DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES ASOCIADAS A TROMBOFILIAS MEDIANTE ANÁLISIS DE DISOCIACIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN (HRM)

Cortiñas, Enriqueta[1]; **Monteverdi, María L.**[1]; **Grupe, Verónica**[1]; **Lucca, Maria A.**[1]
[1]Fundación para el Progreso de la Medicina, Laboratorio de Biología Molecular, Córdoba, Argentina.
enriquetacortinas@fpmlab.org.ar

INTRODUCCIÓN

Las trombofilias hereditarias (TH) se caracterizan por la presencia de mutaciones genéticas que predisponen al desarrollo de enfermedad tromboembólica. Entre ellas se destacan: a) G1691A en el Factor V (Factor V de Leiden), b) C677T en la enzima metilén-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y c) G20210A en la protrombina.

Estas mutaciones puntuales pueden estudiarse a través de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), seguida de digestión con enzimas de restricción y posterior análisis por electroforesis en gel de agarosa (PCR-RFLP). Sin embargo, dicha técnica resulta laboriosa, lenta y además existe riesgo alto de contaminación ya que se manipulan muestras posteriormente a su amplificación. En contraste, el análisis por HRM es una técnica más rápida y simple que se fundamenta en detectar pequeñas diferencias en las curvas de fusión de los fragmentos de ADN amplificados por PCR en tiempo real. Dichas curvas son características para cada secuencia particular. Mediante este análisis es posible detectar mutaciones de una única base.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la sensibilidad y especificidad de HRM para la detección de las mutaciones G1691A, C677T y G20210A con respecto a PCR-RFLP y evaluar la concordancia entre ambas técnicas, en muestras provenientes de pacientes con riesgo de TH.

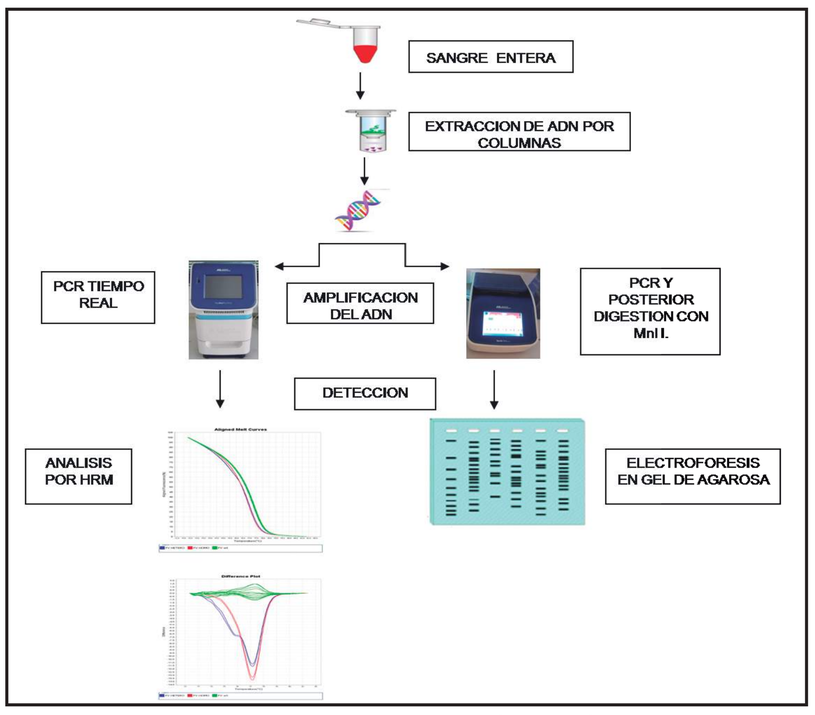
MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de sangre entera con anticoagulante EDTA de 190 pacientes ingresados al Laboratorio de Biología Molecular de la FPM con sospecha de TH. La extracción de ADN se realizó mediante columnas de intercambio iónico.

Del total de las muestras, 102, 43 y 45 fueron evaluadas para las mutaciones G1691A, C677T y G20210A, respectivamente.

Todas las muestras fueron estudiadas por la técnica de PCR- RFLP, utilizando las enzimas MnlI, HinfI y HindIII para las mutaciones G1691A, C677T y G20210A, respectivamente. Por otra parte, también fueron analizadas por PCR en tiempo real con posterior análisis de HRM llevado a cabo en el termociclador StepOnePlus Real-Time PCR de ApplyBiosystem.

