

Hipercolesterolemia familiar: evaluación del diagnóstico genético mediante micromatrices de ADN

Hipercolesterolemia Familiar: evaluación del diagnóstico genético mediante micromatrices de ADN

CT2006/02

Santiago de Compostela, abril de 2006

Dirección de avalia-t

Teresa Cerdá Mota

Autor

Gerardo Atienza Merino

Documentación

Teresa Mejuto Martí

Para citar este informe:

Atienza G. Hipercolesterolemia familiar: evaluación del diagnóstico genético mediante micromatrices de ADN. Santiago de Compostela: Consellería de Sanidade, Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, avalia-t; 2006. Serie Avaliación de tecnoloxías. Consultas Técnicas: CT2006/02.

Consulta técnica: informe de evaluación en el que la revisión sistemática se limita a una búsqueda nuclear o central de la evidencia científica, permitiendo orientar la toma de decisiones de una forma razonablemente precisa, sin profundizar en el impacto económico ni organizativo.

El presente informe es propiedad de la Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, quedando prohibida su reproducción, almacenamiento o transmisión , sin el permiso de esta Axencia.

**Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, avalia-t
Dirección Xeral de Aseguramento e Planificación Sanitaria
Consellería de Sanidade**

C/ San Lázaro s/n

15781- Santiago de Compostela

Teléfono: +34 981 541831 Fax: +34 981 542854

Dirección electrónica: <http://avalia-t.sergas.es>

Correo electrónico : avalia-t@sergas.es

D.L.: C-886-06

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR	8
1.1.1 Genética de la HF	8
1.1.2 Frecuencia de la HF	9
1.1.3 Diagnóstico clínico	10
1.1.4 Tratamiento	12
1.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	12
1.2.1 Hibridación molecular	12
1.2.2 Mapas de restricción	13
1.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa	13
1.2.4 Secuenciación nucleotídica del ADN	14
1.3 LA TÉCNICA DE MICROMATRICES DE ADN	14
1.3.1 Aplicaciones de los microarrays de ADN	15
1.3.2 Desarrollo de la herramienta de diagnóstico genético Lipochip®	16
2 OBJETIVO	19
3 MÉTODOS	21
3.1 REVISIÓN DE LA LITERATURA	21
3.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS ARTÍCULOS	21
3.3 CALIDAD DE LOS ARTÍCULOS	21
4 RESULTADOS	23
4.1 RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE ESTUDIOS	23
4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ESTUDIO RECUPERADO	23
4.2.1 Validez analítica del test	23
4.2.2 Validez clínica del test	24
5 DISCUSIÓN	25
5.1 EFECTIVIDAD DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO MEDIANTE MICROMATRICES DE ADN	25
5.2 PERSPECTIVAS FUTURAS	26
6 CONCLUSIONES	29
7 RECOMENDACIONES	31
8 BIBLIOGRAFÍA	33
9 GLOSARIO DE TÉRMINOS	37
ANEXOS	41
ANEXO 1. BASES DOCUMENTALES REVISADAS	41
ANEXO 2. ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO 3. CLASIFICACIÓN DE LA EVIDENCIA CIENTÍFICA	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario

ApoB: apolipoproteína B-100

ApoE: apolipoproteína E

ARNm: ARN mensajero

CGH: hibridación genómica comparada

CV: coeficiente de variación

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HF: hipercolesterolemia familiar

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LDLr: receptor de la LDL

MEDPED: *Make Early Diagnosis to Prevent Early Death*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

QMPSF: PCR multiplex cuantitativa de pequeños fragmentos fluorescentes

RESUMEN

Objetivo: Evaluación de la efectividad analítica y clínica de la técnica de micromatrices de ADN en el diagnóstico genético de la hipercolesterolemia familiar.

Tipo de intervención: Diagnóstico.

Diseño del estudio: Revisión sistemática.

Bases de datos y fuentes: Medline y PreMedline, Embase, HTA y Cochrane Database.

Metodología: La revisión de la literatura se realizó utilizando las bases de datos Medline y PreMedline, HTA y Cochrane Database. La selección de los artículos relevantes de la búsqueda se realizó mediante la lectura de sus resúmenes y teniendo en cuenta una serie de criterios de inclusión y exclusión relativos al diseño de los estudios, idioma, características de los pacientes y variables de resultado analizadas. Posteriormente se procedió a la lectura crítica a texto completo y a un análisis y extracción de los resultados.

Resultados: Únicamente se encontró un artículo que evaluase la efectividad de las micromatrices de ADN en el diagnóstico genético de la hipercolesterolemia familiar y un informe corto de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. El objetivo del artículo fue describir los resultados obtenidos con un biochip capaz de determinar 117 mutaciones diferentes en el gen del LDLr y una en el gen ApoB R3500Q. Los autores observaron un coeficiente de variación del 4,8 % y una especificidad y sensibilidad globales para todas las mutaciones del 99,7% y 99,9%, respectivamente. Para determinar la validez clínica se realizó un estudio ciego con muestras de 407 pacientes de genotipo desconocido, encontrando mutaciones en el 46% del total de pacientes (187). De éstos, el 69 % tenían un diagnóstico definitivo previo de HF en la escala Medped y el 31 % restante, un diagnóstico probable. A los pacientes con un diagnóstico clínico de certeza de HF y en los que sin embargo la determinación de mutaciones genéticas fue negativa, se les realizó una secuenciación nucleótida completa, encontrando 43 pacientes con 28 mutaciones no detectadas previamente, por lo que de forma global, el porcentaje de diagnóstico genético en los 252 pacientes con 8 o más puntos en la escala holandesa fue del 68 %.

Conclusiones: La importancia del diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar radica en que las personas afectadas presentan una elevada frecuencia de enfermedad coronaria prematura, reduciéndose de forma importante su expectativa de vida. La tecnología de micromatrices de ADN multigénicas parece constituir una técnica con alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico genético de la HF, pudiendo ser una alternativa más rápida y menos costosa que las actualmente utilizadas. Sin embargo, en la elaboración de este informe únicamente se ha encontrado un estudio que aborde la efectividad de este nuevo procedimiento diagnóstico, lo que hace que los resultados deban considerarse no concluyentes, necesitándose su confirmación mediante posteriores estudios. Por este motivo, en el momento actual no se recomienda la adopción de esta técnica, al menos de forma generalizada, hasta que la publicación de nuevos estudios confirmen o rechacen la aparente validez analítica y clínica.

1 INTRODUCCIÓN

Las alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas constituyen la base bioquímica del desarrollo de la aterosclerosis, existiendo una relación directa entre la patología cardiovascular y el aumento de los niveles plasmáticos de colesterol, de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de triglicéridos, y una relación inversa con los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Son evidencias concluyentes de esta causalidad, la existencia de componentes lipídicos en las placas de ateroma, el desarrollo de cardiopatía isquémica precoz en la hipercolesterolemia familiar y el que las poblaciones con mayor ingesta de grasas saturadas y colesterol presentan una mayor incidencia y mortalidad por cardiopatía isquémica, disminuyendo cuando se reducen las cifras de colesterol.

En España, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte y la tercera causa de años potenciales de vida perdidos. Además, se calcula que estas enfermedades ocasionan aproximadamente un 8 por ciento del gasto sanitario anual, debido fundamentalmente a los costes de las hospitalizaciones y a las pérdidas de productividad.

Las LDL y HDL son las principales lipoproteínas involucradas en el transporte del colesterol, aunque con diferentes funciones. Así, la LDL constituye la principal forma de transporte de colesterol hacia los tejidos, mientras que la HDL únicamente transporta el 20-25% del colesterol total, haciéndolo hacia el hígado, después de removerlo de los tejidos periféricos. Esto hace que las LDL sean consideradas lipoproteínas aterogénicas, a diferencia de las HDL que son protectoras. Desde mediados de los años setenta se conoce que la captación de colesterol por las células es un proceso mediado por receptores y que la cantidad de éstos está sujeta a regulación. Así, la entrada de colesterol en la célula se produce por un mecanismo de endocitosis, después de la interacción de la LDL con su receptor (LDLr). Éste es una glicoproteína de 839 aminoácidos y 18 cadenas de oligosacáridos que une al menos dos proteínas, la Apolipoproteína B-100 (ApoB) y la Apolipoproteína E (ApoE). Su síntesis se produce en el retículo endoplásmico, transportándose posteriormente al aparato de Golgi y de ahí, a la superficie celular.

Los receptores se agrupan en invaginaciones de la membrana celular recubiertas de una sustancia denominada clatrina. Cuando la LDL se une al receptor, las invaginaciones se transforman en vesículas endocíticas recubiertas, y posteriormente, la cubierta de clatrina se disocia de la vesícula, fusionándose varias de éstas para crear unas vesículas mayores llamadas endosomas. A continuación, las LDL se disocian del receptor, el cual vuelve a la superficie celular para iniciar otro ciclo de endocitosis. Por su parte, las partículas LDL separadas son enviadas a los lisosomas, en donde son degradadas por enzimas ácidas hidrolíticas. La ApoB de la LDL se transforma en sus aminoácidos y los ésteres de colesterol se hidrolizan para dar colesterol libre, el cual se utiliza para la síntesis de membranas y como regulador de la homeostasis de colesterol intracelular, mediante un sistema de control por retroalimentación. El colesterol inhibe la síntesis de LDLr, evitando así la entrada de más LDL en la célula y protegiendo a las células de una sobreacumulación de colesterol.

