

# Cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC)

Uso y utilidad en el genotipado  
masivo

Denaturing high performance  
liquid chromatography  
(DHPLC).

Use and utility in massive  
genotyping. *Executive abstract*

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN 2007

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO

AETSA 2006/07





# Cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC)

Uso y utilidad en el genotipado  
masivo

Denaturing high performance  
liquid chromatography  
(DHPLC).

Use and utility in massive  
genotyping. *Executive abstract*

Caballero Villaraso, Javier

Cromatografía líquida desnaturizante de alto rendimiento (DHPLC). Uso y utilidad en el genotipado masivo = Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) Use and utility in massive genotyping. / Javier Caballero Villaraso y Román Villegas Portero].— Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía; Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007.

77 p.; 24 cm.

1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA 2. CRIBADO GENÉTICO I. Villegas Portero, Román II. Andalucía. Agencia de Evaluación de ecnologías Sanitarias III. España. Ministerio de Sanidad y Consumo

Autores: Javier Caballero Villaraso y Román Villegas Portero, Antonio Oly de Labry Lima<sup>1</sup> Leticia García Mochón<sup>1</sup> y Clara Bermúdez Tamayo<sup>1</sup>. <sup>1</sup> *Escuela Andaluza de Salud Pública*

Revisores: José Antonio Navarro Caballero, Belén Corbacho Martín y Sergio Márquez Peláez.

Dirección Técnica: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía.

Este documento se ha realizado en el marco de colaboración previsto en el Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud, al amparo del convenio de colaboración suscrito por el Instituto de Salud Carlos III, organismo autónomo del Ministerio de Sanidad y Consumo, y la Fundación Progreso y Salud de Andalucía

Edita:

Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía

Avda. de la Innovación s/n

Edificio Renta Sevilla, 2ª planta

41020 Sevilla

España – Spain

© de la presente edición: Ministerio de Sanidad y Consumo.

© de los contenidos: Consejería de Salud – JUNTA DE ANDALUCÍA

ISBN: 978-84-96-990-01-2

NIPO: 354-07-047-5

Depósito Legal: SE-1.193/08

Imprime: Tecnographic, S.L.

Este documento puede ser reproducido en todo o en parte, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia

# Cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC)

Uso y utilidad en el genotipado  
masivo

Denaturing high performance  
liquid chromatography  
(DHPLC).

Use and utility in massive  
genotyping. *Executive abstract*



MINISTERIO  
DE SANIDAD  
Y CONSUMO



Ministerio de Sanidad y Consumo

AIE Agencia de Evaluación  
de Tecnologías Sanitarias





## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses que puedan competir con el interés primario y los objetivos de este informe e influir en su juicio profesional al respecto.



# Índice

Índice de Tablas y Figuras	11
Abreviaturas	13
Resumen ejecutivo	15
Executive abstract	17
Introducción	19
Descripción de la tecnología	19
Fundamento de la DHPLC	20
Limitaciones, ventajas e inconvenientes de la DHPLC	21
Genes y patologías para posible utilización de DHPLC	22
Contexto y justificación del informe	25
Material y Métodos	27
Revisión sistemática de la literatura	28
Valoración crítica de los estudios seleccionados	30
Síntesis de los resultados de la revisión sistemática de la literatura	30
Evaluación económica	30
Costes	32
Efectividad	32
Análisis económico	33
Resultados	35
Revisión sistemática de la literatura sobre la efectividad de la DHPLC	35
Selección de artículos	35
Descripción de los artículos seleccionados según los criterios de inclusión.	36
Valoración crítica de los estudios seleccionados	38
Evaluación económica	47
Análisis de sensibilidad	49

Discusión	53
Conclusiones	59
Referencias	61
Anexos	69

# Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1.	Criterios de selección de artículos sobre oncogenes	29
Tabla 2.	Criterios de selección de artículos sobre enfermedades mitocondriales	30
Tabla 3.	Resumen de costes de las estrategias diagnósticas	32
Tabla 4.	Valores de sensibilidad y especificidad de la DHPLC	33
Tabla 5.	Número de artículos inicialmente recuperados	35
Tabla 6.	Número de artículos en cada fase de selección	35
Tabla 7 (I).	Artículos seleccionados sobre oncogenes BRCA 1 y BRCA 2	39
Tabla 7 (II).	Artículos seleccionados sobre oncogenes BRCA 1 y BRCA 2	40
Tabla 7 (III).	Artículos seleccionados sobre oncogenes BRCA 1 y BRCA 2	41
Tabla 8.	Artículos seleccionados sobre oncogén APC	42
Tabla 9.	Artículos seleccionados sobre oncogén RET	42
Tabla 10.	Artículos seleccionados sobre enfermedades mitocondriales	43
Tabla 11 (I).	Artículos seleccionados que cuantificaron los resultados	44
Tabla 11 (II).	Artículos seleccionados que cuantificaron los resultados	45
Tabla 11 (III).	Artículos seleccionados que cuantificaron los resultados	46
Tabla 12:	Análisis coste efectividad de las alternativas para el análisis de muestra portadoras de mutaciones genéticas	48
Figura 1.	Algoritmo actual en el diagnóstico de cáncer familiar.	27
Figura 2.	Algoritmo diagnóstico actual en enfermedades mitocondriales	28
Figura 3.	Árbol de decisión de la estrategia diagnóstica mediante DHPLC	32
Figura 4	Esquema de revisión	36
Figura 5.	Medida de efectividad = casos encontrados	47
Figura 6.	Medida de efectividad = casos efectivos	48
Figuras 7 y 8	Análisis de sensibilidad de una vía modificando los costes de las pruebas	49
Figuras 9 y 10.	Análisis de sensibilidad de una vía modificando la prevalencia y la sensibilidad del DHPLC	50
Figuras 11 y 12.	Análisis de sensibilidad de una vía modificando los costes de las pruebas	51
Figuras 13 y 14.	Análisis de sensibilidad de una vía modificando la prevalencia y la sensibilidad del DHPLC	51



## Abreviaturas

CSGE: Electroforesis en gel sensible a conformación

EMMA: Análisis mutacional de mismatch incrementado

EMD: Detección enzimática de mutación

FAMA: Análisis de mismatch asistido por fluorescencia

DGGE: Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante

DHPLC: Cromatografía líquida desnaturizante de alto rendimiento

DS: Secuenciación directa

HA: Análisis de heterodúplex

ICER: Ratio coste-efectividad incremental

MLPA: Técnica de hibridación, ligación y amplificación múltiple

PTT: Test de truncamiento de proteínas

SSCP: Análisis conformacional de cadena sencilla

TDGS: Escaneo bidimensional de gen



# Resumen ejecutivo

**Título:** Cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC).

**Autores:** Javier Caballero Villarraso y Román Villegas Portero

**Antecedentes y justificación:** Los continuos y progresivos avances en el conocimiento del genoma humano y sus posibles alteraciones, así como sus influencias en los estados de salud y enfermedad, han redundado en la incorporación de nuevas pruebas genéticas en la cartera de servicios de los laboratorios clínicos; esto, sumado a la creciente solicitud de pruebas genéticas al uso, ha incrementado la actividad de dichos laboratorios. Parte de ella la compone la detección de variantes genéticas, las cuales pueden precisar en ciertos casos, la secuenciación directa del DNA para su diagnóstico de certeza. El incremento de demanda de estas pruebas, plantea el empleo de técnicas de cribado de variantes genéticas, a fin de disminuir el número de casos objeto de secuenciación de DNA.

**Objetivos:** El objetivo global será plantear la pertinencia y viabilidad de implantación de la DHPLC en ámbitos clínicos asistenciales, para su empleo como herramienta de diagnóstico genético. A tal efecto se explorarán los actuales usos diagnósticos de la DHPLC, atendiendo a su utilización en los oncogenes *BRCA 1*, *BRCA 2*, *APC*, *RET* y genes relacionados con encefalomiopatías mitocondriales. Se valorarán la validez analítica y clínica de dicha técnica y se plantearán las posibles consecuencias de su introducción en entornos asistenciales, orientando estos datos a una ulterior evaluación económica. Dicha evaluación consistirá en considerar la ratio coste-efectividad incremental (ICER) como medida de resultado y comparar los diferentes ICERs de las estrategias de detección de variantes en los genes anteriormente citados.

**Metodología:** Revisión sistemática de la literatura en las bases de datos referenciales MEDLINE y EMBASE, recuperando los artículos que observaron el uso de DHPLC en el análisis de los oncogenes *BRCA 1*, *BRCA 2*, *APC*, *RET* y genes relacionados con enfermedades mitocondriales. Los estudios encontrados se evaluaron siguiendo las recomendaciones para estudios de pruebas diagnósticas de la iniciativa STARD, así como recomendaciones de diferentes instituciones para evaluar pruebas genéticas. Se procedió a una posterior selección de artículos, recuperando aquéllos que

mostraban resultados cuantitativos; dichos artículos fueron evaluados según la guía CASPe. Para la evaluación económica se diseñó un análisis coste-efectividad utilizando un modelo determinístico a través de un árbol de decisión; la estrategia seguida a tal fin consistió en comparar el cribado con DHPLC frente a la secuenciación sistemática (considerada ésta como patrón de oro).

**Resultados:** De 286 artículos obtenidos en la búsqueda, sólo se han seleccionado 61 que cumplen los criterios de inclusión. Se ha observado una gran heterogeneidad en los artículos, no sólo por la diversidad de genes propuestos, sino por la adicional variedad de diseños y resultados. La mayoría de ellos eran estudios transversales. Con la segunda selección, resultó un total de 18 artículos que, tras evaluarse con la guía CASPe, obtuvieron una puntuación entre 7 y 9 (sobre 10). En general, las sensibilidades de la DHPLC observadas fueron próximas al 100%. En cuanto a la valoración económica, las medidas de efectividad utilizadas fueron el número de casos encontrados y de casos efectivos (diferencia entre los casos encontrados y los casos perdidos). Tras extraer los costes de la literatura, se consideró el ratio coste-efectividad incremental (ICER) como medida de resultado. Se observó un ICER de 278,13€ para los casos encontrados y de 139,07€ para los casos efectivos, al comparar la DHPLC con la secuenciación. Los análisis de sensibilidad mostraron que en el supuesto de que la prevalencia de muestras con mutaciones genéticas superara el 82% para los casos efectivos y el 85% para los casos encontrados, la secuenciación sería la estrategia con mejor ICER; por el contrario, con porcentajes inferiores la DHPLC mantiene el mejor ICER.

**Conclusiones:** La DHPLC muestra en la actualidad un amplio espectro de utilidades en el estudio molecular de multitud de genes, incluido el análisis para diagnóstico clínico. Entre otros, se utiliza para la detección de variantes en los oncogenes *BRCA 1*, *BRCA 2*, *APC*, *RET* y genes relacionados con enfermedades mitocondriales. La posible incorporación de la DHPLC en laboratorios clínicos para cribado de mutaciones genéticas, podría incidir en la disminución del número de muestras a las que realizar secuenciación de DNA. Al plantear dicha estrategia de cribado hay que considerar que la secuenciación sistemática de DNA resulta más costosa (con un ICER de 278,13€) pese a ser más efectiva (lo cual es obligado al tratarse del patrón de oro).

# Executive summary

**Title:** Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC).

**Authors:** Javier Caballero Villarraso and Román Villegas Portero.

**Background:** Continuous and progressive advances on human genome's knowledge as well as on its influences on health and disease have resulted in adding new genetic tests to clinical lab services. In addition to this, the growing request for genetic tests to be used has increased these labs' activities. Part of their tasks is composed of detecting genetic variants which can specify, in some cases, DNA direct sequencing for an accurate diagnostics. Demand's increase involves using techniques to screen genetic variants with the purpose of decreasing the number of cases subject to DNA sequencing.

**Objectives:** The overall objective is dealing with appropriateness and viability to implant DHPLC in clinical care areas to be used as genetic diagnostic tool. For that purpose, current diagnostic uses of DHPLC are further studied addressing its use in *BRCA 1*, *BRCA 2*, *APC*, *RET* oncogenes and genes related to mitochondrial encephalomyopathies. The analytical and clinical validity of such technique is being assessed; and the possible consequences of its introduction in care areas are being dealt with by guiding these data towards a subsequent economic assessment. The evaluation is consisting in considering incremental cost-effectiveness ratio (ICER) as result measure and in comparing different ICER of strategies to detect variants in the before mentioned genes.

