

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL GEN E IDENTIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE LAS MUTACIONES

Irene Corrales^a, Lorena Ramírez^a, Carme Altisent^b, Rafael Parra^{a,b}, Francisco Vidal^a.

^aUnitat de Diagnòstic i Teràpia molecular, Banc de Sang i Teixits, Barcelona. ^bUnitat d'Hemofília, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona.

Introducción: La enfermedad de von Willebrand (EVW) es la coagulopatía congénita más frecuente en la población. Su diagnóstico molecular es especialmente complejo debido al gran tamaño del gen que codifica para el factor von Willebrand (FVW), a su localización en un cromosoma autosómico, a la existencia de un pseudogen parcial altamente homólogo (> 96% de similitud), y a la presencia de mutaciones en otras regiones del genoma implicadas en la expresión y/o procesamiento del FVW. Durante los últimos años se han descrito numerosos procedimientos para el diagnóstico molecular de la EVW basados en técnicas de *screening* de mutaciones que implican generalmente un importante trabajo de manipulación y requieren de personal altamente cualificado.

Objetivos: El objetivo de nuestro trabajo ha consistido en aprovechar los avances en las tecnologías de secuenciación del DNA para diseñar y desarrollar un procedimiento rápido y simplificado que permita la identificación de las mutaciones presentes en el gen del FVW en individuos afectados de EVW.

Material y métodos: Para ello, se han diseñado 48 parejas de oligonucleótidos específicos que permiten amplificar los 52 exones del gen y las regiones intrónicas flanqueantes bajo idénticas condiciones de termociclado. Por otra parte, los parámetros de la PCR se han optimizado para que cada reacción dé lugar a unos elevados niveles de producto con una alta especificidad. Los productos de PCR son secuenciados en 55 reacciones y analizadas mediante electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 3100-*Avant*. Las secuencias resultantes son finalmente alineadas frente a la secuencia salvaje del gen del FVW utilizando el programa SeqScape® Software v2.1.1. Con esta finalidad se ha elaborado una plantilla específica para el programa mediante la que podemos discriminar automáticamente los polimorfismos (SNPs) descritos hasta el momento y las diferencias con el pseudogen en la región homóloga, lo que nos permite realizar la identificación de mutaciones minimizando las probabilidades de error. La optimización del procedimiento permite un alto rendimiento en el procesamiento de las muestras ya que, desde las reacciones de amplificación hasta la inyección automática en el secuenciador, se lleva a cabo en formato microplaca.

Conclusiones: En resumen, presentamos un procedimiento optimizado para la secuenciación directa del gen del FVW de manera simple, sensible y rápida (permite la amplificación y secuenciación del gen en 48 horas). Desde la reciente aplicación de este método en nuestro laboratorio se ha utilizado para realizar el análisis molecular de 14 familias afectas de EVW con resultados muy satisfactorios. La identificación de los defectos genéticos en la familia supone una información de gran relevancia para dar soporte y completar el diagnóstico clínico y permite llevar a cabo un consejo genético y diagnóstico prenatal muy fiable en aquellas familias en las que esté indicado.