1.1 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Como ya se ha indicado, las hiperlipemias son uno de los principales factores en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular y pueden ser el resultado de un defecto genético de la persona, la expresión secundaria de un proceso primario o consecuencia de factores exógenos (alimenticios, culturales, socio-económicos, etc.) que conducen a la elevación de los niveles de lípidos plasmáticos. Si bien la hipercolesterolemia poligénica es la hiperlipemia más común, suponiendo el 80% de las hipercolesterolemias, nos centraremos únicamente en la hipercolesterolemia familiar (HF).

Es una enfermedad hereditaria de transmisión autosómica dominante, conocida también como hiperbetalipoproteinemia, debido al aumento en la circulación de la fracción beta lipoproteína o LDL. La forma homocigota de la enfermedad es muy rara (prevalencia de 1/1.000.000) y los individuos afectados carecen de receptores de LDL, al tener mutado ambos alelos del gen, presentando concentraciones muy elevadas de colesterol plasmático total (entre 700 y 1000 mg/dl). Desarrollan aterosclerosis en una etapa temprana de la vida y a pesar de la instauración de tratamientos agresivos, los niveles elevados de LDL se modifican muy poco, falleciendo generalmente por enfermedad cardíaca antes de los 30 años de edad. El trastorno heterocigoto es mucho más frecuente y afecta aproximadamente a uno de cada 500 individuos. En ellos, el número de receptores de LDL se reduce a un 50%, siendo suficientes los restantes para que se una la misma cantidad de LDL a la célula, pero a costa de elevarse de 2 a 3 veces la concentración extracelular de LDL. Esto hace que estos pacientes presenten un riesgo elevado de cardiopatía isquémica precoz, entre los 30 y los 50 años, aunque muchos de ellos tienen una vida de duración normal.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) puso en marcha hace unos años el programa MEDPED (*Make Early Diagnosis to Prevent Early Death*), con el objetivo de identificar y tratar a aquellas personas con altos niveles de colesterol y, debido a ello, con elevado riesgo de patología coronaria o cerebrovascular. En él colaboran un gran número de países, realizando labores de investigación clínica y científica en el campo de los trastornos lipídicos hereditarios y sin la existencia de intereses comerciales asociados al programa. Dentro de las diferentes patologías existentes, el programa se centró en primer lugar en la hipercolesterolemia familiar debido a ser una enfermedad hereditaria severa y bien conocida (1).

1.1.1 Genética de la HF

El defecto básico de la hipercolesterolemia familiar radica en el receptor de LDL, el cual es codificado por un gen de aproximadamente 45 kilobases (Kb), localizado en el brazo corto del cromosoma 19 (región p13.1-p13.3) y que consta de 18 exones y 17 intrones (2). Hasta enero de 2006 se habían descrito 861 mutaciones que afectan al gen que codifica el LDLr (3,4). Entre ellas destacan deleciones de distinto tamaño, originando algunas una proteína truncada, en tanto que las que afectan al promotor del gen impiden que éste se transcriba, no produciéndose por tanto la síntesis de la proteína correspondiente. Otras mutaciones incluyen sustituciones, y las que afectan al dominio citoplasmático del

receptor, impiden su internalización. Las mutaciones del gen del LDLr causantes de HF se suelen dividir en 5 clases (2):

- Mutación tipo 1: es la más frecuente y en ella los alelos son nulos, impidiéndose la síntesis de cualquier receptor. Se pueden producir alelos nulos por deleciones que eliminan el promotor del LDLr, de modo que no se produce ARN mensajero (ARNm). También se originan por mutaciones que afectan a la unión o por grandes deleciones, que producen un ARNm de tamaño anormal.
- Mutación tipo 2: los alelos son defectuosos para el transporte, ya que las proteínas codificadas del receptor no adoptan una estructura tridimensional adecuada, quedando bloqueadas completa o parcialmente en el proceso de transporte entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.
- Mutación tipo 3: los alelos son defectuosos para la unión, codificando las proteínas del receptor y siendo transportadas a la superficie celular de forma normal, pero careciendo de la capacidad de unión a las partículas LDL.
- Mutación tipo 4: los alelos son defectuosos para la internalización, codificando proteínas que se transportan a la superficie celular y se unen a la LDL normalmente, pero siendo incapaces de agruparse en vesículas recubiertas de clatrina y por tanto, no internalizando las LDL unidas.
- Mutación tipo 5: los alelos son defectuosos para el reciclado, codificando receptores que unen e internalizan el ligando en vesículas recubiertas de clatrina, pero sin liberar el ligando en el endosoma y por tanto, sin reciclarse a la superficie celular.

Si la síntesis del receptor LDL, su transporte, su unión, su internalización o su reciclado no funcionan correctamente, se producirá una acumulación de colesterol en sangre, facilitándose la formación de placas ateromatosas, con sus consecuencias clínicas.

1.1.2 Frecuencia de la HF

La frecuencia de la HF en la población caucásica es aproximadamente de 1/500 (0,20 %) (5), basándose en la que presentan los supervivientes de infartos de miocardio en EE.UU. y siendo similar a la descrita en otros países: 0,11% en Japón (6), 0,22 % en Noruega (7), 0,11 % en Dinamarca (8) y 0,19 % en Hungría (9). En algunas ocasiones, la frecuencia de HF heterocigota es mucho más elevada de 1/500, ocurriendo ésto cuando una población se aísla geográfica o culturalmente o cuando una gran proporción de individuos descienden de antecesores comunes a causa de la migración. En estos casos puede haber una o algunas mutaciones que causen HF en muchos pacientes, siendo ejemplos, las elevadas tasas de HF que aparecen en canadienses franceses (10), finlandeses (11), sudafricanos de origen holandés (12), tunecinos (13), indios (14), islandeses (15) y judíos Ashkenazi de Sudáfrica (16). Sin embargo, en la mayoría de los países donde las poblaciones son genéticamente más heterogéneas, como ocurre en España, no hay ninguna mutación que se encuentre con una alta frecuencia entre los sujetos afectados de HF. Así, Mata et al (17) describen 86 mutaciones diferentes del gen del LDLr tras un análisis completo del mismo en 350 casos índice españoles.

1.1.3 Diagnóstico clínico

Los criterios clínicos utilizados para identificar a pacientes con HF se basan en altos niveles de colesterol total y LDL-colesterol, historia familiar de hipercolesterolemia con evidencia de transmisión dominante, aumentando la probabilidad diagnóstica si hay presencia de niños con hipercolesterolemia. También son criterios diagnósticos la aparición de depósitos de colesterol en tejidos extravasculares, como por ejemplo, xantomas tendinosos o arcos corneales e historia personal y familiar de eventos cardiovasculares prematuros.

La gran variabilidad clínica y bioquímica interindividual del colesterol total y del LDL-colesterol no permite realizar una identificación inequívoca de esta enfermedad, aunque los pacientes con HF heterocigota suelen presentar niveles de LDL-colesterol de aproximadamente el doble de la población normal, en un rango de entre 190 y 400 mg/dl, mientras que los niveles de triglicéridos están habitualmente en el rango de la normalidad. Los xantomas tendinosos son patognomónicos de HF, aunque su identificación no es siempre fácil, habiéndose descrito que un 29% de pacientes con HF diagnosticada genéticamente presentan xantomas en el tendón de Aquiles, diagnosticados mediante ultrasonidos (18).

Tres grupos diferentes han desarrollado herramientas diagnósticas para la hipercolesterolemia familiar: el Programa MedPed de EE.UU. (19), el *Simon Broome Register Group* del Reino Unido (20) y el *Lipid Clinic Network* de Holanda (21). El Programa MedPed americano utiliza una serie de límites para los niveles totales de colesterol que son específicos para una determinada edad e historia familiar. Así, los límites son diferentes para aquellos individuos con familiares afectados de HF que para la población general, debido a que los primeros tienen una más alta probabilidad de presentar una mutación causante de HF. Por ejemplo, como puede verse en la tabla 1, el límite para una persona menor de 20 años con un familiar de segundo grado con HF es de 5,9 mmol/litro.

Tabla 1: Criterios del Programa MedPed de Estados Unidos para el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar (19).

Edad	Límites de colesterol total (mmol/litro)			
	Familiares de 1º grado con HF	Familiares de 2º grado con HF	Familiares de 3º grado con HF	Población general
< 20	5,7	5,9	6,2	7,0
20-29	6,2	6,5	6,7	7,5
30-39	7,0	7,2	7,5	8,8
≥ 40	7,5	7,8	8,0	9,3
Diagnóstico	Si los niveles de colesterol total exceden estos límites			

Los niveles de colesterol provienen de modelos matemáticos que utilizaron los niveles publicados de pacientes con HF en Estados Unidos y Japón, observándose en un estudio de validación de estos criterios, una especificidad del 98% y una sensibilidad del 87% para familiares de primer grado.

Los criterios del *Simon Broome Register* para la HF (20) incluyen niveles de colesterol, características clínicas, diagnóstico molecular e historia familiar (tabla 2). Un diagnóstico “definitivo” de HF se realiza cuando el paciente tiene niveles

elevados de colesterol y xantomas tendinosos, o si el paciente tiene identificada una mutación en el gen del receptor de la LDL o en el de la ApoB. Un diagnóstico “probable” se realiza cuando el paciente tiene niveles elevados de colesterol y una historia familiar de hipercolesterolemia o enfermedad cardiaca.