**Methodology:** Systematic review of literature was run on MEDLINE and EMBASE reference data bases. There were retrieved the papers that dealt with the use of DHPLC in the analysis of *BRCA 1*, *BRCA 2*, *APC*, *RET*, oncogenes and genes related to mitochondrial diseases. The papers found were assessed following the advices on diagnostic tests by the STARD initiative, as well as recommendations by different institutions on assessing genetic tests. Afterwards the papers were selected, and those showing quantitative results were retrieved. The papers were assessed according to CASPe guidelines. For the economic assessment, a cost-effectiveness analysis was designed by using a deterministic model through a decision tree; the strategy followed for that purpose consisted in comparing screening with DHPLC as opposed to systematic sequencing (which was considered as gold-standard)

**Results:** Only 61 out of the 286 papers found were selected that met the inclusion criteria. Great variety was observed in the papers not only for diversity in the genes proposed in the present study but also for variety in designs and results. Most of them were transversal studies. A second selection got a total amount of 18 papers that, after being assessed with CASPe guidelines, achieved a score between 7 and 9 (out of 10). Generally speaking, DHPLC sensitivity observed were next to 100%. As regards to the economic assessment, the effectiveness measures used were the number of cases found and the number of effective cases (difference between cases found and cases lost). After extracting costs from literature, the incremental cost-effectiveness ratio (ICER) was considered as result measure. It was observed that ICER reached 278.13€ for the cases found and 139.07€ for effective cases when comparing DHPLC with sequencing. Sensitivity analysis showed in case the prevalence of the gene mutation samples overpassed 82% for effective cases and 85% for the cases found, the sequencing would be the strategy with the best ICER. However, if lower percentages were the case, DHPLC would maintain the best ICER.

**Conclusions:** DHPLC shows nowadays a wide range of utilities in the molecular study of a multiplicity of genes, including the analysis for clinical diagnostics. Among others, it is used to detect variants in *BRCA 1*, *BRCA 2*, *APC*, *RET* oncogenes and genes related to mitochondrial diseases. The possible introduction of DHPLC in clinical labs to screen genetic mutations sequences could influence the decrease in number of samples to which DNA sequencing will be performed. When such screening strategy is raised, there must be taken into account that DNA systematic sequence costs more (ICER: 278.13€) despite being more effective (which is mandatory as it is about the gold-standard).

# Introducción

Se han identificado variantes en la secuencia de ciertos genes, que confieren susceptibilidad de padecer enfermedades multifactoriales comunes, como son las enfermedades oncológicas, metabólicas, cardiovasculares y neurológicas. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) son las variaciones más frecuentes del genoma humano, aunque sólo un pequeño porcentaje de ellos origina cambios relevantes en la secuencia de aminoácidos.

Para una precisa detección y definición de mutaciones, el método de elección sería la secuenciación directa. Dicho método posee los inconvenientes de ser laborioso y presentar un elevado coste; además la mayoría de reacciones de secuenciación excluyen únicamente la presencia de una mutación aislada. Con objeto de soslayar dichos inconvenientes, se han desarrollado métodos de cribado previos a la secuenciación, de menor coste, que excluirían la presencia de mutaciones. De este modo, se puede evitar secuenciar casos sospechosos que posteriormente no se confirman, lo cual supone de un 84 a un 86% de las secuenciaciones (1).

No obstante, dichos métodos de cribado aportan escasa información de la naturaleza y localización de la variación de la secuencia nucleotídica en el fragmento del gen mutado. La mayoría de los métodos, tales como el análisis conformacional de cadena sencilla (SSCP), electroforesis de heterodúplex en gel y electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) presentan una alta especificidad; por el contrario, la sensibilidad es baja.

En consecuencia, un método idóneo para la selección de casos a secuenciar, debe poseer alta sensibilidad, no presentar interferencias con determinadas mutaciones, estar automatizado y ofrecer un rendimiento alto en el procesamiento de la muestra. La cromatografía líquida desnaturante de alto rendimiento (DHPLC), desarrollada en 1995, podría cumplir todas las premisas mencionadas (2,3).

## Descripción de la tecnología

La cromatografía líquida (LC) es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En la LC, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene la fase fija. La fase fija o fase estacionaria es inerte física y químicamente y puede ser un sólido, de

diferentes propiedades químicas; en función de éstas, resultan diferentes tipos de cromatografía (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase reversa, etc). La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad.

Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de la fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluyera la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (High Performance Liquid Chromatography), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas y se utiliza fundamentalmente para el análisis de sustancias aminoproteicas. La HPLC desnaturante o DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) sería una técnica de determinación derivada de la anterior, basada en una columna de elución de fase reversa, y utilizada para la separación diferencial de secuencias nucleotídicas, previa a la cual (como su nombre indica) precisa la desnaturación de la muestra a analizar mediante temperatura (4).

## Fundamento de la DHPLC

Tras la extracción del DNA objeto del estudio, se amplifica el fragmento de gen concreto mediante PCR; posteriormente, se realiza una desnaturación a 95°C durante tres minutos, seguida de una disminución paulatina de la temperatura de 95 °C a 65°C durante 30 minutos, permitiendo así que las hebras de DNA desnaturado (separadas) renaturalicen (vuelvan a unirse) lentamente.

Este proceso permite detectar las mutaciones (“mismatches”) en base a las diferentes uniones formadas en el proceso de renaturalización de los fragmentos de gen amplificados. Es decir, al renaturalizar lentamente se provoca la nueva formación de DNA (de doble hebra, por tanto), uniéndose las hebras exactamente igual que las originales (la doble hebra de DNA wild type "normal", por una parte, y la mutada por otra), denominadas homodúplex, y además se provoca la unión de combinaciones de las cadenas sentido y antisentido de cada homodúplex, para formar los llamados heterodúplex (2,3).

Por consiguiente, se puede afirmar que la DHPLC detecta las mutaciones según los diferentes homodúplex y heterodúplex originados a partir del fragmento de gen estudiado, tras el proceso de desnaturación-renaturalización. Los heterodúplex, que son más termolábiles que sus correspondientes homodúplex, se separan por cromatografía líquida de fase

reversa, que trabaja entre un rango de 50-70. Las moléculas de doble cadena de DNA se retienen según su longitud. La elución de las moléculas de DNA se logra haciendo pasar por la columna acetonitrilo (solvente orgánico) que es la fase móvil; como resultado se produce la desorción de los iones anfifílicos y moléculas de DNA. Dicha elución se detecta con un sensor de radiación ultravioleta a una absorbancia de 254 nm y, mediante un software apropiado, se traduce en la elaboración de un cromatograma.

El tiempo de retención de la doble cadena de DNA cambia con la temperatura de la columna. A temperatura  $<50^{\circ}\text{C}$  el orden de elución es estrictamente basado en la longitud de la doble cadena de DNA, en cambio a temperatura  $>50^{\circ}\text{C}$  las moléculas de DNA se desnaturalizan, separándose en dos cadenas simples complementarias. La desnaturalización en los heterodúplex es más extensa que la correspondiente a los homodúplex que tienen las bases perfectamente emparejadas; en consecuencia, los heterodúplex se retienen menos, eluyéndose de forma previa a los homodúplex. En el correspondiente cromatograma, esto se refleja como la presencia de uno o más picos adicionales, dependiendo del número de mutaciones (mismatches) que existan (2-4).

La inestabilidad térmica de los heterodúplex estará en función de los puentes de hidrógeno entre las bases que produzcan la mutación (bases no opuestas), tales como GT y GA, y de la influencia de la secuencia próxima. En la práctica, cualquier cambio en el cromatograma, incluyendo cambios sutiles, supone una sospecha diagnóstica orientando incluso acerca de la localización y naturaleza de la base o bases alteradas.

## Limitaciones, ventajas e inconvenientes de la DHPLC

El factor más importante capaz de interferir la sensibilidad de la DHPLC en la detección de mutaciones, es la temperatura. En un principio, la temperatura para el análisis de una secuencia particular de DNA se establecía empíricamente, realizando repetidas inyecciones de una muestra y aumentando gradualmente la temperatura de la columna hasta que los picos del cromatograma comenzaban a aparecer a tiempos de retención más cortos. A partir de este punto, la presencia de mutación o mutaciones (mismatches) se detecta por la aparición de uno o más picos que eluyen inmediatamente antes que los homodúplex. Sin embargo, esta forma empírica para establecer la temperatura de análisis adecuada, presenta la posible limitante de que los fragmentos ricos en dominios AT, que poseen baja temperatura de melting (desnaturalización), no se detecten debido a su completa

desnaturalización. Por esta causa se ha desarrollado un algoritmo, que calcula la temperatura en una secuencia conocida para que el 50% del fragmento permanezca sin desnaturalizar.

La sensibilidad del análisis conformacional de cadena sencilla (SSCP) disminuye drásticamente cuando se intentan analizar fragmentos más grandes de 300 pares de bases (bp), o en el caso de mutaciones localizadas dentro de estructuras conformacionales en horquilla. La sensibilidad de la DHPLC se mantiene con tamaños de fragmentos comprendidos entre 150 y 700 bp y, además, no se ha identificado hasta la fecha ninguna estructura conformacional que impida la detección de mutaciones por DHPLC (2,4).

En el DNA también nos podemos encontrar dominios en los que existen fragmentos que poseen diferentes temperaturas de melting. La DHPLC demuestra afectarse menos que el DGGE al analizar este tipo de dominios (4,5).

La secuenciación directa está considerada el "patrón de oro" en el análisis de mutaciones. Sin embargo, dicha técnica falla en la determinación de alelos mutantes poco frecuentes. La DHPLC, por el contrario, detecta fiablemente alelos mutantes presentes a frecuencias tan bajas como el 10%. Por tanto, perfiles de heterodúplex que son reproducibles mediante el análisis por DHPLC no deberían clasificarse de antemano como falsos positivos, si la secuenciación directa falla en identificar los mismatch (1,4,5).

En definitiva, la DHPLC se perfilaría como una técnica capaz de seleccionar casos a los que realizar análisis de secuenciación, de entre todos los casos sospechosos de portar mutaciones genéticas.

## Genes y patologías para posible utilización de DHPLC

En el estudio de genes de interés médico, en la práctica asistencial se intenta que, caso de disponerse de más de un método de análisis, la elección de la correspondiente prueba genética que se ha de aplicar se adecue a la idiosincrasia propia de los laboratorios clínicos. Para ello, se consideran las características del gen o genes en cuestión y se conjugan con variables (interrelacionadas) tales como rapidez de respuesta, costes asociados, sensibilidad, especificidad, etc.

Desde esta premisa, es lógico que una variante genética de pequeño tamaño (como un SNP), si se puede determinar por PCR en tiempo real, se opte por emplear esta técnica para diagnóstico ya que, conforme va amplificando una zona genómica, va mostrando un resultado (6).

Las secuencias nucleotídicas grandes, no permiten la realización de PCR en tiempo real. En cambio, sí permiten la realización de PCR a tiem-

po final, pudiéndose secuenciar posteriormente el producto amplificado (5,6).

Por tanto, la selección de genes cuyo análisis rutinario en la práctica clínica podría beneficiarse de las ventajas de la DHPLC, habría de cumplir el requisito de ser genes de gran tamaño y/o con múltiples posibles mutaciones. Esto implicaría que dichos genes precisarían de una secuenciación más compleja, lenta y, en definitiva, laboriosa. La DHPLC podría emplearse como método de cribado, con objeto de descartar secuenciaciones innecesarias.

A tal efecto, en el presente trabajo se han seleccionado los siguientes genes/patologías:

## Genes relacionados con cáncer familiar *BRCA 1*, *BRCA 2*, *APC* y *RET*

### **Genes *BRCA 1* y *BRCA 2***

Los genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario presentan una estructura genómica de gran tamaño. El gen *BRCA 1* posee 24 exones que codifican una proteína de unos 1863 aminoácidos. El gen *BRCA 2* posee 27 exones que codifican una proteína de 3.418 aminoácidos.