El cálculo estadístico se realizó con el programa INSTAT. Las pruebas arrojan resultados categóricos por lo que la evaluación del rendimiento del test se realiza en tablas 2x2 utilizando el test de Fisher. La correlación entre las pruebas se calculó mediante el coeficiente de concordancia kappa y la exactitud se expresa en términos de Sensibilidad y Especificidad.



Esquema de pasos a seguir para detección y análisis de PCR-RFLP y PCR-HRM.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

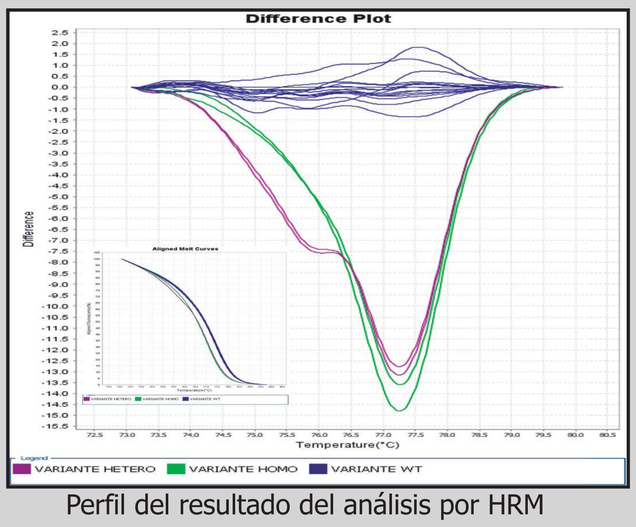
De las 102 muestras analizadas para FV de Leiden, 22 resultaron heterocigotas para la mutación, 3 homocigotas y 77 no presentaron la mutación. El ensayo de HRM mostró una sensibilidad de 100% (IC 86 a 100) y una especificidad de 100% (IC 95 a 100) con respecto a la PCR-RFLP. (Fig.1).

De las 45 muestras analizadas para la mutación G20210A en la protrombina 9 resultaron heterocigotas, 1 homocigota y 35 no presentaron la mutación. El ensayo de HRM mostró una sensibilidad de 100% (IC 69 a 100) y una especificidad de 100% (IC 90 a 100) con respecto a la PCR-RFLP.

De las 43 muestras analizadas para la mutación C677T en la enzima MTHFR 15 resultaron heterocigotas, 9 homocigotas y 19 no presentaron la mutación. El ensayo de HRM mostró una sensibilidad de 100% (IC 86 a 100) y una especificidad de 100% (IC 82 a 100) con respecto a la PCR-RFLP.

Todos los métodos comparados presentaron una concordancia excelente (kappa=1).

En el presente trabajo es posible concluir que el análisis por HRM es sensible y específico para la detección de las mutaciones estudiadas. Además, dicha metodología, resulta una herramienta que presenta múltiples ventajas respecto de PCR-RFLP ya que es simple, rápida, se realiza en tubo cerrado lo que implica menor riesgo de contaminación y su costo es comparable a PCR-RFLP.



Perfil del resultado del análisis por HRM

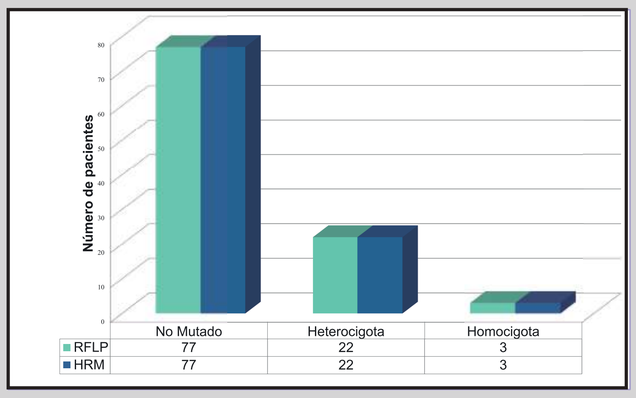


Figura 1 Gráfico de Barras. Número de pacientes vs variantes encontradas en la mutación del Factor V de Leiden (No mutado, Heterocigota, Homocigota)