Tabla 2: Criterios diagnósticos del *Simon Broome Familial Hypercholesterolemia Register* para el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar (20).

Criterios	Descripción	
A	Colesterol total superior a 7,5 mmol/litro en adultos o superior a 6,7 mmol/litro en niños de edad superior a 16 años. O LDL colesterol superior a 4,9 mmol/litro en adultos o de 4,0 mmol/litro en niños mayores de 16 años.	
B	Xantomas tendinosos en el paciente o en familiares de primer grado.	
C	Diagnóstico genético de mutación en el gen del LDLr o en el gen de la ApoB.	
D	Historia familiar de infarto de miocardio antes de los 50 años en un familiar de segundo grado o antes de los 60 años en uno de primer grado.	
E	Historia familiar de concentraciones de colesterol superiores a 7,5 mmol/litro en familiares de primero o segundo grado.	
Diagnóstico	Definitivo	Criterio a y criterio b o c
	Probable	Criterio a y criterio d o criterio a y e

Los criterios del *Lipid Clinic Network* holandés (21) son similares a los del *Simon Broome Register*. Los puntos se asignan según los niveles personales y familiares de LDLc, la historia previa de enfermedad cardiovascular (coronaria, carotídea y periférica), la presencia de arco corneal antes de los 45 años de edad y de xantomas tendinosos y la presencia de una mutación genética para el gen del receptor de la LDL. Los autores diseñaron una tabla de puntuación teniendo en cuenta la frecuencia de aparición de estos signos clínicos, que puede ser utilizada fácilmente en la práctica clínica (tabla 3).

Tabla 3: Criterios diagnósticos de la hipercolesterolemia familiar heterocigota utilizados por el *Lipid Clinic Network* holandés (21).

Historia familiar	Familiar de primer grado con enfermedad coronaria y vascular precoz (hombres: < 55 años, mujeres: < 60 años) o Familiar de primer grado con cLDL > percentil 95	1 punto
	Familiar de primer grado con xantomas tendinosos y/o arco corneal o Hijos < 18 años con cLDL > percentil 95	2 puntos
Historia personal	Cardiopatía coronaria prematura (hombres: < 55 años, mujeres: < 60 años)	2 puntos
	Enfermedad vascular periférica o cerebrovascular precoz (hombres: < 55 años, mujeres: < 60 años)	1 punto
Signos físicos	Xantomas tendinosos	6 puntos
	Arco corneal antes de los 45 años	4 puntos
Análisis sanguíneo	LDL-c > 330 mg/dl	8 puntos
	LDL-c 250-329 mg/ dl	5 puntos
	LDL-c 190-249 mg/dl	3 puntos
	LDL-c 155-189 mg/dl	1 punto
Análisis ADN	Mutación funcional en el gen del receptor de LDL	8 puntos
Diagnóstico	Cierto	≥ 8 puntos
	Probable	6-8 puntos
	Posible	3-5 puntos

Una puntuación total superior o igual a ocho se considera “definitiva” para el diagnóstico de HFA, entre 6 y 8 “probable” y entre 3 y 5, “posible”. Aunque los criterios del *Simon Broome Register* considera que el diagnóstico molecular es definitivo para HF, el *Lipid Clinic Network* holandés requiere al menos algún otro criterio añadido al de diagnóstico molecular. Es preciso también tener en cuenta que algunos criterios (por ejemplo, los xantomas tendinosos o la enfermedad coronaria) se manifiestan tardíamente, por lo que tiene un valor limitado en pacientes y/o familiares jóvenes

1.1.4 Tratamiento

En líneas generales, el tratamiento de las dislipemias se basa en la adopción de medidas higiénico-dietéticas y en el uso de fármacos. Las primeras están orientadas a potenciar hábitos de vida saludables y a reducir el riesgo cardiovascular, estando constituidas por una dieta baja en grasas saturadas y alta en grasas poli y monoinsaturadas, práctica de ejercicio físico, reducción de peso y abstinencia de tabaco.

Con respecto al tratamiento farmacológico, la elección del fármaco hipolipemiente debe basarse en el perfil lipídico y en la eficacia demostrada en ensayos clínicos. En la actualidad, las estatinas (o inhibidores de la HMG CoA reductasa) son los hipolipemiantes de elección, habiéndose demostrado que su utilización reduce el número de episodios coronarios y la mortalidad asociada (22). Las principales estatinas con probada efectividad en ensayos clínicos son la pravastatina, la lovastatina y la atorvastatina. Por su parte, en la HF homocigota está recomendada la aféresis de LDL, técnica de alto coste y de carácter invasivo, aunque altamente eficaz para reducir los altos niveles de LDL que presentan estos pacientes (23).

1.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

1.2.1 Hibridación molecular

La hibridación molecular es uno de los pilares básicos de la metodología utilizada en un laboratorio de biología molecular y se refiere al apareamiento específico que ocurre entre cadenas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias. Es un proceso análogo a la reacción antígeno-anticuerpo, pero con la diferencia de que en la hibridación en lugar de anticuerpos se emplean las llamadas sondas o fragmentos cortos de ADN o ARN sintetizados *in vitro*. Las sondas se marcan con sustancias radiactivas fluorescentes o de otro tipo, a fin de hacer posible su posterior detección y de esta manera la identificación de la secuencia de ADN o ARN de interés.

A continuación se describen diferentes procedimientos de laboratorio que utilizan el principio de la hibridación y en los que la variación viene dada por el tipo de ácido nucleico utilizado, el soporte en que se lleva a cabo la hibridación y la forma de colocar los ácidos en la membrana.

- √ *Southern blot*: es una técnica que permite la identificación de secuencias específicas de ADN, mediante el uso de electroforesis en gel y de hibridación utilizando sondas específicas. Para analizar una muestra de

ADN cromosomal, ésta debe ser previamente fragmentada mediante sonicación o enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos se separan de mayor a menor tamaño mediante una electroforesis en gel de agarosa, traspasándose a un filtro de nitrocelulosa ó a una membrana de nylon. A continuación, el filtro se incuba con una sonda marcada y que es específica para la secuencia que se desea identificar. Esta sonda es una secuencia de ácido nucleico, que reconocerá la secuencia de ADN inmovilizada en el filtro a través del reconocimiento de secuencias complementarias de ácidos nucleicos.

- √ *Northern blot*: es una técnica muy similar al *Southern Blot* que permite la identificación de secuencias específicas de ARN. La muestra de ARN a analizar no requiere fragmentación y se somete a electroforesis en geles de agarosa, donde las moléculas de ARN se separan desde mayor a menor tamaño. Una vez terminada la electroforesis y sin teñir el gel, los fragmentos se traspasan a un filtro de nitrocelulosa o a una membrana de nylon, incubándose el filtro una sonda marcada específica para la secuencia que se desea identificar. Esta sonda es una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo ADNc, que reconocerá a la secuencia de ARN inmovilizada en el filtro a través del reconocimiento de secuencias complementarias de ácidos nucleicos.
- √ *Western blot*: también llamado *Inmunoblot*, no es un método de análisis directo de ácidos nucleicos, sino del producto de la expresión de los genes, es decir de polipéptidos específicos. Básicamente es una técnica análoga al *Southern* y *Northern Blot*, aunque difiere de las anteriores en que no existe hibridación, sino que la identificación de las proteínas se realiza con anticuerpos marcados. La muestra de proteínas se somete a una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida y sin teñir el gel, los polipéptidos se traspasan a un filtro de nitrocelulosa.
- √ *Dot blot* y *slot blot*: son procedimientos similares al *Northern blot*, con la diferencia de que el ARN no es sometido a electroforesis sino que se sitúa directamente sobre la membrana. Para colocar el ARN, este tipo de análisis requiere de un molde asociado a succión con vacío que puede producir círculos o puntos (*dot blot*) o hendiduras (*slot blot*).

1.2.2 Mapas de restricción

Esta técnica se basa en el principio de la enzimología de restricción donde de una molécula de ADN dada se obtendrán siempre los mismos fragmentos cada vez que sea expuesta a una enzima de restricción particular. La complejidad del mapa dependerá del tamaño de la molécula (a mayor número de bases, mayor será el número de sitios de restricción) y del número de enzimas utilizadas. De esta forma, dos moléculas de ADN del mismo tamaño podrán ser fácilmente diferenciadas por los mapas de restricción que producen al tratarlas con las mismas enzimas.

1.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa

También llamada PCR, es un método *in vitro* altamente sensible que permite amplificar secuencias específicas de DNA, obteniendo millones o billones

de copias exactas de una secuencia determinada. Se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio, que son la materia base para fabricar el ADN y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar y que sirva como iniciadora o cebadora.

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos: el primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas. A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada cadena iniciadora se una a su región específica dentro de la del ADN. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN.

1.2.4 Secuenciación nucleotídica del ADN

En la década de los 70 del pasado siglo se desarrollaron dos métodos para obtener secuencias de bases del ADN: el método de Maxam y Gilbert, que es un método químico y el de Sanger, que es un método enzimático. Ambos métodos dependen de un mismo principio, la obtención de moléculas de ADN de una sola cadena a partir del fragmento de ADN de doble hélice que se desea secuenciar y comparten etapas comunes: el marcado radiactivo o fluorescente de las moléculas y la separación mediante electroforesis en geles desnaturizantes que permite la lectura y la obtención de la secuencia de bases.