Se han descrito más de 600 mutaciones y variantes alélicas en el gen *BRCA 1* desde su identificación. En el gen *BRCA 2*, hasta el momento, se han identificado unas 450 mutaciones. Este hecho puede ser debido a que el *BRCA 2* fue clonado más tarde, es mayor y por lo tanto más difícil de analizar que el *BRCA 1*.

La mayoría de las mutaciones encontradas en ambos genes consisten en pequeñas delecciones, inserciones o mutaciones de pérdida de sentido que conducen a un truncamiento prematuro en la transcripción de la proteína y por lo tanto, a la pérdida de su función. Dichas posibles mutaciones se distribuirían a lo largo de toda la secuencia genómica, incluso en zonas intrónicas, no pudiéndose señalar puntos calientes o áreas de mayor concentración de las mismas. Este hecho dificulta su detección (7).

### **Gen *APC***

La Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) está causada por mutaciones en un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 5q21, conocido como gen *APC* (del acrónimo Poloposis Adenomatosa Coli). Este gen está constituido por 8535 pares de bases y 21 exones. El exón 15 comprende el 75% de la secuencia codificante y es también el lugar donde con más frecuencia

se han hallado las mutaciones que afectan al gen. Es un gen supresor de tumores, ya que su alteración ocurre en los estadios iniciales del proceso de transformación de un tejido normal hacia uno neoplásico.

El gen APC consta de 15 exones y codifica para una proteína de 2843 aminoácidos. En el medio del polipéptido APC se encuentra un sitio de ligado de b caderinas. El producto está involucrado en la unión del citoesqueleto a E caderinas, una molécula de adhesión de la superficie celular implicada en la carcinogénesis. La localización subcelular del polipéptido APC está asociado a la formación de microtúbulos, mientras que un producto mutante (resultando en la mayoría de los casos en una interrupción prematura de la síntesis de la proteína) pierde la capacidad de guía de los microtúbulos cuya organización y estructura es vital en la división celular (8).

### **Gen *RET***

RET es el acrónimo de REarranged during Transfection, ya que se aisló por primera vez durante la realización de un experimento de transfección en células NIH 3T3 con células de linfoma T humano.

RET es un gen humano normal compuesto de 21 exones y localizado en el cromosoma 10q11.2 que codifica un receptor transmembrana de naturaleza glucoproteica con actividad tirosincinasa (proteína RET). Este receptor se compone de un dominio citoplasmático portador de la actividad tirosincinasa y correspondiente con el extremo carboxiterminal, otro más pequeño transmembrana y un tercero más grande que es extracelular. El dominio extracelular contiene tres regiones bien definidas: una adyacente a la membrana rica en cisteínas, otra con función de unión que guarda una gran homología con las proteínas de la familia de las cadherinas (región cadherin-like) y un péptido señal con el extremo aminoterminal (9).

## Genes relacionados con las enfermedades mitocondriales o encefalomiopatías mitocondriales

En la mitocondria se encuentra la cadena de transporte electrónico que forma el sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS) que es el encargado de conseguir la energía, en forma de ATP. La cadena de transporte electrónico está codificada por dos genomas: el nuclear y el mitocondrial, con características genéticas muy diferenciadas.

La patología del sistema mitocondrial afecta, mayoritariamente, a los órganos que consumen más energía para llevar a cabo su metabolismo normal: músculo esquelético, cerebro miocardio, hígado y riñón. Sin embar-

go, la expresión de una alteración mitocondrial puede alcanzar a cualquier órgano o tejido. Por ello, las enfermedades mitocondriales conforman un grupo de entidades heterogéneas, tanto desde el punto de vista clínico como bioquímico y genético (10).

Las clasificaciones clínicas o bioquímicas de los trastornos mitocondriales han dado paso a una clasificación de base genética, basada en las alteraciones del genoma mitocondrial, del genoma nuclear o de la comunicación entre ambos.

Dentro del primer grupo tenemos las enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones puntuales del DNA mitocondrial (mtDNA), como las encefalomiopatías tipo MELAS (encefalomiopatía con episodios pseudoictales y acidosis láctica), MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojo rasgadas) o NARP (neuropatía sensitiva más ataxia y retinitis pigmentaria); diversas sorderas no sindrómicas o asociadas a diabetes, miocardiopatías, así como la neuropatía óptica de Leber, y un pequeño grupo de casos con síndrome de Leigh transmitido por vía materna. Todas ellas se transmiten por herencia materna. Se incluyen también cuadros generalmente esporádicos debidos a deleciones o duplicaciones del mtDNA, que dan lugar a miopatías con o sin oftalmoplejía y a cuadros más complejos como el síndrome de Kearns-Sayre (SKS) (10,11).

En el segundo grupo se incluyen todas las enfermedades mitocondriales cuyo defecto genético reside en los genes nucleares que codifican subunidades del mtDNA, incluyendo la mayor parte de casos de síndrome de Leigh, las poliodistrofias de Alpers, el síndrome mioneurogastrointestinal (MNGIE), el síndrome de Barth y la enfermedad de Friedreich. Entre las entidades secundarias a defectos de la comunicación entre el genoma nuclear y mitocondrial cabe destacar la forma de oftalmoplejía externa progresiva, con herencia autosómica dominante secundaria a mutaciones localizadas en los cromosomas 3 y 10 (11).

## Contexto y justificación del informe

El creciente y progresivo avance de la biotecnología en general, y de la genómica en particular, ha dado lugar al conocimiento de un mayor número de genes candidatos en relación a un amplio espectro de enfermedades, así como al descubrimiento de nuevas variantes (mutaciones y polimorfismos) en dichos genes. Muchas de estas posibles variaciones se han asociado a diferentes formas de manifestación clínica, referidas a un abanico de patologías e, incluso, dentro de una misma entidad nosológica: diferente susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, diferente pronóstico evolutivo, diferente respuesta a una terapia, etc.

La literatura científica al respecto, muestra una continua producción de investigación aplicada, cuyos resultados son trasladados a la práctica clínica en muchos casos: las relaciones genotipo-fenotipo, en numerosas ocasiones son empleadas en el manejo clínico de enfermedades de base genética.

Consecuencia de todo ello ha sido un crecimiento en la demanda y, por ende, de la actividad de los laboratorios clínicos, tanto desde el punto de vista cualitativo (aumento de las carteras de servicios) como cuantitativo (incremento del número de los correspondientes tests). Por ello se plantea el uso de técnicas capaces de descartar casos con sospecha de presentar alteraciones genéticas que finalmente no se confirman al ser secuenciados, a fin de disminuir la casuística a la que realizar dicha secuenciación. Dicho planteamiento ha suscitado el encargo del presente informe por el Ministerio de Sanidad y Consumo a la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. En él se pretenden explorar algunos usos de la DHPLC en el momento actual y plantear la posible repercusión de su utilización en el manejo de ciertas patologías.

Para la elaboración de este informe se propone realizar una revisión sistemática de la literatura y una evaluación económica. Ambas se orientarán al uso de la DHPLC en el análisis de los oncogenes BRCA 1, BRCA 2, APC y RET, así como en el análisis de genes relacionados con enfermedades mitocondriales. Con todo ello se pretende lograr los siguientes objetivos:

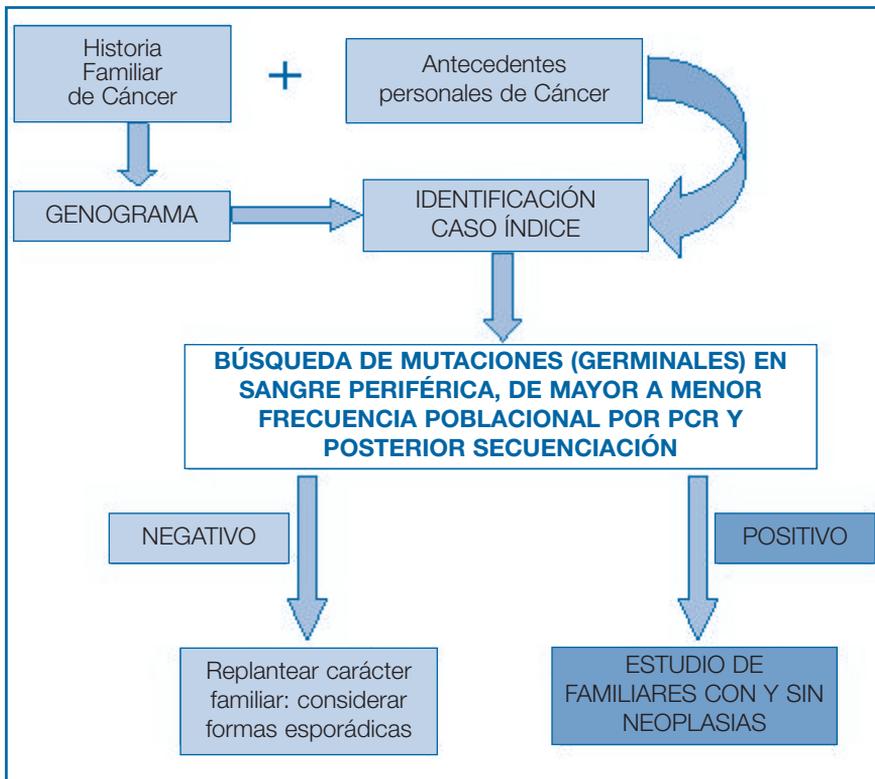
1. Identificar usos actuales de la DHPLC en el análisis de dichos genes.
2. Valorar en dichos usos la efectividad, en términos de validez analítica y validez clínica.
3. Estimar las posibles consecuencias a nivel organizativo, derivadas de la introducción de la DHPLC en los algoritmos diagnósticos de las correspondientes patologías.
4. Enunciar los parámetros implicados en los algoritmos al uso, como en los algoritmos resultantes de introducir la DHPLC, orientando así un análisis del posible impacto económico derivado.
5. Analizar comparativamente el coste-efectividad de dos estrategias diagnósticas para analizar la posible presencia de mutaciones genéticas: secuenciación (considerada el patrón de oro) versus DHPLC.

# Material y Métodos

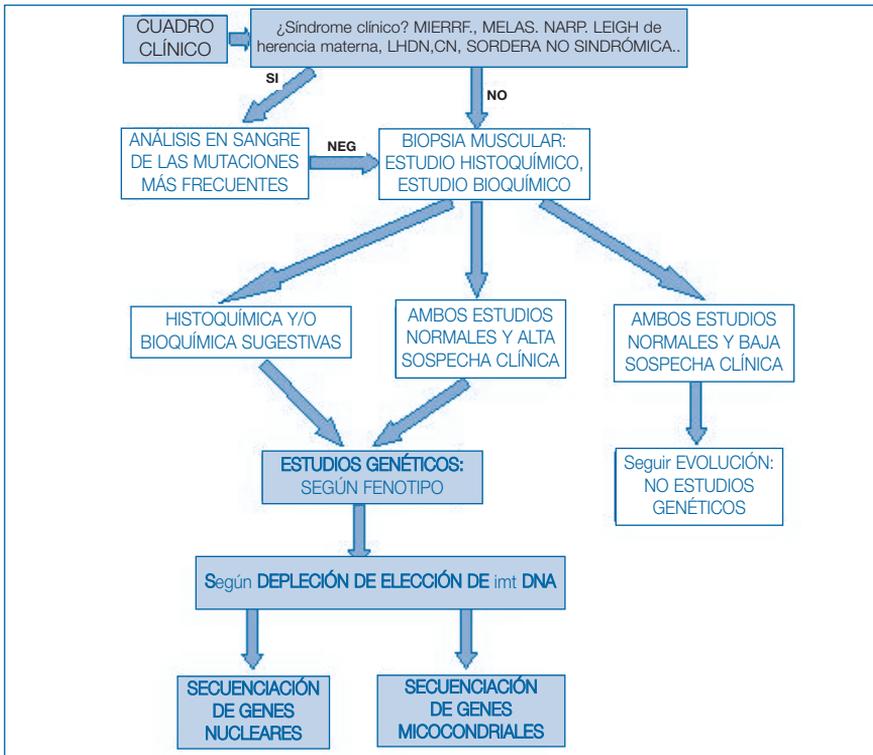
El estudio se orientó a cubrir los objetivos expuestos en el apartado anterior, según el siguiente esquema:

- **Población:** Personas sospechosas de presentar variantes en los genes seleccionados.
- **Intervención:** Uso de DHPLC en el diagnóstico de dichas variantes.
- **Comparación:** Entre los algoritmos clásicos (figuras 1 y 2) y los resultantes de introducir el empleo de DHPLC.
- **Resultados:** Consecuencias a nivel organizativo e implicaciones económicas derivadas.

