

IDENTIFICACIÓN DE 58 MUTACIONES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA PARALELA DEL GEN DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND EN 50 PACIENTES

I. Corrales¹, S. Catarino³, L. Ramírez¹, D. Arteta³, J. Ayats², C. Altisent², R. Parra^{1,2}, F. Vidal¹

¹Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular del Banc de Sang i Teixits. Barcelona. ²Unitat d'Hemofília. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. ³Progenika Biopharma SA. Derio (Vizcaya)

Las perspectivas en el diagnóstico molecular de las enfermedades monogénicas han cambiado drásticamente con la aparición de las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (NGS).

Con el objetivo de aplicar estas tecnologías al diagnóstico molecular de la enfermedad de von Willebrand (VWD), hemos desarrollado una estrategia para la amplificación de las regiones de interés del gen del factor de von Willebrand (VWF), basada en un protocolo de PCRs cortas previamente diseñado en nuestro laboratorio.

Asimismo, hemos adaptado el protocolo para aprovechar la capacidad de multiplexación de estas plataformas mediante la introducción de secuencias que actúan como etiquetas identificadoras. De este modo la secuenciación del VWF de 50 pacientes se puede llevar a cabo simultáneamente mediante la combinación de DNA genómico de diversos pacientes antes de la amplificación. Con el fin de validar la metodología, se seleccionaron 28 pacientes de tipo 1, 11 de tipo 2, 1 de tipo 3 más 10 pacientes control cuyo defecto genético se había identificado previamente mediante secuenciación tradicional. Los resultados del análisis de este único estudio nos ha permitido identificar 58 mutaciones, 31 de las cuales son nuevas. Entre ellas se distinguen 35 mutaciones de cambio de sentido, 13 mutaciones que potencialmente afectan al splicing, 2 mutaciones de parada y 8 inserciones y/o deleciones. Un total de 25 pacientes estudiados por NGS fueron posteriormente analizados mediante secuenciación tradicional, lo que nos ha permitido estimar la sensibilidad en la identificación de las mutaciones del protocolo de NGS por encima del 90%. Además, esta eficiencia se podrá mejorar a través de modificaciones metodológicas y en el análisis bioinformático.

Teniendo en cuenta que hemos utilizado una octava parte de la capacidad del secuenciador, se pueden secuenciar 400 pacientes simultáneamente a un coste 10 veces inferior al de la secuenciación tradicional. La capacidad de la tecnología desarrollada resulta manifiesta ya que nos ha permitido secuenciar un número de pacientes similar al de tres años de secuenciación tradicional. Dado que permite analizar un gran número de muestras simultáneamente, es una técnica idónea para dar soporte al registro nacional de pacientes con VWD, en el que será preciso el estudio genético de un gran número de pacientes y familiares. La optimización de la metodología, mediante la implementación de nuevas tecnologías de microfluidos, permitirá la automatización en la amplificación y preparación de librerías, posibilitando la caracterización de la población afectada de forma rápida y económica.