El método de Maxam y Gilbert consiste en romper las cadenas de ADN de cadena sencilla marcadas radiactivamente, con reacciones químicas específicas para cada una de las cuatro bases. Los productos de estas cuatro reacciones se resuelven por electroforesis, en función de su tamaño en geles de poliacrilamida donde la secuencia puede leerse en base al patrón de bandas radiactivas obtenidas.

El método enzimático de Sanger o del dideoxinucleótido es la técnica de secuenciación más ampliamente utilizada, siendo esencial disponer de un ADN de cadena simple, que actuará de molde y de un iniciador o cebador complementario de una región del ADN anterior. Este cebador se utiliza como sustrato de la enzima ADN polimerasa que va a extender la cadena copiando de forma complementaria el molde de ADN. Los fragmentos obtenidos se separan mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida. Estos fragmentos, previamente marcados radioactivamente, permiten que el gel sea revelado por exposición a una placa de rayos X, leyéndose la secuencia directamente o mediante un equipo especial.

1.3 LA TÉCNICA DE MICROMATRICES DE ADN EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

El diagnóstico definitivo de la HF se realiza mediante el análisis del ADN del gen que codifica el receptor de LDL, destacando su elevada especificidad en comparación con los criterios clínicos. Hasta el momento, las técnicas utilizadas en el diagnóstico genético de enfermedades han sido la secuenciación, el

polimorfismo conformacional de cadena única y la electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente, las cuales son poco prácticas, al consumir mucho tiempo y ser relativamente caras (entre 500 y 1000 £ por paciente, según Marks et al) (24). Sin embargo estas técnicas no dejan de plantear problemas, debido fundamentalmente a la gran heterogeneidad de las mutaciones - se conocen más de 800 distintas -, al gran tamaño del gen (40 Kb), y a que la mutación puede estar localizada en cualquier sitio del mismo o ser de cualquiera de los diferentes tipos existentes.

Los microarrays o micromatrices de ADN han emergido en los últimos años como un método eficaz para evaluar el nivel de expresión de miles de genes en un conjunto de células. Esta técnica permite obtener, entre otras cosas, cuales son los genes implicados en el desarrollo de determinadas enfermedades, como por ejemplo el cáncer, o poder asociar patrones globales de expresión génica a un determinado pronóstico respecto a la enfermedad (25).

El funcionamiento de los microarrays de expresión se basa en la capacidad de las moléculas complementarias de ADN de hibridar entre sí. De esta manera, sobre una base de cristal se depositan pequeñas cantidades de ADN, correspondientes a diversos genes cuya expresión se desea medir. Para ello se utilizan robots de precisión que usan unas agujas especiales para obtener las moléculas de sus recipientes y depositarlas en las coordenadas adecuadas. A estas muestras de ADN depositadas en el microarray se las denomina dianas y en un microarray típico, una superficie de 2 x 2 cm puede contener más de 10.000 dianas en forma de pequeños puntos separados adecuadamente.

Para detectar los genes que se expresan en un tejido, el proceso se inicia con la extracción del ARN de la muestra. Debido a que el ARN es muy inestable y se degrada en pocos minutos, los tejidos deben ser frescos o congelados inmediatamente tras su obtención. El ARN se convierte en ADN complementario (ADNc) mediante una transcriptasa reversa, marcándose con un fluorocromo, es decir, con una molécula que posteriormente emitirá luz al ser excitada mediante un láser adecuado. A esta muestra marcada se la denomina sonda y se enfrentará a las dianas del microarray. Cada molécula de ADNc marcada de la sonda se moverá por difusión hacia la diana que contenga su molécula complementaria para hibridarse con ella y quedar fijada allí.

Después de un tiempo para que la mayoría de las cadenas complementarias hibriden, el microarray se lava y se procede a hacer una medición relativa de la cantidad de ADN de la sonda que ha quedado fijada en cada diana. Para ello, el microarray se lee con un escáner láser y se obtienen 2 imágenes, una para cada fluorocromo usado, con puntos de luz cuyas intensidades variarán según el nivel de hibridación que se haya producido en cada diana. Estas imágenes se procesan mediante un software que cuantifica la señal de cada punto (diana) para cada fluorocromo (muestra) y elabora una base de datos que se analiza con técnicas estadísticas.

1.3.1 Aplicaciones de los microarrays de ADN

Por el momento hay 3 grandes áreas consolidadas, si bien las aplicaciones se amplían cada día (25):

Análisis del nivel de expresión génica

Tras la obtención de datos sobre el nivel de expresión de miles de genes y empleando un diseño experimental correcto y técnicas estadísticas adecuadas, se pueden realizar estudios de diagnóstico y caracterización de tumores u otros tejidos, identificación de los genes que modifican su expresión tras la administración de fármacos o identificación de genes con valor pronóstico. También se han empleado para asignar función a secuencias de ARN que se expresan pero cuya función era desconocida y para identificar grupos de genes que forman redes de regulación génica. Otras aplicaciones son el diagnóstico de enfermedades infecciosas a partir de la detección del genoma del germen en tejidos.

Genotipificación

Una muestra de ADN obtenida de un tejido o fluido, adecuadamente amplificada, puede ser estudiada para detectar mutaciones en genes de interés o variantes como polimorfismos en un nucleótido. Esta metodología tiene usos potenciales para la detección de riesgo o susceptibilidad para presentar enfermedades. Variantes de estos microarrays permiten secuenciar genes con mutaciones conocidas.

Detección del número de copias del ADN

Similar a la técnica de hibridación genómica comparada (CGH), se han diseñado microarrays para detectar ganancias o pérdidas alélicas en miles de secuencias, lo que permite obtener mapas cromosómicos mucho más detallados que la CGH tradicional. Estas técnicas tienen interés potencial en el estudio del pronóstico de tumores, ya que éste se halla asociado al nivel de daño genómico. También puede ser útil para detectar nuevos oncogenes y genes supresores de tumores.

1.3.2 Desarrollo de la herramienta de diagnóstico genético Lipochip[®]

Desarrollo del biochip

En España, debido al amplio espectro de mutaciones encontradas en el gen de la LDLr, la empresa Progenika ha diseñado una micromatriz de ADN para el diagnóstico molecular de la HF, en la que incluyó todas las mutaciones puntuales descritas hasta el momento en España y las correspondientes al gen de la ApoB, comercializándose con el nombre de Lipochip[®]. Si bien, el 90-95 % de los cambios que afectan al gen consisten en mutaciones puntuales, existe un 5-10 % de casos de grandes reordenamientos génicos. Esto requirió el desarrollo de una plataforma con tres etapas:

1. Análisis de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o inserciones en el gen del receptor de LDL y en el de la ApoB.
2. Análisis de Grandes Reordenamientos en el gen del receptor de LDL mediante QMPSF (PCR multiplex cuantitativa de pequeños fragmentos fluorescentes).
3. Análisis por Secuenciación Directa para hallazgo de nuevas mutaciones o confirmación de no presencia de mutación en el gen del receptor de LDL, en aquellos casos que resultaron negativos en el biochip o para los grandes reordenamientos.

El análisis de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones se llevó a cabo mediante el desarrollo de una micromatriz de ADN basada en la hibridación específica de ADN a su secuencia complementaria. Para la primera versión del Lipochip[®] se seleccionaron las 117 mutaciones más frecuentes en el gen del LDLr, así como la mutación Arg3500Gln en el gen ApoB. La actual versión 4.0 detecta 207 mutaciones distintas: 203 responsables de hipercolesterolemia familiar y 4 causantes del defecto familiar de Apo B.

Se diseñaron oligonucleótidos que detectaron el alelo normal y el mutado, oscilando su tamaño desde 19 hasta 27 nucleótidos. Estos oligonucleótidos se distribuyeron en distintas localizaciones del biochip, con el fin de homogeneizar los resultados obtenidos. Para asegurar la calidad y fiabilidad del proceso, se llevaron a cabo controles, tanto internos como externos, con el fin de constatar que el ADN de partida analizado fuese de suficiente calidad para su amplificación por PCR, que se alcanzase un mínimo de producto amplificado para ser detectado por el biochip y que los resultados fuesen homogéneos.

El diseño y la producción del biochip siguió las normas del documento publicado en 2003 por la *Food and Drug Administration* (FDA) titulado *"Multiplex Tests for Heritable DNA Markers, Mutations and Expression Patterns; Draft Guidance for Industry and FDA Reviewers"*, actualmente sustituido por otro de reciente publicación (26).

La impresión automática de las sondas oligonucleotídicas se llevó a cabo mediante un robot Spotter MicroGrid II de Biorobotics y la detección de la fluorescencia, mediante un escáner específico de portaobjetos capaz de captar la emisión de fluorescencia por parte de la molécula presente en el producto amplificado hibridado con las sondas del biochip. El escáner incluía un programa informático que permite cuantificar la señal de fluorescencia emitida por todas las moléculas marcadas. Paralelamente, la empresa Progenika desarrolló un programa específico capaz de procesar automáticamente los datos exportados por el programa de cuantificación del escáner de la intensidad de la señal de hibridación.

Análisis de Grandes Reordenamientos

En la actualidad se han descrito deleciones e inserciones que van desde una sola base hasta reordenamientos génicos mayores de 20 kb, apareciendo en aproximadamente un 5-10% de los pacientes con diagnóstico certero de HF (27,28). Con el fin de detectar estos grandes reordenamientos se utilizó la técnica QMPSF, previamente utilizada por Heath et al para el análisis del gen del receptor de LDL (28).