**Figura 1:** Algoritmo actual en el diagnóstico de cáncer familiar



**Figura 2: Algoritmo diagnóstico actual en enfermedades mitocondriales**



## Revisión sistemática de la literatura

Para explorar actuales usos de la DHPLC referidos a los genes seleccionados y analizar los resultados de dichos usos, se realizó una revisión sistemática de la literatura, construyendo estrategias de búsqueda para las bases de datos referenciales MEDLINE (incluido PRE-MEDLINE mediante PubMed) y EMBASE (EVIDENCE BASED MEDICINE). En estas búsquedas no hubo limitación por el idioma y se abarcó hasta octubre de 2006.

Las búsquedas se idearon con objeto de recuperar los artículos que observaran el uso de la DHPLC y tuvieran alguna posible implicación en ámbitos de control de calidad de dicha técnica, de costes asociados y/o de uso o utilidad en el manejo clínico de las patologías seleccionadas.

Se diseñaron cuatro búsquedas diferentes, considerando los siguientes apartados: **1)** genes *BRCA 1* y *BRCA 2*; **2)** gen *APC*; **3)** gen *RET*; y **4)** genes relacionados con enfermedades mitocondriales (anexo 1).

Así mismo, se solicitaron formalmente datos y estudios a la industria fabricante y a sus promotores comerciales.

Para la selección de los estudios de oncogenes se definieron unos criterios de inclusión y exclusión (Tabla 1) y para las enfermedades mitocondriales otros (Tabla 2).

<b>Tabla 1. Criterios de selección de artículos sobre oncogenes.</b>	
<b>Inclusión</b>	Artículos que contemplen el uso de DHPLC.
	Estudios epidemiológicos.
	Estudios de costes.
	Estudios de control de calidad analítico.
<b>Exclusión</b>	Artículos sobre otros oncogenes, que citan a los anteriores tangencialmente.
	Artículos no relacionados con los oncogenes estudiados (las siglas tienen otra correspondencia) <sup>1</sup> .
	Artículos que no tratan acerca de la especie humana.
	Artículos que exponen el descubrimiento de nuevas mutaciones y/o sus implicaciones.
	Revisiones narrativas, cartas al director y artículos de opinión.
<sup>1</sup> Por ejemplo, APC también corresponde a Anticáncer potencial Phenolic Compounds o AntigenPresenting Cells.	

<b>Tabla 2. Criterios de selección de artículos sobre enfermedades mitocondriales.</b>	
<b>Inclusión</b>	Artículos que contemplen el uso de DHPLC.
	Artículos que aborden alteraciones del genoma mitocondrial.
	Estudios epidemiológicos.
	Estudios de costes.
	Estudios de control de calidad analítico.
<b>Exclusión</b>	Artículos relacionados con alteraciones del genoma mitocondrial, pero no incluidos en la clasificación de las enfermedades mitocondriales <sup>2</sup> .
	Artículos que no tratan acerca de la especie humana.
	Artículos que exponen el descubrimiento de nuevas mutaciones y/o sus implicaciones.
	Revisiones narrativas, cartas al director y artículos de opinión.
<sup>2</sup> Por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedades hematológicas, vasculopatías, etc.	

Los artículos se seleccionaron primero en función del título y del resumen, y los que pasaron este primer filtro fueron recuperados a texto completo, y evaluados.

## Valoración crítica de los estudios seleccionados

Para evaluar los artículos con resultados numéricos, se utilizaron las recomendaciones del Critical Appraisal Skills Programme (CASP) adaptadas por CASP España (CASPe) (15) (anexo 2). El máximo de puntuación a obtener con esta escala es de 10. Los estudios con puntuación entre 0 y 5 se consideraron de mala calidad. Se usaron también de forma adicional escalas de calidad basadas en las recomendaciones del Centre for Reviews and Dissemination (CRD) de la Universidad de York (12), la Colaboración Cochrane (13) y la iniciativa Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) (14).

## Síntesis de los resultados de la revisión sistemática de la literatura

Se realizó una síntesis de forma cualitativa, dada la heterogeneidad de los artículos y de los datos. La valoración crítica de la calidad de los estudios se utilizó para matizar las conclusiones.

## Evaluación económica

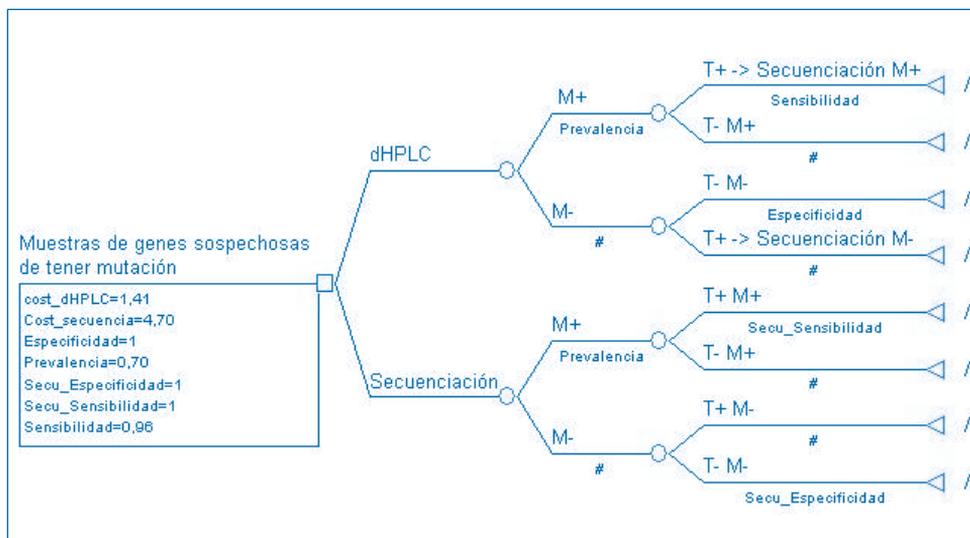
La estrategia del estudio económico consistió en comparar el coste por unidad de efecto de las dos alternativas fijadas: DHPLC vs. secuenciación. A tal fin, la modalidad de evaluación económica más apropiada es el análisis coste-efectividad. Este tipo de evaluación permite comparar pruebas (o programas, o intervenciones) diferentes pero con objetivos similares, ofreciendo información para la toma de decisiones entre diferentes alternativas, lo cual facilita la identificación de la alternativa más eficiente.

Se decidió no realizar los análisis para determinadas mutaciones genéticas concretas ya que, por un lado, la variabilidad de los valores de efectividad descritos en la literatura es escasa, lo cual es una limitante. Además, no se podría obtener conclusiones extrapolables al resto de mutaciones, incluidas las de posible descubrimiento futuro.

Para estimar la validez analítica de la DHPLC se compararon sus valores de medida con los obtenidos con la secuenciación; como hemos insinuado anteriormente, esta técnica se considera en el análisis de mutaciones genéticas como patrón de oro o ‘gold standard’ o criterio de referencia. Se estableció que los valores de sensibilidad y especificidad del patrón de oro son del 100%, por lo que las muestras que presenten un resultado positivo mediante secuenciación de DNA, se considerará que son portadoras de la mutación hallada. Por tanto, aquellas muestras que mostraran resultado positivo en el análisis por DHPLC podrían ser estudiadas mediante secuenciación, de forma confirmatoria.

Las muestras susceptibles de ser analizadas podrían seguir las siguientes estrategias: DHPLC con posterior secuenciación (que confirmaría o no el resultado), o bien secuenciación directa de forma sistemática (figura 3):

**Figura 3.** Árbol de decisión de la estrategia diagnóstica mediante dHPLC.



dHPLC: cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante; M+: muestra portadora de mutación; M-: muestra no portadora de mutación; T+: resultado de la prueba positiva; T-: resultado de la prueba negativa.

## Costes

Los costes fueron extraídos del listado de precios al público de la Unidad de Genómica de la Universidad de Córdoba, perteneciente al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de dicha Universidad (16). En la Tabla 3 se muestra el coste de las estrategias diagnósticas.

<b>PRUEBA DIAGNÓSTICA</b>	<b>PRECIO UNITARIO</b>
Secuenciación	10,44€ (15,66-5,22)
DHPLC	1,74€ (2,61-0,87)

\*Costes en euros de 2007.

## Efectividad

La *eficacia* de una prueba genética dependería de su capacidad para detectar correctamente la presencia o ausencia de la variante o mutación buscada, lo que se expresa matemáticamente en cuatro índices: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Dado que los valores predictivos dependen de la prevalencia de la alteración buscada, se optó por utilizar los valores de sensibilidad y especificidad, que son inherentes a la prueba e independientes de la prevalencia.

Los valores de sensibilidad y especificidad de la DHPLC, se extrajeron de la página web del Centro Genómico Tecnológico de Stanford (17). En esta página existe un amplio número de artículos científicos cuyo objetivo consiste en calcular la sensibilidad y especificidad de dicha prueba (18-21). Con todos los resultados de los trabajos encontrados se realizó una ponderación, excluyéndose aquellos artículos de los que sólo se pudo disponer del resumen y/o estaban escritos en una lengua distinta al español e inglés y/o no comparaban la DHPLC con el patrón de oro (secuenciación). En la Tabla 4 se presentan los citados valores de sensibilidad y especificidad.

**Tabla 4. Valores de sensibilidad y especificidad de la DHPLC.**

	M+	M-	
Test +	467	0	467
Test -	12	237	249
	479	237	716
<b>SENSIBILIDAD = 0,974 (0,90 - 1)</b>			
<b>ESPECIFICIDAD = 1</b>			

Pero dado que la *eficacia* de una prueba (o de cualquier acto asistencial) proporciona información sobre el beneficio de dicha prueba aplicada en condiciones ideales o teóricas de aplicabilidad, de cara a un estudio económico, sería preferible conocer la *efectividad*, que observaría dicho beneficio en condiciones reales de aplicabilidad. Para posibilitar este último enfoque se consideraron dos medidas de efectividad: número de *casos encontrados* y número de *casos efectivos* (que son los casos encontrados menos los casos perdidos). Por otra parte, en cuanto a las muestras a analizar se consideró que se trataba de mutaciones germinales y se estableció una prevalencia inicial del 50%.

## Análisis económico

Se realizó un análisis de decisión para evaluar la DHPLC frente a la secuenciación. En primer lugar, se construyó un árbol de decisión estructurado de acuerdo con el orden cronológico del proceso de diagnóstico genético y teniendo en cuenta la secuencia lógica de actividades (Figura 3). Los representados con un cuadro son nodos de decisión, donde la elección de un camino u otro la tiene exclusivamente el profesional sanitario. Los representados con un círculo son los nodos probabilísticos, donde la elección de las diferentes ramas está determinada por la probabilidad. Los nodos terminales triangulares representan el final de cada una de las estrategias diagnósticas, para las que se estableció una doble valoración: el coste y la efectividad en la detección de mutaciones.

Para cada alternativa se calculó el coste, el coste incremental, la efectividad, la efectividad incremental y el índice coste-efectividad.

Finalmente, se calculó la ratio coste-efectividad incremental (ICER), la cual se consideró como medida de resultado. El ICER relaciona el coste y el resultado, y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{ICER} = \frac{(\text{coste alternativa B} - \text{coste alternativa A})}{(\text{efectividad alternativa B} - \text{efectividad alternativa A})}$$

El ICER indica lo que cuesta una unidad de efecto, al elegir la estrategia B, con respecto a la estrategia A.

