

TRIPLET REPEAT PRIMED PCR (TP-PCR) EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1

Blanca Ejarque Lobo; M Esteso Perona; P Martínez Montero; MA Sanz Rodríguez;
L. Roman, J Molano

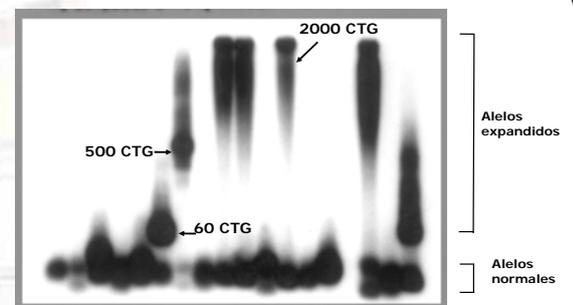
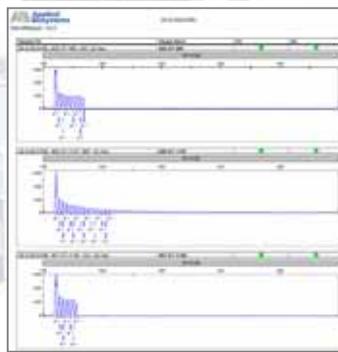
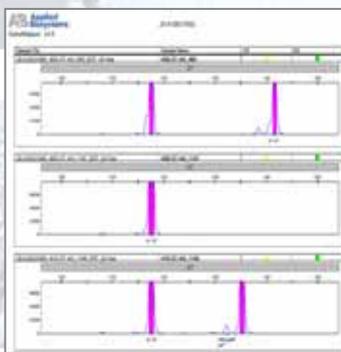
Unidad de Genética Molecular. Instituto de Genética Médica y Molecular.
Hospital Universitario "La Paz". Madrid

Introducción:

La distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) o enfermedad de Steinert es la distrofia muscular más común en adultos. Se trata de una enfermedad genética de herencia autosómica dominante que se caracteriza por miotonía, atrofia muscular, arritmia cardíaca, cataratas, etc. Tiene una incidencia aproximada de 1 por cada 8000 nacidos vivos en la población caucásica. El gen afectado es el gen DMPK que presenta en la región 3' no codificante del gen (región 3'UTR) una secuencia de repeticiones CTG cuyo número varía de: 5 a 37 en individuos normales, 38 a 49 en portadores asintomáticos y más de 50 en afectados. En algunos pacientes el número de repeticiones puede llegar a más de 3000.

Material y Métodos:

Diagnóstico molecular de DM1 en 102 muestras de pacientes y familiares mediante:



DETECCIÓN DE ALELOS CORTOS:

Detección de alelos cortos normales y patológicos con baja expansión mediante análisis de los productos de PCR en un secuenciador ABI modelo 310 Avant. Así se detectan los alelos de hasta 60 repeticiones.

TP-PCR PARA DETECTAR LA EXPANSIÓN:

Amplificación por PCR con tres cebadores, uno de ellos (ST101), marcado con FAM, flanquea la secuencia variable de trinucleótidos, otro (P4CTG) que hibrida con la zona de repeticiones CTG con un 5' común al tercer primer (P3R) que amplifica la mezcla de productos obtenida con los anteriores cebadores. Los alelos expandidos son detectados en un secuenciador de DNA. La presencia de expansión genera un patrón típico.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL N° DE REPETICIONES DE LOS ALELOS EXPANDIDOS:

Después de amplificar la región de repeticiones CTGs mediante una DNA polimerasa (amplifica fragmentos hasta 20 Kb) seguida de Southern blot de los fragmentos amplificados e hibridación con la sonda (CAG)₈ marcada en 5' por fosforilación enzimática con polinucleotido-quinasa y ATP-γ-P₃₂.

Resultados:

La técnica de PCR seguida de Southern blot e hibridación con la sonda (CAG)₈ detectó 44 positivos y 58 negativos en las 102 muestras de DNA analizadas. La técnica de TP-PCR identificó como positivos y negativos a los mismos individuos que la técnica de Southern. Por tanto, según estos resultados, en las condiciones utilizadas, la sensibilidad y especificidad de la TP-PCR para el diagnóstico de la DM1 es del 100%.

Conclusiones:

En pacientes con sospecha de padecer DM1 y aparentemente homocigotas para un alelo normal debe de excluirse la existencia de un alelo expandido no detectable mediante el análisis de la electroforesis capilar de los secuenciadores de DNA. Para ello se debe realizar TP-PCR que puede sustituir a la técnica de Southern.