Secuenciación

Por último, aquellas muestras con diagnóstico genético negativo para presencia de mutaciones puntuales y grandes reordenamientos son sometidas a un análisis de secuenciación directa.

2 OBJETIVO

- Evaluación de la efectividad analítica y clínica de la técnica de micromatrices de ADN en el diagnóstico genético de la hipercolesterolemia familiar.

3 MÉTODOS

3.1 Revisión de la literatura

Para intentar dar una respuesta a los objetivos de este informe, se realizó una búsqueda de la literatura publicada desde enero de 2000 hasta febrero de 2006 en las principales bases de datos de literatura biomédica. Las bases documentales utilizadas y la estrategia de búsqueda bibliográfica se exponen en los anexos 1 y 2. Una vez realizada la búsqueda de los artículos bibliográficos, se procedió a la lectura de los resúmenes de los artículos resultantes, seleccionándose aquellos que cumplieran con los criterios que se exponen a continuación y revisándose también la bibliografía citada en los mismos.

3.2 Criterios de selección de los artículos

La selección de los artículos se realizó conforme a una serie de criterios previamente establecidos, en función de los objetivos de este informe:

- Diseño del estudio: se incluyeron revisiones sistemáticas, metaanálisis, ensayos clínicos aleatorizados o no, estudios de cohortes y series de casos.
- Idioma: artículos publicados en castellano, inglés, francés, portugués e italiano.
- Población a estudio: pacientes con hipercolesterolemia familiar, tanto homo como heterocigota.
- Diagnóstico genético: artículos en los que el diagnóstico genético se realizase mediante la técnica de matrices de ADN o biochips.
- Medidas de resultado: los estudios debían ofrecer resultados acerca de la sensibilidad y especificidad de la prueba.

3.3 Calidad de los artículos

Todos los estudios seleccionados se valoraron según su diseño, estableciéndose una jerarquía de evidencia científica de mayor a menor importancia según la clasificación de Jovell y Navarro-Rubio (29) (anexo 3). Asimismo, se tuvieron en cuenta los criterios STARD para estudios de precisión diagnóstica (*Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*) (30).

4 RESULTADOS

4.1 Resultados de la búsqueda y selección de estudios

Si bien la búsqueda bibliográfica aportó 123 artículos, sólo se encontró uno que cumpliera los criterios de inclusión de este informe, es decir, que evaluase la efectividad de las matrices de ADN en el diagnóstico genético de la hipercolesterolemia familiar (31). En la revisión de la literatura referente a revisiones sistemáticas e informes de evaluación, únicamente se recuperó un informe corto de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (32).

4.2 Características generales del estudio recuperado

Su objeto fue el de desarrollar una matriz de ADN que permitiera identificar pacientes portadores de HF con mutaciones conocidas del gen del LDLr. Para ello, los autores partieron del Registro Nacional de HF confeccionado en 1999 por la Fundación Española de HF (17) y en el que se incluyeron cerca de 2400 pacientes con HF diagnosticada según los criterios del *Lipid Clinic Network* holandés (21). La determinación de las mutaciones presentes en el gen del LDLr se realizó mediante técnicas de polimorfismo conformacional de cadena única, secuenciación y análisis del polimorfismo de restricción (33), hallando un total de 117 mutaciones diferentes en el gen del LDLr de esta población de pacientes con HF y una en el gen ApoB R3500Q, siendo estas 118 mutaciones, las seleccionadas para la primera versión de la matriz de ADN.

4.2.1 Validez analítica del test

La validez analítica de una prueba genética diagnóstica es la exactitud con la que es capaz de identificar una determinada variante genética, incluyendo dos tipos de parámetros:

- √ Reproducibilidad o fiabilidad de la prueba: es la capacidad de obtener resultados similares cuando se repite la prueba, bien entre distintos observadores o en distintas circunstancias con el mismo observador. Con el fin de constatar la reproducibilidad del Lipochip[®], los autores llevaron a cabo un experimento de análisis de 20 réplicas de una paciente normal analizadas en veinte experimentos independientes. El cálculo del coeficiente de variación (CV) de las relaciones de cada una de las mutaciones en las veinte réplicas fue del 4,8 %, definiéndose el CV como el cociente entre la desviación típica y el valor absoluto de la media aritmética.
- √ Sensibilidad, especificidad y valores predictivos en relación al genotipo: su determinación se lleva a cabo comparando la prueba genética con un estándar de referencia. La sensibilidad es definida como la proporción de personas con el genotipo en estudio que dan positivo en la prueba, mientras que la especificidad es la proporción de personas sin el genotipo que dan negativo en la misma. El valor predictivo positivo es la probabilidad que una persona que ha dado positivo

en la prueba tenga realmente el genotipo, siendo el valor predictivo negativo, la probabilidad que una persona con resultado negativo en la prueba no tenga el genotipo. Con el fin de determinar la sensibilidad y especificidad de la matriz se llevó a cabo un proceso de validación de la misma, empleando un gran número de pacientes provenientes del Registro Nacional de HF y de los que ya se disponía de diagnóstico genético previo por técnicas de polimorfismo conformacional de cadena única (SSCP) y secuenciación. Los autores utilizaron 10 muestras de ADN control por cada mutación (un total de 1180 muestras), observando una sensibilidad y especificidad del 100% para 115 mutaciones, mientras que en las restantes tres mutaciones, la especificidad y sensibilidad oscilaron entre el 90 y el 100%. En definitiva, la especificidad y sensibilidad globales para todas las mutaciones fueron del 99,7% y 99,9%, respectivamente.

4.2.2 Validez clínica del test

La validez clínica de una prueba genética se define como la certeza diagnóstica con que es capaz de predecir el riesgo de una enfermedad en la práctica clínica. Incluye su sensibilidad, especificidad y valores predictivos y su estudio suele realizarse mediante estudios epidemiológicos.

Para evaluar la validez clínica, los autores realizaron un estudio ciego utilizando muestras de 407 pacientes de genotipo desconocido, no emparentados y provenientes del Registro Nacional Español de HF. De ellos, 252 (62 %) tenían un diagnóstico definitivo de HF según la escala Medped holandesa y los restantes 155 (38 %), un diagnóstico probable o posible. Los autores encontraron los siguientes resultados:

- de los 407 pacientes analizados, se encontraron mutaciones en 187 pacientes (46%), de los que en 181 fueron mutaciones en el gen del receptor de la LDL y en 6 de la ApoB R3500Q.
- se detectó al menos una mutación en 129 de los 252 pacientes con diagnóstico clínico definitivo de HF (51,2 %), de acuerdo con los criterios del *Lipid Clinic Network* holandés.
- en los 155 pacientes con diagnóstico probable o posible se encontraron mutaciones en 58 de ellos (37,4%).
- de forma global, de los 187 pacientes con diagnóstico genético, un 69 % tenían un diagnóstico definitivo de HF en la escala Medped y el 31 % restante, un diagnóstico probable.
- de las 118 mutaciones testadas en la población de pacientes, solo se encontraron 59 (50%).

A los pacientes con un diagnóstico clínico de certeza de HF (más de 8 puntos en la escala Medped) y en los que sin embargo, la determinación de mutaciones genéticas fue negativa, se les realizó una secuenciación nucleótida completa para establecer la presencia de mutaciones no identificadas susceptibles de introducirse en versiones posteriores de la matriz. De las 123 muestras secuenciadas, se identificaron 28 mutaciones no detectadas previamente en 43 pacientes, por lo que de forma global, el porcentaje de diagnóstico genético en los 252 pacientes con 8 o más puntos en la escala holandesa fue del 68 %.

5 DISCUSIÓN

5.1 Efectividad del diagnóstico genético mediante micromatrices de ADN

De la lectura del artículo de Tejedor et al (31) se desprende que la matriz de ADN diseñada por ellos parece constituir una herramienta sensible, específica y de elevada reproducibilidad para el genotipado de mutaciones causantes de HF en la población española. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que el estudio realizado en 407 pacientes, si bien eran de genotipo desconocido, provenían todos ellos del Registro Nacional Español de HF, presentando un diagnóstico definitivo o probable de HF, por lo que la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos no son extrapolables a los que se podrían encontrar en una población normal.

Según sus autores, la novedad de este procedimiento es la elevada sensibilidad y especificidad utilizando sólo dos pares de oligonucleótidos específicos de alelo por mutación analizada. La matriz descrita en este trabajo es la primera matriz de ADN de baja densidad basada en hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo, capaz de realizar un cribado de un importante número de mutaciones, ya que el trabajo de Kotze et al (34) en el que utilizan un test basado en hibridación específica de alelos para el diagnóstico de HF, incluye sólo las 7 mutaciones más comunes en la población surafricana.

Según Tejedor et al (31), la ventaja de utilizar sólo cuatro sondas por mutación es que se pueden analizar un gran número de mutaciones con micromatrices de baja densidad. De esta manera, las mutaciones que aparecen en otros países se podrán incorporar en versiones posteriores de la matriz de ADN y finalmente ser de aplicación en todo el mundo. Por otra parte, la matriz de ADN descrita en este artículo detecta defectos tanto en el gen del receptor de la LDL como en el gen de la ApoB, fundamentalmente en pacientes con diagnóstico clínico definitivo de HF. Sin embargo, un gran número de personas mal diagnosticadas clínicamente como de probable/posible HF, utilizando este procedimiento de análisis podrían obtener un diagnóstico genético certero.