Finalmente, se realizaron análisis de sensibilidad (todos univariantes) a fin de establecer la robustez del modelo y explorar las diferencias entre los costes de las diferentes opciones. Se realizaron análisis de sensibilidad variando la prevalencia (de presencia de mutación genética), modificando la sensibilidad de la DHPLC y cambiando los costes unitarios de ambas pruebas genéticas. Para la elaboración del árbol de decisión y el análisis de los datos se utilizó el software Tree-age Pro 2006.

# Resultados

## Revisión sistemática de la literatura sobre la efectividad de la DHPLC

### Selección de artículos

En una primera fase se eliminaron los duplicados en cada búsqueda y entre la combinación de las distintas bases, excluyendo 81 artículos de los 286 inicialmente recuperados (Tabla 5).

<b>Tabla 5. Número de artículos inicialmente recuperados.</b>				
BÚSQUEDAS	PubMed	EMBASE	Duplicados	TOTAL
BRCA 1 y BRCA 2	43	60	51	52
APC	24	13	8	29
RET	5	4	3	6
Enf. Mitocondriales	82	55	19	118
GLOBAL	286		81	205

Después se seleccionaron a través de los resúmenes los artículos que podían cumplir los criterios de inclusión, revisando el texto completo en caso de duda (Tabla 6).

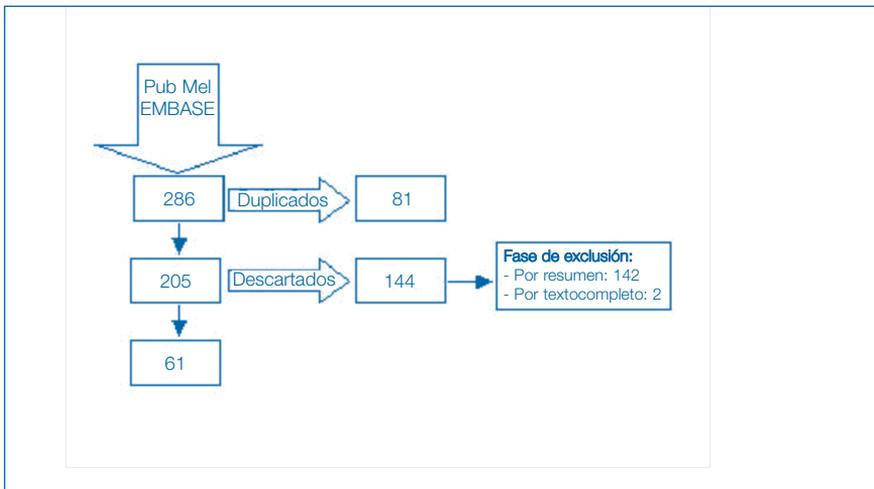
<b>Tabla 6. Número de artículos en cada fase de selección.</b>				
BÚSQUEDAS	EXCLUIDOS		POR TEXTO COMPLETO	INCLUIDOS
	SIN DUPLICADOS	POR RESUMEN		
BRCA 1 y 2	52	18	0	34
APC	29	20	0	9
RET	6	2	0	4
Enf Mitocondriales	118	102	2	14
GLOBAL	205	142	2	61

De un total de 205 artículos se excluyeron 142 a través del título y resumen. El anexo 3 resume el número de artículos según los motivos por los que se han excluido.

De estos 142 restantes, dos se excluyeron tras ser revisados a texto completo (uno por abordar el uso de la HPLC no desnaturalizante y el otro por no versar sobre enfermedades mitocondriales), quedando 61 artículos seleccionados (Tablas 7 a 10). De ellos, 58 son artículos originales, 3 son revisiones y uno es un artículo metodológico.

El proceso de selección de artículos, se muestra esquemáticamente en la figura 4.

**Figura 4. Esquema de revisión.**



## Descripción de los artículos seleccionados según los criterios de inclusión.

En los artículos seleccionados se consideró que, en la población estudiada, el sujeto de riesgo era aquel con antecedentes familiares de la patología considerada (con un cierto número de casos en la correspondiente familia) y/o con familiares portadores de mutaciones (diagnosticadas) en los correspondientes genes, o bien ser sujetos con alta sospecha clínica en base a la forma de presentación de la enfermedad.

No se observó la aplicación de pruebas estadísticas: los resultados se presentaron en porcentajes y/o cifras absolutas. En muchos artículos, se detallaban los valores de sensibilidad y especificidad de las técnicas tratadas y, en algunos casos, las variaciones de dichos valores según las condiciones de realización de dichas técnicas.

En total, en 10 artículos no se especificaba el tamaño muestral y en 5 no se detallaba el número de sujetos, sino el de familias. Los artículos con exposición de resultado numérico (que detallaban cifras de sensibilidad, especificidad, etc.) sumaron un total de 18 y se muestran en detalle en la Tabla 11.

## **BRCA 1 y BRCA 2**

De los 34 artículos sobre oncogenes BRCA, 18 de ellos estudiaban conjuntamente el BRCA 1 y el BRCA 2, 13 el BRCA 1 y 3 el BRCA 2. En la mayor parte de ellos (en 21), el eje fundamental eran los oncogenes BRCA, siendo la DHPLC una herramienta; en los 12 restantes, la DHPLC era un eje fundamental del estudio. La mayoría (25 de ellos) eran estudios transversales (uno de ellos con consideraciones de costes), 6 eran de casos-controles (también uno tenía consideraciones de costes), 2 de costes y 1 metodológico. De todos ellos, 9 exponían resultados numéricos.

## **APC**

De los 9 artículos seleccionados, 8 de ellos eran estudios transversales (uno de ellos con consideraciones de costes) y 1 de casos-controles. En 2 de estos artículos, se exponía que la DHPLC detecta variantes que no logra discriminar la secuenciación. Del total de ellos, 4 artículos mostraban resultados numéricos.

## **RET**

Los 4 artículos sobre oncogén RET seleccionados, correspondían a estudios transversales. Dos de ellos exponían resultados numéricos.

## **Enfermedades mitocondriales.**

De los 14 artículos acerca de enfermedades mitocondriales, la mayoría (7 de ellos) eran estudios transversales, 4 eran de casos y controles y 3 eran artículos de revisión. En 5 de éstos, se estudiaba la heteroplasmia o grado de afectación mitocondrial. Del total de ellos, 4 mostraban resultados numéricos.

## Valoración crítica de los estudios seleccionados

Utilizando los criterios de evaluación descritos anteriormente (anexo 2), después de valorar los artículos seleccionados, se puntuó cada uno de ellos. Las puntuaciones alcanzadas fueron altas: 12 de ellos alcanzaron 9 puntos (máxima puntuación registrada), 3 obtuvieron 8 puntos y otros 3 puntuaron un 7 (mínima puntuación registrada) (Tabla 11).

Ninguno de ellos alcanzó la máxima puntuación, debido fundamentalmente a la no realización de evaluación “ciega” de resultados (anexo 4), la cual sólo se observó en dos artículos (Eng et al (48) y Wagner et al (53)) de los 18 seleccionados.

Se evaluó un aspecto adicional al valorar los artículos: la posible presencia de conflicto de intereses. Dos artículos (Eng et al (48) y Wagner et al (53)) manifestaban tener conflicto de interés: alguno de los autores percibía contraprestaciones económicas de la industria fabricante.

Si bien sólo 2 artículos correspondían a estudios de costes (Sevilla et al, 2002 (43) y Sevilla et al, 2003 (40)), en 2 artículos más se evaluaban costes de forma adicional. En otros 3 artículos se hacían alusiones a aspectos económicos (13,19,22)(afirmar que la DHPLC es barata o coste-efectiva), sin exponer cifras sobre las que fundamentar dichas afirmaciones.

Otro aspecto a considerar es que en los estudios de casos y controles, en ocasiones, los asignados al grupo “control” mostraban variantes genéticas al realizarse la correspondiente prueba. De forma recíproca, algunas veces resultaban negativos para ciertas variantes genéticas los que estaban incluidos en el grupo de “casos”.

<b>Tabla 7 (I). Artículos seleccionados sobre oncogenes BRCA 1 y BRCA 2.</b>					
<b>Artículo</b>	<b>Oncogén</b>	<b>Tipo de estudio</b>	<b>Población</b>	<b>Contenido</b>	
Li et al, 2006 (22)	BRCA 1	Transversal	25 afectados y 10 familiares	Detecta variantes en afectados y familiares	
Weber et al, 2006 (23)	BRCA 2	Transversal	94 sujetos de riesgo	Compara sensibilidades de EMMA(con y sin cebadores específicos optimizados) y DHPLC	
Song et al, 2006 (24)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	35 sujetos de riesgo	Detecta variantes conocidas y nuevas, describe frecuencias y observa correlación genotipo –fenotipo	
Song et al, 2005 (25)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	13 sujetos de riesgo	Detecta variantes conocidas y nuevas y describe frecuencias	
Kim et al, 2005 (26)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	37 casos de CA ovario	Detecta variantes y no observa correlación genotipo-fenotipo	
Tommasi et al, 2005 (27)	BRCA 1	Transversal	100 sujetos de riesgo	Detecta variantes, describe frecuencias y observa correlación genotipo –fenotipo	
Palomba et al, 2005 (28)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	102 sujetos de riesgo	Detecta variantes, describe frecuencias y observa correlación genotipo –fenotipo	
Song et al, 2005 (29)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	50 sujetos de riesgo	Detecta variantes conocidas y nuevas, describe frecuencias y observa correlación genotipo –fenotipo	
Belogianni et al, 2004 (30)	BRCA 1	Transversal	25 sujetos de riesgo	Detecta variantes conocidas y nuevas nuevas y describe frecuencias. Combina con análisis de grandes deleciones (MLPA) para casos negativos	
Hartmann et al, 2004 (31)	BRCA 1	Transversal	251 familias de riesgo	Detecta variantes conocidas y describe frecuencias. Combina con análisis de grandes deleciones (MLPA) para casos negativos	
Deng et al, 2003 (32)	BRCA 1	Caso-Control	65 (32+33 controles)	Detecta variantes conocidas y nuevas y describe frecuencias	

**Tabla 7 (III). Artículos seleccionados sobre oncogenes BRCA 1 y BRCA 2.**

Artículo	Oncogén	Tipo de estudio	Población	Contenido
Oberacher et al, 2003 (33)	BRCA 1	Transversal	No define	Detecta variantes conocidas y describe frecuencias. Combina con espectrometría de masas para casos negativos
Perkowska et al, 2003 (34)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	60 familias de riesgo	Detecta variantes, describe frecuencias y observa correlación genotipo -fenotipo
Meyer et al, 2003 (35)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	251 familias de riesgo	Detecta variantes conocidas y nuevas, describe frecuencias y observa correlación genotipo -fenotipo
Rajkumar et al, 2003 (36)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	22 sujetos de riesgo	Detecta variantes conocidas y nuevas y describe frecuencias
Footz et al, 2003 (37)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	No define	Compara DHPLC con micromatrices basadas en análisis de heterodúplex (HA)
Kanaan et al, 2003 (38)	BRCA 2	Caso-Control	237 (74+163 controles)	Detecta variantes, describe frecuencias y observa correlación genotipo -fenotipo
Heike et al, 2003 (39)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	No define	Compara 5 métodos: DHPLC, SSCP, PTT, TGGE y DGGE. La DHPLC muestra mayor sensibilidad.
Sevilla et al, 2003 (40)	BRCA 1	De costes	"teórica" de 10000	Compara 20 estrategias combinando 6 métodos: DHPLC, SSCP, PTT, HA, FAMA y DGGE
Andrulis et al, 2002 (41)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	21 sujetos de riesgo	Compara 6 métodos: DHPLC, SSCP, PTT, EMD, TDGS y secuenciación
Kang et al, 2002 (42)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	27 sujetos de riesgo	Detecta variantes conocidas y nuevas y describe frecuencias
Sevilla et al, 2002 (43)	BRCA 1 y BRCA 2	De costes	"teórica" de 10000	Compara 7 métodos: DHPLC, SSCP, PTT, HA, FAMA y DGGE
Pfeiffer et al, 2002 (44)	BRCA 1	Metodológico	No define	Compara dos formas de interpretación de cromatogramas: paramétrica frente a 'bootstrop'

