detectan mediante electroforesis capilar seguido de un análisis automático genotipado (ABI prism 3100-Avant (Applied Biosystems)). El análisis de los genotipos fue realizado por el software Genotyper[®] v.3.7. Se utilizaron controles de cada mutación, los cuales fueron confirmados mediante secuenciación.

Resultados: En los 5 varones se detectaron las siguientes mutaciones: G6PD A-^{202A/376G} (3 hemocigotos), G6PD A^{376G} (1 hemocigoto) y en un caso no se detectó ninguna de las mutaciones estudiadas. Todos estos pacientes eran extranjeros. Los resultados obtenidos en las 18 mujeres fueron: 4 heterocigotas G6PD A-^{376G/202A}, 3 heterocigotas G6PD^{Mediterranea}^{563T}, 2 homocigotas G6PD A-^{376G/202A} y en las 9 mujeres restantes no se detectó ninguna de las mutaciones estudiadas. Todas estas pacientes eran españolas excepto 2 que presentaron la mutación G6PD A-^{376G/202A} una en homocigosis y la otra en heterocigosis.

Conclusiones: La minisequenciación múltiple semi-automática descrita puede detectar de forma sencilla las mutaciones más comunes causantes de anemia por déficit G6PD en nuestro entorno.

Financiado por FIS PI030821 y CAMGR/0340