Una vez que se ha identificado un caso índice, es posible realizar un diagnóstico temprano de HF en sus familiares para reducir en ellos el riesgo de sufrir un proceso cardiovascular prematuro. Para los autores, cuando las concentraciones de LDL-colesterol son el único rasgo fenotípico de HF, no es posible realizar un diagnóstico inequívoco de familiares a partir de un caso índice sólo mediante la determinación del colesterol. Por ello, la utilización de matrices de ADN podría ser un buen método para un diagnóstico temprano. Por otra parte, debido a que los portadores de mutaciones nulas tienen un mayor riesgo relativo de procesos cardiovasculares prematuros que los portadores de mutaciones con cambio de sentido, el tipo de variación de la secuencia en pacientes con HF definitiva podría ayudar a determinar el pronóstico de la enfermedad. Además, es conocido que la respuesta a las estatinas está estrechamente relacionada con el tipo de mutación que presenta el paciente (35), por lo que algunos podrían necesitar pautas más intensas de tratamiento con hipolipemiantes para alcanzar

las concentraciones de colesterol recomendadas en la reducción del riesgo de procesos cardiovasculares prematuros (36). En este sentido, la matriz de ADN propuesta en este artículo podría ser una herramienta útil en el diseño de tratamientos individualizados en la prevención de este tipo de procesos y en la monitorización de la respuesta al tratamiento de los pacientes portadores de mutaciones.

En el estudio ciego realizado en 407 pacientes con HF posible o confirmada, Tejedor et al. (31) encontraron 181 pacientes (44,5%) que presentaban mutaciones del gen del receptor de la LDL, presentes en la matriz de ADN. Este resultado sería debido a que en poblaciones con una gran heterogeneidad en los criterios clínicos de inclusión de HF, como en los pacientes incluidos en el estudio, los métodos de cribado para mutaciones del receptor de la LDL tienen una tasa de detección que oscila entre el 30 y el 50% (24). Sin embargo, en estudios con criterios de inclusión mucho más estrictos, como los de enfermedad coronaria, las tasas de detección varían entre un 60 y un 80% (37, 38). En el estudio de Tejedor et al (31), el porcentaje de diagnóstico genético en los 252 pacientes con 8 o más puntos en la escala Medped holandesa fue del 68 %, siendo probable que el resto de pacientes a los que no se les encontró ninguna mutación por cualquiera de los pasos de la plataforma, presentasen algún defecto en algunos de los nuevos genes que expresan un fenotipo similar a la HF pero que corresponden a otro tipo de patologías, como el gen de la ARH o hipercolesterolemia autosómica recesiva (39), los genes ABCG5 y ABCG8 de la sitosterolemia (40), el gen PCSK9 (41) y el gen CYP7A1 (42).

5.2 Perspectivas futuras

En este informe, únicamente se ha abordado la utilización de las micromatrices de ADN en el diagnóstico genético de la HF, no habiendo variado su situación en la literatura científica desde el último informe realizado por la Agencia Andaluza de ETS (32). Sin embargo, debido a que en los últimos meses se ha implantado el diagnóstico genético de esta patología en Aragón, Asturias, Extremadura, Navarra y País Vasco, además de en ocho hospitales de otras seis autonomías, es de esperar que en breve aparecerán publicados los resultados de los mismos, siendo importante su evaluación para poder incorporar sus conclusiones a una futura actualización de este informe.

Otro punto importante sería abordar la evaluación de una hipotética puesta en marcha de un cribado genético de HF en nuestra Comunidad, siendo preciso analizar las experiencias previas de cribado en otros países, sus posibles repercusiones sobre la salud, los criterios de selección de pacientes susceptibles de ser incluidos en el cribado, el análisis de los diferentes modelos posibles, los aspectos éticos, sociales y legales y una estimación de los recursos necesarios. Con respecto a este último punto, está prevista la publicación de un estudio coste-efectividad por parte de Juan Oliva, profesor de Economía de la Salud de la Universidad Carlos III de Madrid. Datos preliminares no publicados apuntan que el coste por año de vida ganado con la detección genética y el tratamiento de la HF en España sería de unos 5.900 euros, con lo que sería un procedimiento rentable y eficiente para el sistema sanitario y más barato que en Holanda (8.700 euros) donde ya existe desde 2003 un plan nacional de detección genética de la HF.

Por último, y teniendo en cuenta los rápidos avances de la genética molecular y su traducción en el desarrollo de nuevas pruebas genéticas susceptibles de ser incorporadas a la cartera de servicios de los diferentes servicios de salud, sería importante establecer un “Marco para la evaluación de pruebas genéticas”, similar al establecido por la Comunidad Autónoma de Andalucía (43), que establezca las bases para una adecuada evaluación de las mismas y ayude a los responsables políticos en la toma de decisiones.

6 CONCLUSIONES

- La hipercolesterolemia familiar es un trastorno debido a mutaciones en el gen que codifica el receptor de las LDL, que se trasmite de forma autosómica dominante y que afecta aproximadamente a uno de cada 500 personas en la población general.
- La importancia de su diagnóstico radica en que las personas afectas presentan una elevada frecuencia de enfermedad coronaria prematura, reduciéndose de forma importante su expectativa de vida. No existen criterios clínicos específicos con un valor predictivo absoluto para el diagnóstico de HF, siendo el sistema de puntuación MedPed el más utilizado. El diagnóstico genético permite demostrar defectos funcionales en el gen del receptor LDL, constituyendo la confirmación definitiva del diagnóstico.
- La tecnología de micromatrices de ADN multigénicas parece constituir una técnica con alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico genético de la HF, pudiendo ser una alternativa más rápida y menos costosa que las actualmente utilizadas. Sin embargo, la existencia de un único artículo que aborde la efectividad de este nuevo procedimiento diagnóstico, hace que los resultados deban considerarse no concluyentes, necesitándose su confirmación mediante posteriores estudios.

7 RECOMENDACIONES

- La escasa información disponible hasta el momento acerca de la técnica de micromatrices de ADN para el diagnóstico genético de la HF (Lipochip[®]) hace que no pueda recomendarse su utilización, al menos de forma generalizada, hasta que la publicación de nuevos estudios confirmen o rechacen su aparente validez analítica y clínica.
- Antes de una hipotética puesta en marcha de un cribado genético de HF en nuestra Comunidad Autónoma, sería preciso evaluar experiencias previas en otros países, criterios de selección de pacientes, los diferentes modelos de cribado posibles, sus aspectos éticos, sociales y legales y una estimación de los costes relacionados con su repercusión en la salud.
- Por otra parte, el rápido desarrollo de nuevas pruebas genéticas, susceptibles todas ellas de ser incorporadas a nuestra cartera de servicios, hace necesario el establecimiento en nuestra Comunidad de un “Marco general de evaluación de pruebas genéticas” que establezca las bases para una adecuada evaluación de las mismas y ayude a los responsables políticos a la toma de decisiones.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Human Genetic Program. Familial Hypercholesterolemia, report of a second WHO Consultation. WHO publication n° WHO/HGN/FH/CONS/99.2, 1999.
2. Pocovi M, Castillo S. Genética de las hipercolesterolemias familiares. Métodos de diagnóstico. Cardiovascular Risk Factors 2002; 11: 144-156.
3. University College Of London. The low density lipoprotein receptor (LDLR) gene in familial hypercholesterolemia. Disponible en: <http://www.ucl.ac.uk/fh/>.
4. Graham CA, McIlhatton BP, Kirk CW, Beattie ED, Lyttle K, Hart P, et al. Genetic screening protocol for familial hypercholesterolemia which includes splicing defects gives an improved mutation detection rate. Atherosclerosis. 2005 Oct;182(2):331-40.
5. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. J Clin Invest. 1973 Jul;52(7):1544-68.
6. Mabuchi H, Haba T, Ueda K, Ueda R, Tatami R, Ito S, et al. Serum lipids and coronary heart disease in heterozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku District of Japan. Atherosclerosis. 1977 Dec;28(4):417-23.
7. Heiberg A, Berg K. The inheritance of hyperlipoproteinaemia with xanthomatosis. A study of 132 kindreds. Clin Genet. 1976 Feb;9(2):203-33.
8. Andersen GE, Lous P, Friis-Hansen B. Screening for hyperlipoproteinemia in 10,000 Danish newborns. Follow-up studies in 522 children with elevated cord serum VLDL-LDL-cholesterol. Acta Paediatr Scand. 1979 Jul;68(4):541-5.
9. Kalina A, Csaszar A, Czeizel AE, Romics L, Szaboki F, Szalai C, et al. Frequency of the R3500Q mutation of the apolipoprotein B-100 gene in a sample screened clinically for familial hypercholesterolemia in Hungary. Atherosclerosis. 2001 Jan;154(1):247-51.
10. Moorjani S, Roy M, Gagne C, Davignon J, Brun D, Toussaint M et al. Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec Province. Arteriosclerosis. 1989 Mar-Apr;9(2):211-6.