**Tabla 7 (III). Artículos seleccionados sobre oncogenes BRCA 1 y BRCA 2.**

Artículo	Oncógen	Tipo de estudio	Población	Contenido
Palomieri et al, 2002 (45)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	59 sujetos de riesgo	Con SSCP, DHPLC y secuenciación, detecta variantes, describe frecuencias y observa correlación genotipo -fenotipo,
Arnold et al, 2002 (46)	BRCA 1	Transversal	125 sujetos sin riesgo	Detecta variantes, describe frecuencias con carácter polimórfico/patogénico. Plantea población control.
Muhr et al, 2002 (47)	BRCA 1 y BRCA 2	Caso-Control	No define	Detecta variantes y describe frecuencias
Eng et al, 2001 (48)	BRCA 1	Caso-Control (ciego)+Costes	65 (50+15 controles)	Compara 4 métodos: DHPLC, SSCP, CSGE y TDGS. La DHPLC resulta más sensible y coste-efectiva.
Tomka et al, 2001 (49)	BRCA 1	Transversal	29 familias de riesgo	Detecta variantes y describe frecuencias
Gross et al, 2000 (50)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal	70 sujetos de riesgo	Detecta variantes, describe frecuencias y evalúa sensibilidad de DHPLC vs secuenciación
Shiri-Sverdlov et al, 2000 (51)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal Multicéntrico	47 sujetos de riesgo	Detecta variantes conocidas y nuevas, y describe frecuencias
Wagner et al, 1999 (52)	BRCA 1 y BRCA 2	Transversal+ Costes	41 sujetos de riesgo	Compara 5 métodos: DHPLC, SSCP, PTT, DGGE y secuenciación
Wagner et al, 1999 (bis) (53)	BRCA 2	Caso-Control	71 sujetos de riesgo+ 95 controles	Detecta variantes, describe frecuencias y observa correlación genotipo -fenotipo
Gross et al, 1999 (54)	BRCA 1	Caso-Control	23 sujetos de riesgo +4 controles	Compara SSCP con DHPLC (87-98% vs 100% sensibilidad) y secuenciación (100% sensibilidad)
Arnold et al, 1999 (55)	BRCA 1	Transversal	46 sujetos de riesgo	Compara DHPLC con secuenciación (idéntica sensibilidad y especificidad: 100%)

**Tabla 8. Artículos seleccionados sobre oncogén APC.**

Artículo	Tipo de estudio	Población	Contenido
Liu et al, 2005 (56)	Transversal	22 sujetos de riesgo	Asocia DHPLC, PTT y secuenciación: detecta variantes, describe frecuencias y observa correlación genotipo-fenotipo
Mihalatos et al, 2005 (57)	Transversal	96 sujetos de riesgo	Asocia DHPLC, MLPA y secuenciación: detecta variantes y describe frecuencias
Wei et al, 2004 (58)	Transversal	6 probandus	Detecta variantes conocidas y nuevas, describe frecuencias
Zhou et al, 2004 (59)	Caso-Control	96 sujetos de riesgo + 96 controles	Detecta variantes conocidas y nuevas, describe frecuencias y observa correlación genotipo-fenotipo
Lilleberg et al, 2004 (60)	Transversal	20 sujetos de riesgo	Detecta variantes y describe frecuencias
Emmerson et al, 2003 (61)	Transversal	4 casos de mosaicismo	La DHPLC detecta variantes que no discrimina la secuenciación
Mihalatos et al, 2003 (62)	Transversal	22 sujetos de riesgo	Compara DHPLC con secuenciación (idéntica sensibilidad)
Young et al, 2002 (63)	Transversal	No define	Compara DHPLC, SSCP, DGGE y secuenciación: DHPLC detecta variantes que no discrimina incluso la secuenciación.
Wu et al, 2001 (64)	Transversal + Costes	47 sujetos de riesgo	Compara 4 métodos: DHPLC, SSCP, PTT y CSGE. La DHPLC es más sensible y específica.

**Tabla 9. Artículos seleccionados sobre oncogén RET.**

Artículo	Tipo de estudio	Población	Contenido
Pazaitou et al, 2005 (65)	Transversal	43 sujetos de riesgo	Detecta variantes y describe frecuencias. Compara DHPLC con secuenciación (idéntica sensibilidad).
Torrente et al, 2004 (66)	Transversal	111 sujetos de riesgo	Detecta variantes y describe frecuencias. Compara DHPLC con SSCP (mayor sensibilidad la DHPLC)
Wurzburger et al, 2003 (67)	Transversal	No define	Detecta variantes y describe frecuencias. Aumenta sensibilidad con uso de GC-primers.
Marsh et al, 2001 (68)	Transversal	32 probandus	Detecta variantes conocidas y nuevas, describe frecuencias. Aumenta sensibilidad al usar GC-primers.

<b>Tabla 10. Artículos seleccionados sobre enfermedades mitocondriales.</b>			
<b>Artículo</b>	<b>Tipo de estudio</b>	<b>Población</b>	<b>Contenido</b>
Nairni et al, 2006 (69)	Transversal	15 sujetos de riesgo	Detecta mutaciones conocidas y nuevas, describe frecuencias y asociaciones genotipo-fenotipo
Bayat et al, 2005 (70)	Transversal	40 sujetos de población general	Detecta mutaciones conocidas y describe frecuencias
Winterthun et al, 2005 (71)	Transversal	3 familias de riesgo	Detecta variantes, describe frecuencias y observa correlación genotipo -fenotipo
Meierhofer et al, 2005 (72)	Transversal	No define	Detecta mutaciones y describe frecuencias. Estudia heteroplasmia, analizando mezclas de mtDNA
Biggin et al, 2005 (73)	Caso-Control	31 (17+14 controles)	Detecta mutaciones conocidas, describe frecuencias. Estudia heteroplasmia. Compara sensibilidad de DHPLC frente a la secuenciación: mayor sensibilidad la DHPLC
Mashima et al, 2004 (74)	Caso-Control	671 (201+234+ 236 controles)	Detecta variantes, describe frecuencias y observa correlación genotipo -fenotipo
Krajewski et al, 2004 (75)	Revisión	No define	Describe test genéticos en enfermedades neuromusculares; entre otras, incluye la DHPLC
Frueh et al, 2003 (76)	Revisión	No define	Describe aplicaciones de DHPLC; entre otras, incluye análisis de heteroplasmia de mtDNA
Danielson et al, 2003 (77)	Transversal	22 voluntarios sanos	Propuesta metodológica para estudio del mtDNA (útil en estudio de consanguinidad: patrones similares en familiares)
Conley et al, 2003 (78)	Transversal	No define	Estudia heteroplasmia
Lilleberg, 2003 (79)	Revisión	No define	Describe aplicaciones de DHPLC de forma genérica
Liu et al, 2002 (80)	Caso-Control	173 (12+72+46+13+ 30 controles)	Detecta mutaciones conocidas y describe frecuencias
Benit et al, 2001 (81)	Caso-Control	136 (36+100 controles)	Detecta mutaciones conocidas y nuevas y describe frecuencias. La DHPLC detecta variantes que no discrimina el cultivo de fibroblastos
van den Bosch et al, 2000 (82)	Transversal	8 casos + 6 sujetos de riesgo	Detecta mutaciones y describe frecuencias. Estudia heteroplasmia analizando mezclas de mtDNA

**Tabla 11 (I). Artículos seleccionados que cuantificaron los resultados.**

Artículo	Gen- patología	Diseño	Resultados	Score CASPe
Weber et al, 2006 (23)	BRCA 2	Estudio transversal que compara EMMA frente a DHPLC	Sensibilidades similares para EMMA y DHPLC (94%) con primers estándar. Con primers optimizados: EMMA aumenta al 97% de sensibilidad	7
Sevilla et al, 2003 (40)	BRCA 1	Sobre una población teórica de 10000 personas, con un 10% de probabilidad de presentar mutaciones en BRCA 1, compara 20 estrategias combinando 6 técnicas y evalúa costes	Coste unitario total por determinación: secuenciación 27,9 €, DHPLC 3,8 €, SSCP 6 €, DGGE 4,3 €, HA 2,9 €, FAMA 26 €, PTT 8,7 €. Prueba más coste-efectiva: PTT en exón 11 y HA en los otros 21 exones (coste 18,893 €), con sensibilidad 87%. DHPLC seguida de secuenciación: coste 166,098 €, con sensibilidad 96%. Secuenciación completa: coste 988,247 € con sensibilidad 100%	9
Andrulis et al, 2002 (41)	BRCA 1 y BRCA 2	Estudio transversal que compara 6 técnicas	Sensibilidades: DHPLC 93%, secuenciación 93%, EMD 93%, TDGS 80%, PTT 80% y SSCP 67%	9
Sevilla et al, 2002 (43)	BRCA 1 y BRCA 2	Sobre una población teórica de 10000 personas con 15% de probabilidad de presentar mutaciones en BRCA 1, compara 20 estrategias resultantes de combinar 6 técnicas y evalúa costes	Precio unitario: secuenciación 29,1 €, DHPLC 3,9 €, SSCP 6,2 €, DGGE 4,5 €, HA 3 €, FAMA 27,2 €, PTT 9,1 €. Estrategia más coste-efectiva: combinar PTT+HA y secuenciar casos positivos; precio medio mutación 971,3 €; precio medio paciente 126,8 €; sensib teórica 1305/1500. Estrategia DHPLC con secuenciación de casas positivos; precio medio mutación 1218 e; medio paciente 175,4 €; sensib teórica 1440/1500. Estrategia secuenciación sistemática: precio medio mutación 6881,7 €; precio medio paciente 1032 €	9
Eng et al, 2001 (48)	BRCA 1	Estudio de casos-contrroles (ciego) en el que compara 4 técnicas y evalúa costes	Sensibilidad/Especificidad (en %) y precio por mutación (\$): SSCP 72/65 (6,2 \$), CSGE 76/60 (30 \$), TDGS 91/91 (17,6 \$), DHPLC 100/100 (50 \$)	9
Gross et al, 2000 (50)	BRCA 1 y BRCA 2	Estudio transversal que compara DHPLC frente a secuenciación	DHPLC detecta 431 de 432 variantes conocidas (1 falso positivo) y 18 nuevas variantes para BRCA 1; para BRCA 2 detecta 135 de 137 variantes conocidas (2 falsos positivos) y 6 nuevas variantes	9

<b>Tabla 1 1 (II). Artículos seleccionados que cuantificaron los resultados.</b>					
<b>Artículo</b>	<b>Gen- patología</b>	<b>Diseño</b>	<b>Resultados</b>	<b>Score CASPe</b>	
Wagner et al, 1999 (53)	BRCA 1 y BRCA 2	Estudio transversal que compara 5 técnicas y evalúa costes	DHPLC detecta 179 de 180 variantes en BRCA 1 y BRCA 2 (detectadas por alguno de los otros 4 métodos). En 41 probandus, DHPLC detecta 4 mutaciones deletéreas y DGGE 3. Coste por muestra: DHPLC 1 \$ y secuenciación 25 \$	9	
Gross et al, 1999 (54)	BRCA 1	Estudio de casos-contrroles que compara 3 técnicas	Sensibilidades: SSCP 87-98%, DHPLC 100% y secuenciación 100%	9	
Arnold et al, 1999 (55)	BRCA 1	Estudio transversal que compara DHPLC frente a secuenciación	DHPLC muestra 100% de sensibilidad y especificidad en 626 muestras analizadas (confirmadas por secuenciación) Añade que el coste de DHPLC es 10 veces menor y es 8 veces más rápida	9	
Mihalatos et al, 2003 (57)	APC	Estudio transversal que compara DHPLC frente a secuenciación	En una serie de 22 casos, se estudian 14 mutaciones en 10 amplicones. DHPLC y secuenciación: ambas 100% sensibilidad y especificidad.	9	
Emmerson et al, 2003 (61)	APC	Estudio transversal que compara DHPLC frente a secuenciación	DHPLC detecta 7 mutaciones somáticas que no detecta la secuenciación (un 14% del total de mutaciones estudiadas). Sensibilidades: DHPLC 100%, secuenciación 86%	8	
Wu et al, 2001 (64)	APC	Estudio transversal que compara 5 técnicas	DHPLC y secuenciación: especificidad 100%. SSCP falla en una mutación del exón 15. PTT falla en otra mutación del exón 15	7	