11. Vuorio AF, Aalto-Setälä K, Koivisto UM, Turtola H, Nissen H, Kovanen PT, et al. Familial hypercholesterolaemia in Finland: common, rare and mild mutations of the LDL receptor and their clinical consequences. Finnish FH-group. *Ann Med*. 2001 Sep;33(6):410-21.
12. Seftel HC, Baker SG, Sandler MP, Forman MB, Joffe BI, Mendelsohn D et al. A host of hypercholesterolaemic homozygotes in South Africa. *Br Med J*. 1980 Sep 6;281(6241):633-6.
13. Slimane MN, Pousse H, Maatoug F, Hammami M, Ben Farhat MH. Phenotypic expression of familial hypercholesterolaemia in central and southern Tunisia. *Atherosclerosis*. 1993 Dec;104(1-2):153-8.
14. Rubinsztein DC, van der Westhuyzen DR, Coetzee GA. Monogenic primary hypercholesterolaemia in South Africa. *S Afr Med J*. 1994 Jun;84(6):339-44.
15. Gudnason V, Sigurdsson G, Nissen H, Humphries SE. Common founder mutation in the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolaemia in the Icelandic population. *Hum Mutat*. 1997;10(1):36-44.
16. Seftel HC, Baker SG, Jenkins T, Mendelsohn D. Prevalence of familial hypercholesterolemia in Johannesburg Jews. *Am J Med Genet*. 1989 Dec;34(4):545-7.
17. Mata P, Alonso R, Castillo S, Pocovi M; Spanish Group of Familial Hypercholesterolemia. MEDPED and the Spanish Familial Hypercholesterolemia Foundation. *Atheroscler Suppl*. 2002 Mar;2(3):9-11.
18. Descamps OS, Leysen X, Van Leuven F, Heller FR. The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2001 Aug;157(2):514-8.
19. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, Hopkins PN. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol*. 1993 Jul 15;72(2):171-6.
20. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. *BMJ* 1991;303:893-6.
21. Defesche J. Familial Hypercholesterolemia. In: Betteridge J, editor. *Lipids and vascular disease*. London: Martin Dunitz; 2000;6:65-76.
22. Gotto AM Jr. Management of dyslipidemia. *Am J Med*. 2002 Jun 3;112 Suppl 8A:10S-18S.

23. Gordon BR, Saal SD. Current status of low density lipoprotein-apheresis for the therapy of severe hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol*. 1996 Dec;7(6):381-4.
24. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 2003 May;168(1):1-14.
25. Moreno V, Solé X. Uso de chips de ADN (microarrays) en medicina: fundamentos técnicos y procedimientos básicos para el análisis estadístico de resultados. *Med Clin (Barc)* 2004; 122(Supl 1): 73-9.
26. Food and Drug Administration (FDA). Draft Guidance for Industry and FDA Staff Pharmacogenetic Tests and Genetic Tests for Heritable Markers. Documento publicado el 9 de febrero de 2006. Disponible en: <http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1549.pdf>.
27. Chaves FJ, Real JT, Garcia-Garcia AB, Puig O, Ordovas JM, Ascaso JF et al. Large rearrangements of the LDL receptor gene and lipid profile in a FH Spanish population. *Eur J Clin Invest*. 2001 Apr;31(4):309-17.
28. Heath KE, Day IN, Humphries SE. Universal primer quantitative fluorescent multiplex (UPQFM) PCR: a method to detect major and minor rearrangements of the low density lipoprotein receptor gene. *J Med Genet*. 2000 Apr;37(4):272-80.
29. Jovell AJ, Navarro-Rubio MD. Evaluation of scientific evidence. *Med Clin (Barc)*. 1995 Dec 2;105(19):740-3.
30. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al; Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *BMJ*. 2003 Jan 4;326(7379):41-4.
31. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jimenez E, Lopez M, Tejedor MT, et al. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem*. 2005 Jul;51(7):1137-44.
32. Villegas R. Briones E. Diagnóstico genético de la hipercolesterolemia familiar mediante Lipochip®. Informe Corto. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. Disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/salud/orgdep/aetsa/pdf/Lipochip_def1.pdf.
33. Mozas P, Castillo S, Tejedor D, Reyes G, Alonso R, Franco M et al. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. *Hum Mutat*. 2004 Aug;24(2):187.

34. Kotze MJ, Kriegshauser G, Thiart R, de Villiers NJ, Scholtz CL, Kury F, et al. Simultaneous detection of multiple familial hypercholesterolemia mutations facilitates an improved diagnostic service in South african patients at high risk of cardiovascular disease. *Mol Diagn.* 2003;7(3-4):169-74.
35. Chaves FJ, Real JT, Garcia-Garcia AB, Civera M, Armengod ME, Ascaso JF, et al. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in a South European outbreed population: influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations on treatment response to simvastatin in total, LDL, and high-density lipoprotein cholesterol. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4926–32.
36. Civeira F, International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004;173:55–68.
37. Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Comparison of the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. The Familial Hypercholesterolaemia Regression Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3092–101.
38. Yu W, Nohara A, Higashikata T, Lu H, Inazu A, Mabuchi H. Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population. *Atherosclerosis* 2002;165:335–42.
39. Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* 2001;292:1394-98.
40. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290:1771-5.
41. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154-6.
42. Schwartz M, Lund EG, Russel DW. Two alfa-hydroxylase enzymes in bile acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:113-8.
43. Márquez Calderón S, Briones Pérez de la Blanca E. Marco para la evaluación de las pruebas genéticas en el Sistema Sanitario Público de Andalucía. Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, 2005. Informe 2/2005.

9 GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADNc: ADN sintetizado a partir de un ARN molde; a menudo es utilizado como sonda de ADN para determinar la secuencia de nucleótidos (bases) de una molécula de ADN o ARN.

ADN COMPLEMENTARIO: ver ADNc.

AMPLIFICACIÓN PCR: ver Reacción en cadena de polimerasa.

ARRAY: ver Matriz, es una forma abreviada para referirse a los microarrays.

ARRAYER: Robot diseñado para la fabricación de micromatrices.

BIOCHIP: Uno de los primeros términos empleados para referirse a las micromatrices de material biológico. En la actualidad este término se emplea para referirse a los chips fabricados con la tecnología de posicionamiento electrónico de la empresa Nanogen y en ocasiones también se usa al hablar de los GENECHIPS.

BIODISPOSITIVO: aplicación de dispositivos electrónicos en los seres vivos (por ejemplo, los implante cocleares).

BIOSENSOR: Dispositivos miniaturizados que reconocen un analito en una muestra e interpretan su presencia gracias a una combinación de sistemas biológicos y físico-químicos.

BIOTECNOLOGÍA: Conjunto de técnicas biológicas desarrolladas y aplicadas a la investigación y desarrollo de productos.

CLONACIÓN DE ADN: Proceso de creación de múltiples copias de una única molécula de ADN.

CLUSTERING: Técnica de análisis de datos en la que se agrupan las observaciones según su similitud. Se pueden emplear distintos coeficientes de similitud: Correlación de Pearson, Coseno, Distancia Euclídea y diferentes algoritmos: UPGMA, Ward, Jerárquicos, basados en la K-Media....

DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS: electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente.

DNA ARRAY: ver micromatriz de ADN.

DNA CLONING: ver Clonación de ADN.

DNA MICROARRAY: ver micromatriz de ADN.

DNA PROBE: ver Sonda de ADN.

ESCÁNER: dispositivo que permite la lectura de las matrices de material biológico. Detecta las emisiones de las moléculas marcadoras presentes en los ensayos. En general son escáneres de fluorescencia que son capaces de emitir un haz láser que excita los fluorocromos presentes en la matriz induciendo la liberación de fotones en una distinta longitud de onda para su detección.

ELECTROFORESIS: Método empleado para separar una mezcla de moléculas grandes, tales como fragmentos de ADN o proteínas, haciendo pasar una corriente eléctrica a través de un gel que contiene las muestras que se desea separar.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN: Una enzima de origen bacteriano que reconoce secuencias específicas y corta la molécula de ADN en el sitio de reconocimiento.

GENECHIP: Micromatrices comerciales fabricadas mediante técnicas fotolitográficas por la empresa Affymetrix. Pese a ser una denominación comercial en ocasiones es empleada para referirse de forma genérica a las técnicas de micromatrices de material genético.

GENÉTICA: Ciencia de la herencia y la variación; estudia los patrones de herencia de rasgos específicos.

GENÓMICA: Estudio de todo el ADN contenido en un organismo o una célula.

HIBRIDACIÓN: Proceso de reconocimiento y unión entre moléculas complementarias. Proceso en el que se incuban conjuntamente las muestras y las matrices.

HIBRIDACIÓN IN SITU: Detección de una secuencia específica de ARN en células utilizando una sonda de ADN marcado y complementario con la secuencia de ARN que se pretende detectar.

INK-JET: Sistema de inyección de tinta desarrollado para la liberación de minúsculas cantidades de un fluido.

LABCHIP: Dispositivos miniaturizados para la realización de ensayos de laboratorio (PCR, cromatografía, electroforesis, citometría de flujo)

MACROARRAY: Ver macromatriz

MACROMATRIZ: Se define como macromatriz a aquellas matrices de material biológico cuyo tamaño de los puntos es superior a las 500 μm .

MAPEO GÉNICO: Determinación de la posición relativa de los genes sobre una molécula de ADN (usualmente un cromosoma) y la distancia entre ellos.

MATRIZ: Término referido a la ordenación de elementos (material biológico) con una secuencia conocida en unas posiciones conocidas y predeterminadas sobre un soporte sólido. En función del tamaño reciben diferentes nombres.