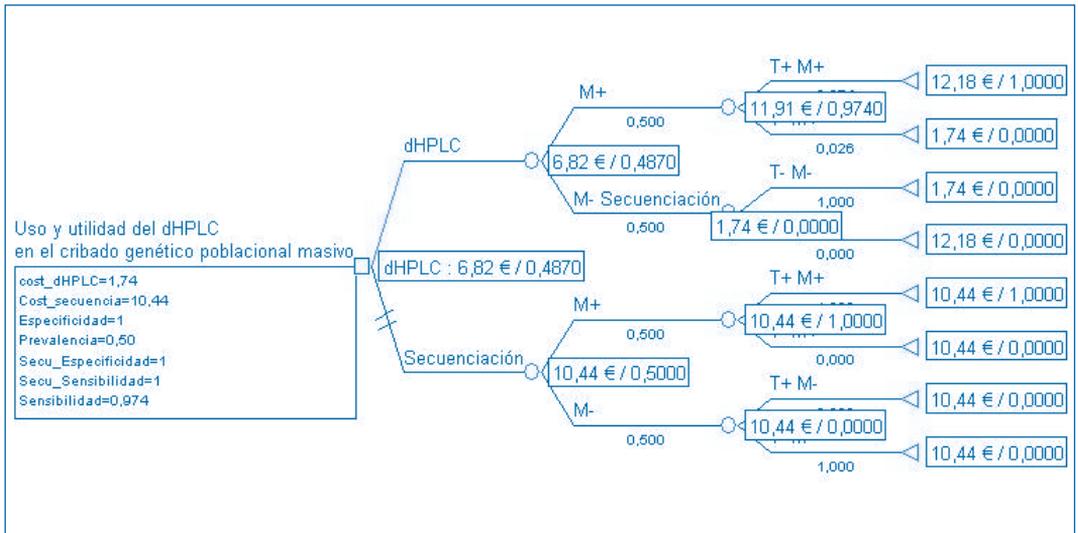
**Tabla 11 (III). Artículos seleccionados que cuantificaron los resultados.**

Artículo	Gen- patología	Diseño	Resultados	Score CASPe
Pazaitou et al, 2005 (65)	RET	Estudio transversal que compara DHPLC frente a secuenciación	Estudia 43 muestras (de 43 sujetos) de 17 familias no emparentadas. DHPLC detecta 8 mutaciones (6 en exón 10 y 2 en exón 11) que se confirman con secuenciación	9
Torrente et al, 2004 (66)	RET	Estudio transversal que compara DHPLC frente a SSCP	SSCP: 95% sensibilidad y 100% especificidad. DHPLC: 100% sensibilidad y 100% especificidad	7
Meierhofer et al, 2005 (72)	E. Mitocondrial	Estudio transversal que utiliza diluciones de mtDNA	Al mezclar diferentes cantidades de mtDNA, las variantes muestran un límite de detección de heteroplasma <1%. Las variantes del mtDNA se aprecian de visu en el cromatograma en el 100% de los casos, con una estimación del grado de heteroplasma del $\pm 10\%$	8
Biggin et al, 2005 (73)	E. Mitocondrial	Estudio de casos-contrroles que compara DHPLC frente a secuenciación	Sensibilidad para mutaciones del mtDNA del 88% (si excluimos la mutación m.8993T>G, aumentaría al 100%). Especificidad del 100%. Las variantes muestran un límite de detección de heteroplasma desde el 3-6% (límite inferior) hasta el 90-97%	9
Liu et al, 2002 (80)	E. Mitocondrial	Estudio de casos-contrroles que evalúa la DHPLC en el Dx de MELAS, otras encefalopatías y CA gástrico	Límite de detección de mutación A3243G del MELAS: 5%. Sensibilidad 83,3%. Especificidad 100%	9
van den Bosch et al, 2000 (82)	E. Mitocondrial	Estudio transversal	Límite de detección de mutación A3243G del MELAS: 4,5%. Límite de detección de mutación A8344G: 0,5%	8

# Evaluación económica

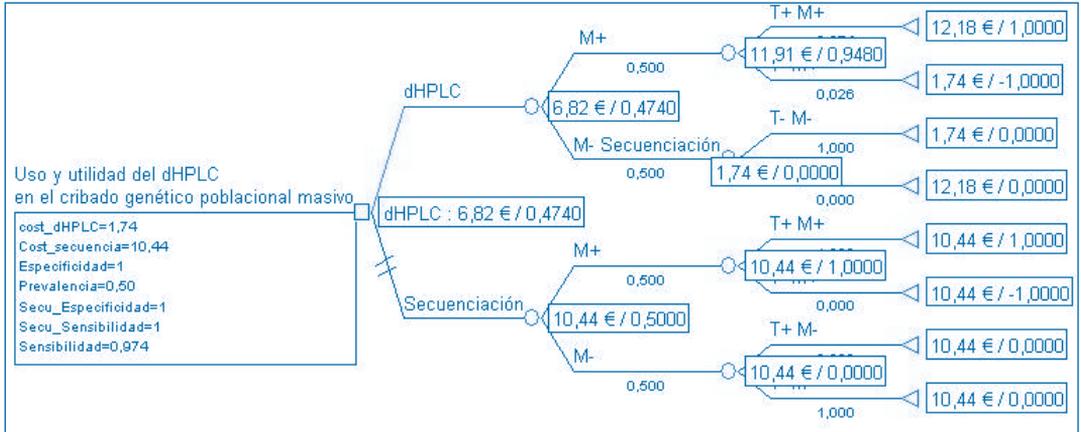
El coste unitario promedio del análisis genético mediante DHPLC fue de 6,82e y el de secuenciación fue de 10,44e. Los ratios coste-efectividad incremental (ICERs) para casos encontrados y casos efectivos fueron de 278,13e y 139,07e respectivamente (Figuras 5 y 6). Es decir, pasar de la opción de la DHPLC a la opción de la secuenciación, tendría un coste de 278,13e (suponiendo una prevalencia de mutaciones del 50% en las muestras a analizar) al utilizar como medida de efectividad los casos encontrados. Si se consideraran los casos efectivos (diferencia entre casos encontrados y casos perdidos) como medida de efectividad, el ICER (pasar de la opción de la DHPLC a la opción de la secuenciación) sería de 139,07e. Los resultados de la evaluación económica se muestran con detalle en la Tabla 12.

**Figura 5. Medida de efectividad= casos encontrados**



dHPLC: cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante; M+: muestra portadora de mutación; M-: muestra no portadora de mutación; T+: resultado de la prueba positiva; T-: resultado de la prueba negativa.

**Figura 6. Medida de efectividad= casos efectivos**



dHPLC: cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante; M+: muestra portadora de mutación; M-: muestra no portadora de mutación; T+: resultado de la prueba positiva; T-: resultado de la prueba negativa.

**Tabla 12: Análisis coste efectividad de las alternativas para el análisis de muestra portadoras de mutaciones genéticas.**

Medida de efectividad		Coste	Coste Increment.	Efectividad	Efectividad Increment.	Coste Efectividad	ICER*
Casos Encontrados	DHPLC	6,82€		0,487		14,01	
	Secuen.	10,44€	3,62€	0,500	0,013	20,88	278,13€
Casos efectivos	DHPLC	6,82€		0,474		14,40	
	Secuenc.	10,44€	3,62€	0,500	0,026	20,88	139,07€

Secuen: Secuenciación; Incremen.: Incremental; ICER: Ratio Coste-Efectividad Incremental.

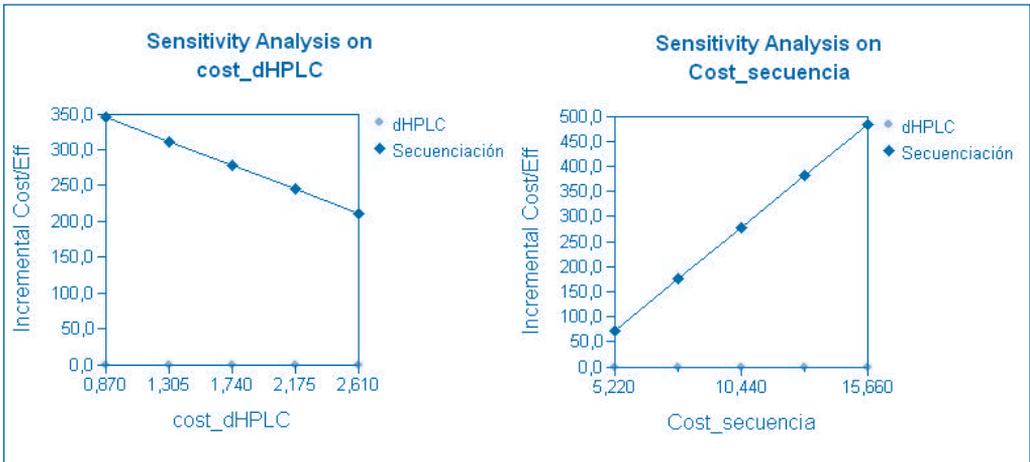
## Análisis de sensibilidad

Se realizaron análisis de sensibilidad univariantes. En primer lugar se realizó un análisis de sensibilidad modificando la prevalencia, después variando la sensibilidad de la DHPLC y finalmente cambiando el coste unitario de cada una de las estrategias diagnósticas.

## Análisis de sensibilidad para los casos encontrados

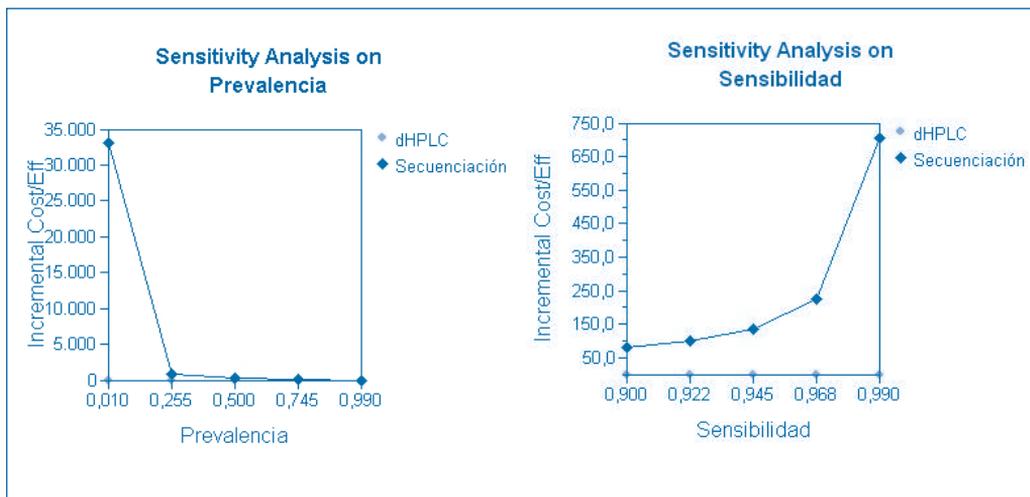
En las figuras 7 y 8 se muestra en el eje de ordenadas el ICER y en abscisa el rango de valores del coste de las pruebas. Igualmente los puntos en color verde representan la estrategia mediante DHPLC y en azul la secuenciación. Así, los análisis de sensibilidad tomando como medida de efectividad los casos encontrados, muestran que el ICER de la secuenciación aumenta a medida que aumenta el coste de la secuenciación (figura 8) y también se aumenta a medida que disminuye el coste de la DHPLC (figura 7). Se ha considerado una variabilidad del coste de hasta un 50%.