MICROARRAY: Ver Micromatriz.

MICROMATRIZ: Se define como micromatriz a aquellas matrices de material biológico cuyo tamaño de los puntos es inferior a las 500 μm . Son dispositivos miniaturizados en los que se integran decenas de miles de sondas de material biológico genético.

MICROMATRIZ DE ADN: Matrices bidimensionales en las que se integran ADNc utilizadas para analizar muestras de ADN en cuanto a la presencia de variaciones de secuencia o patrones de expresión génica.

MUESTRA: Material biológico solubilizado que se analiza mediante reacciones de afinidad.

NORTHERN BLOT: Técnica de análisis de ARN; las moléculas de ARN son separadas por tamaño (electroforesis) y transferidas a una membrana, para a continuación detectar secuencias específicas por medio de sondas marcadas de ADN complementario.

PCR: ver Reacción en cadena de la polimerasa.

QMPSF: PCR multiplex cuantitativa de pequeños fragmentos fluorescentes

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: Técnica mediante la cual una secuencia corta de ADN o ARN es copiada muchas veces con el fin de facilitar el análisis o la detección de una secuencia específica.

SECUENCIACIÓN DE ADN: Determinación del orden de nucleótidos (bases) en una muestra pura de moléculas de ADN.

SINGLE-STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM (SSCP): polimorfismo conformacional de cadena única.

SONDA: Material biológico que se deposita e inmoviliza sobre la superficie de una matriz.

SONDA DE ADN: Sonda en la que el material biológico es ADN. Son moléculas marcadas de ADNc utilizadas para detectar secuencias complementarias de nucleótidos (bases) de otras cadenas de ADN o ARN.

SOUTHERN BLOT: Técnica de análisis de ADN en el que las moléculas de ADN son separadas por tamaño (electroforesis) y transferidas a una membrana, para a continuación detectar secuencias específicas por medio de sondas marcadas de ADN complementario.

VECTOR DE ADN: Molécula de ADN utilizada para introducir ADN exógeno en células huésped. Se originan a partir de plámidos bacterianos, víricos o de ADN de un organismo superior en el que otro fragmento de ADN puede ser integrado.

ANEXOS

Anexo 1. Bases documentales revisadas

- HTA: <http://www.nhscrd.york.ac.uk>
- MEDLINE ON LINE: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- EMBASE ON LINE: <http://194.224.36.209:8590>
- BASE DE DATOS COCHRANE: <http://www.update-software.com/Clibplus/ClibPlus.asp>
- IBECs (Índice Bibliográfico en Ciencias de la Salud): <http://bvs.isciii.es/E/bases.html>
- BIOMED CENTRAL: <http://www.biomedcentral.com>
- BASES DATOS ISI: <http://access.isiproducts.com/FECYT>
- DARE: <http://www.york.ac.uk/inst/crd/welcome.htm>
- NEED: <http://www.york.ac.uk/inst/crd/welcome.htm>

Anexo 2. Estrategias de búsquedas bibliográficas

Pubmed. National Library of Medicine (06.02.2006)

((("assay"[TIAB]) OR ("assays"[TIAB]) OR ("array"[TIAB]) OR ("arrays"[TIAB]) OR ("microassay"[TIAB]) OR ("microassays"[TIAB]) OR ("microarray"[TIAB]) OR ("microarrays"[TIAB]) OR ("biochip"[TIAB]) OR ("biochips"[TIAB]) OR ("chip"[TIAB]) OR ("chips"[TIAB]) OR ("multigene"[TIAB]) OR ("multigenes"[TIAB]) OR (mlpa) OR (ligation?dependent probe amplification)) AND (mutat*)) AND (("hypercholesterolemia, familial"[MeSH Terms]) OR ("lipoproteins, ldl"[MeSH Terms]) OR ("low density lipoproteins"[Title/Abstract]) OR ("hypercholesterolemia"[Title/Abstract]) OR ("lipoproteins, ldl cholesterol"[MeSH Terms]))) AND (((("adn"[TIAB]) OR ("dna [TIAB]) OR (gene*)) AND ((screen*) OR (test*) OR (diagnos*)))

71

Embase (06.02.2006)

38	#37 AND #19	94
37	#36 AND #27	X
36	#31 AND #35	182,813
35	#32 OR #33 OR #34	740,870
34	diagnos*: ab,ti AND [2000-2006]/py	338,503
33	test*: ab,ti AND [2000-2006]/py	406,157
32	screen*: ab,ti AND [2000-2006]/py	100,262
31	#28 OR #29 OR #30	794,581
30	gene*: ab,ti AND [2000-2006]/py	721,516
29	dna: ab,ti AND [2000-2006]/py	157,892
28	adn: ab,ti AND [2000-2006]/py	111
27	#22 OR #23 OR #24 OR #25 OR #26	25,096
26	lipoproteins: ab,ti AND ldl: ab,ti AND [2000-2006]/py	2,214
25	hypercholesterolemia: ab,ti AND [2000-2006]/py	4,472
24	('low density lipoprotein cholesterol'/exp OR 'low density lipoprotein cholesterol') AND [embase]/lim AND [2000-2006]/py	11,087
23	('low density lipoprotein'/exp OR 'low density lipoprotein') AND [embase]/lim AND [2000-2006]/py	21,380
22	('familial hypercholesterolemia'/exp OR 'familial hypercholesterolemia') AND [embase]/lim AND [2000-2006]/py	1,086
21	#19 AND #20	9,140
20	mutant*: ab,ti AND [2000-2006]/py	76,291
19	#1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5 OR #7 OR #8 OR #9 OR #10 OR #11 OR #12 OR #13 OR #14 OR #15 OR #16 OR #17	164,754
17	ligation: ab,ti AND dependent: ab,ti AND probe: ab,ti AND amplification: ab,ti AND [2000-2006]/py	74
16	mlpa: ab,ti AND [2000-2006]/py	72
15	multigenes: ab,ti AND [2000-2006]/py	13
14	multigene: ab,ti AND [2000-2006]/py	958
13	chips: ab,ti AND [2001-2006]/py	1,757

12	chip: ab,ti AND [2000-2006]/py	3,852
11	biochips: ab,ti AND [2000-2006]/py	176
10	biochip: ab,ti AND [2000-2006]/py	185
9	microassays: ab,ti AND [2000-2006]/py	18
8	microarray: ab,ti AND [2000-2006]/py	12,767
7	microarrays: ab,ti AND [2000-2006]/py	6,632
5	microassay: ab,ti AND [2000-2006]/py	89
4	arrays: ab,ti AND [2000-2006]/py	7,043
3	array: ab,ti AND [2000-2006]/py	18,107
2	assays: ab,ti AND [2000-2006]/py	48,150
1	assay: ab,ti AND [2000-2006]/py	89,384

Web of Science / ISI (06.02.2006)

<input type="checkbox"/>	#12	43	#11 OR #9 <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#11	2	#10 AND #8 <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#10	83	TS=(ligation SAME dependent SAME probe SAME amplification) <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#9	43	TS=(#8 AND (assay* OR array* OR microarray* OR microassay* OR biochip* OR chip* OR multigene* OR mlpa)) <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#8	205	#7 AND #6 <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#7	49,425	TS=((screen* OR test* OR diagnos*) AND (adn OR dna)) <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#6	24,518	#5 OR #4 OR #3 OR #2 OR #1 <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#5	6,355	TS=(hypercholesterolemia) <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#4	9,536	TS=(lipoprotein* SAME cholesterol) <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#3	16,773	TS=(low SAME density SAME lipoprotein*) <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
<input type="checkbox"/>	#2	5,993	TS=(lipoprotein* SAME LDL) <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>

<input type="checkbox"/>	#1	1,436	TS=(hypercholesterolemia SAME familial) <i>DocType=All document types; Language=All languages; Database=SCI-EXPANDED; Timespan=2000-2005</i>
--------------------------	----	-----------------------	---

Current Contents (06.02.2006)

La misma búsqueda proporcionó **40** resultados.

Anexo 3. Clasificación de la evidencia científica

Clasificación de la evidencia científica (modificado por Jovell*)		
Nivel	Tipo de diseño	Condiciones de rigurosidad científica
I	Meta-análisis de ensayos controlados y aleatorizados.	No heterogeneidad. Diferentes técnicas de análisis. Metarregresión. Mekaanálisis. No heterogeneidad. Calidad de los estudios.
II	Ensayo controlado y aleatorizado de muestra grande.	Evaluación del poder estadístico. Multicéntrico. Calidad del estudio.
III	Ensayo controlado y aleatorizado de muestra pequeña.	Evaluación del poder estadístico. Calidad del estudio.
IV	Ensayo prospectivo controlado no aleatorizado.	Controles coincidentes en el tiempo. Multicéntrico. Calidad del estudio.
V	Ensayo prospectivo controlado no aleatorizado.	Controles históricos. Calidad del estudio.
VI	Estudios de cohorte.	Multicéntrico. Apareamiento. Calidad del estudio.
VII	Estudios de casos y controles.	Multicéntrico. Calidad del estudio.
VIII	Series clínicas no controladas. Estudios descriptivos: vigilancia epidemiológica, encuestas, registros, bases de datos, Comités de expertos.	Multicéntrico.
IX	Anécdotas o casos clínicos.	

*Jovell AJ, Navarro- Rubio MD. Evaluación de la evidencia científica. Med Clin (Barc) 1995; 105: 740-743.