**Figuras 7 y 8.** Análisis de sensibilidad de una vía modificando los costes de las pruebas.



En la figura 9 se muestra el análisis de sensibilidad modificando la prevalencia de muestras con mutaciones. De este modo se puede observar que cuando el 85% de las muestras tiene mutaciones, la estrategia que muestra mejor ICER es la secuenciación (el ratio incremental se hace cero). Por otro lado, al aumentar la sensibilidad de la DHPLC, el ICER con respecto a la secuenciación aumenta (figura 10) lo que significa que el diferencial va aumentando.

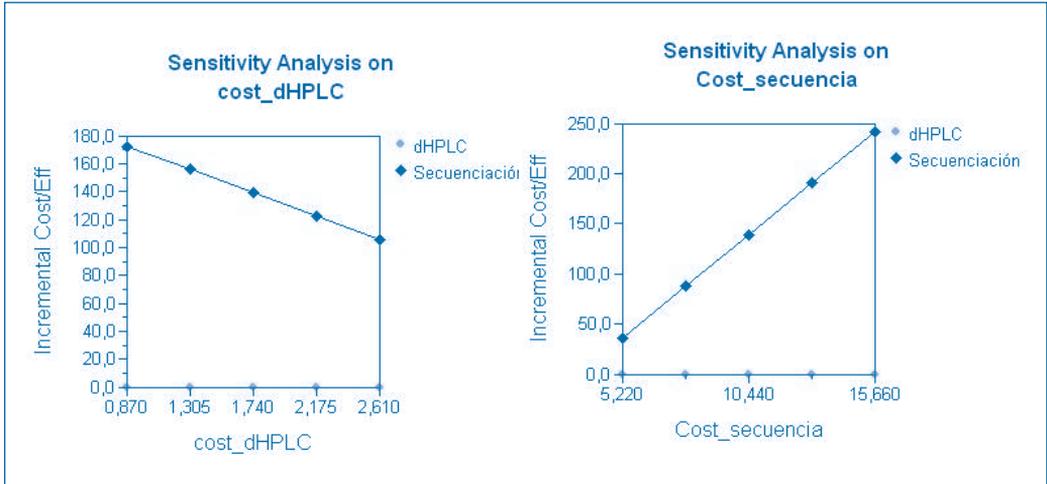
**Figuras 9 y 10. Análisis de sensibilidad de una vía modificando la prevalencia y la sensibilidad del dHPLC.**



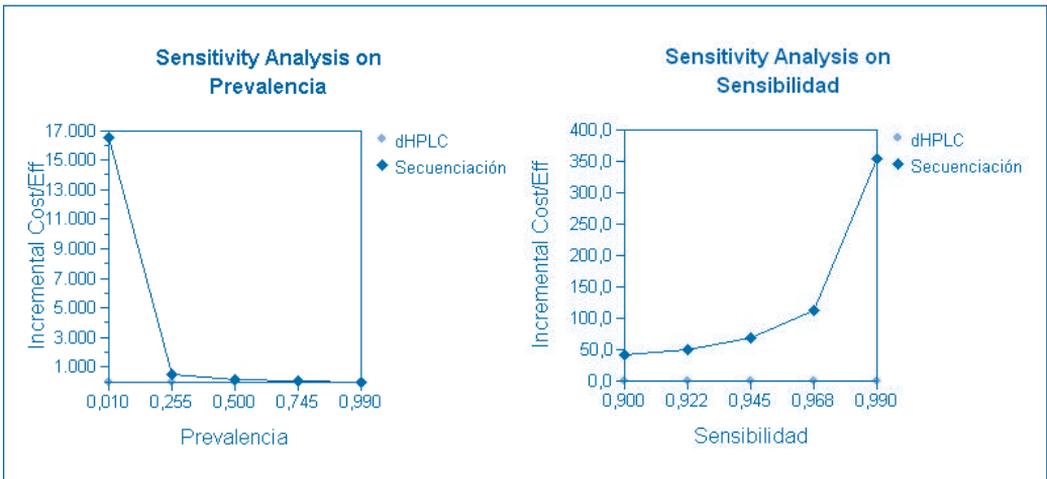
### Análisis de sensibilidad para los casos efectivos

Los análisis de sensibilidad tomando como medida de efectividad los casos efectivos muestran que, al igual que en los gráficos anteriores, el ICER de la secuenciación frente a la DHPLC aumenta al disminuir el coste de la DHPLC (figura 11) y también a media que aumenta el coste de la secuenciación (figura 12). Se ha considerado de nuevo una variabilidad del 50% en los costes. En la figura 13 se muestra el análisis de sensibilidad modificando la prevalencia de muestras con mutaciones; de este modo se puede observar que cuando el 82% de las muestras tienen mutaciones, la estrategia que muestra mejor ICER es la secuenciación. La figura 14 muestra que, al igual que en el análisis de sensibilidad para los casos encontrados, al aumentar la sensibilidad de la DHPLC, el ICER con respecto a la secuenciación se va incrementando.

**Figuras 11 y 12. Análisis de sensibilidad de una vía modificando los costes de las pruebas.**



**Figuras 13 y 14. Análisis de sensibilidad de una vía modificando la prevalencia y la sensibilidad del dHPLC.**





# Discusión

A la luz de los artículos recuperados en las diferentes fases, se observa la multiplicidad de usos de la DHPLC en el análisis de numerosas variantes de distintos genes; entre éstos, los genes seleccionados inicialmente en el presente estudio.

En las primeras fases de selección de artículos (Tablas 5 y 6) se pudo observar que, además de en los genes seleccionados en el presente trabajo, la DHPLC se está empleando para el análisis de otros muchos genes (MET, PTEN, TSC 1, TSC 2, MYH, MLH 1, MLH 2, MECP2, etc); concretamente, se comprobó que para el estudio de un gran número de patologías relacionadas con el genoma mitocondrial y no incluidas en el grupo de las conocidas como enfermedades mitocondriales, se viene utilizando la DHPLC.

En las sucesivas fases de selección de artículos, resultó que los genes objeto de mayor número de estudios son los BRCA 1 y BRCA 2 (la mayoría de las veces estudiados de forma conjunta, ya que ambos se relacionan con patologías similares). Les seguirían en frecuencia los artículos correspondientes a los genes relacionados con enfermedades mitocondriales, tras ellos los de APC y, por último, los de RET. Esta proporción constante podría obedecer a las prevalencias de las patologías relacionadas con dichos genes (las de mayor prevalencia implican una mayor facilidad para disponer de casuística que analizar) más que a las características moleculares de los genes en sí (83).

Para valorar la posible implantación de equipos de DHPLC en entornos clínicos asistenciales, una aproximación genérica o global implicaría el riesgo de obtener una gran diversidad de información de difícil concreción, cuando lo preferible sería la obtención de respuestas precisas y claras. Por esto, el estudio se orientó al uso de dicha técnica en los cuatro grupos de genes seleccionados. Pese a todo ello, uno de los rasgos más llamativos del presente trabajo es la amplia heterogeneidad de los artículos y, en consecuencia, de los datos. Así, hallamos trabajos en los que la DHPLC es el eje fundamental; trabajos en que el objeto de estudio es el correspondiente gen o genes y sus patologías relacionadas, siendo la DHPLC una herramienta más; artículos en que la DHPLC se emplea en combinación con otra/s técnica/s; estudios de costes; etc.

También se ha apreciado heterogeneidad en los resultados, muy dependiente de la muestra analizada (variando según qué fragmento de qué gen y en qué condiciones de análisis). Las mayores oscilaciones se observan en las consideraciones de costes, partiendo de que los diferentes artículos no asignan iguales precios a los ítems a considerar, valiendo como

ejemplo los costes unitarios por determinación de los que parten Wagner (47) y Arnold (55), para un mismo análisis.

En algunos artículos de evaluación económica también se expone que, en función del fragmento genómico que se estudie (con diferencias incluso entre distintos exones de un mismo gen), puede variar la sensibilidad y, en consecuencia, los costes asociados; dichos costes también se influenciarían de las prevalencias de las variantes genéticas (existiendo una proporcionalidad directa entre ambos aspectos).

Entre dichos artículos de costes, cabe destacar que en el artículo de Sevilla (40), se señala como estrategia más coste-efectiva la PTT para el análisis de mutaciones en el exón 11 de BRCA 1 y la HA para el resto de exones. El trabajo se fundamenta en una población y prevalencia teóricas, pudiendo ofrecer un modelo econométrico correcto desde la teoría, pero quizá distante de la práctica diaria de los laboratorios clínicos. Por ello, podría ser cuestionable plantear coste-efectividad de opciones resultantes de alternar o combinar diferentes técnicas, proponiendo diferentes estrategias (a veces con diferentes asociaciones tecnológicas) para el análisis de distintas variantes genéticas, aun siendo todas ellas de un mismo gen.

El requerir diversidad de aparataje, supone dos hechos: 1º) el tiempo de funcionamiento de los equipos decrecería proporcionalmente al número total de ellos; y 2º) el espacio físico para ubicación de equipamiento sería mayor (hecho considerado en la realidad de los laboratorios clínicos y no valorado en los trabajos de Sevilla et al). Una consideración adicional con respecto a la distancia entre abordajes teóricos y la realidad asistencial, es que en éste como en todos los artículos con consideraciones de costes, no se han valorado diferenciadamente dos posibilidades: disposición de aparataje por consumo versus adquisición por compra.

Lo que se cuestionaría es si, desde un enfoque práctico, no se elevarían más los costes al tener diferentes técnicas implementadas (para usar en diferentes combinaciones según qué casos), que en el caso de tener una única técnica común para el cribado mutacional previo a la secuenciación. Este supuesto cobraría más valor si consideramos la aplicación de la técnica en cuestión, no sólo para el estudio de un gen concreto, sino para el posible análisis de un espectro de genes y patologías mucho más amplio (9).

Desde esta perspectiva, puede plantearse como factor preponderante de cara a la introducción de una técnica de cribado de mutaciones, su posible aplicación común al mayor abanico de posibilidades. Al tratarse de tecnologías de uso polivalente, un objetivo podría ser su uso en el análisis de la mayor cantidad de variantes del mayor número de genes, a fin de obtener el máximo rendimiento a su funcionamiento. En tal caso, la técnica más coste-efectiva no sería la de mayor validez analítica para una variante concreta, sino la que además mostrara un mayor número de posibles

aplicaciones. Una consecuencia derivada de lo anterior sería que los centros asistenciales que implementaran dicha técnica, habrían de aglutinar un número global de análisis relevante, con objeto de rentabilizar la presencia de dicha tecnología en sus laboratorios.

Pese a la heterogeneidad de los artículos recuperados a la que antes hacíamos alusión, la mayoría de ellos presentaba ciertas características comunes. Se trataba de estudios bien diseñados, en los que se exponían con detalle las condiciones de la técnica aplicada (temperaturas, concentraciones, volúmenes, etc) en virtud de su reproducibilidad. La mayoría de ellos eran estudios transversales o de corte, en los que a una determinada población se le realizaba una o más pruebas genéticas. En una minoría de artículos no se detallaba el número de sujetos estudiados. Aun así, debería de resaltarse el hecho de que para los fines del presente estudio, no sólo son valorables el número de sujetos estudiados, sino también el número de pruebas que se les realicen (por ejemplo, estudio de diferentes variantes genéticas y/o con distintas técnicas).

En estos estudios transversales, se analizaban posibles variantes genéticas con una o varias técnicas (máximo 5), describiendo las frecuencias de las variantes obtenidas, las cualidades de dichas técnicas, etc, sin utilizar fenómenos de enmascaramiento, al no saber a priori qué sujetos presentarían o no dichas variantes.

Otro aspecto a tener en cuenta es que en los agrupados como estudios de casos y controles, el clasificar en uno u otro grupo, presenta a veces una inadecuada definición. Esto se debe a que, en ocasiones, los individuos que presuntamente no presentarían variantes genéticas (y a tal fin eran reclutados), tras el correspondiente análisis sí que portaban alguna o algunas mutaciones/polimorfismos (buscados ex profeso o hallados casualmente). Sobre el mismo aspecto, pero en sentido contrario, también se observó que algunos sujetos clasificados en el grupo de supuestos “casos” por tratarse de lo que se denominó “individuos de riesgo” (en base a sus características clínicas y/o su historia familiar), tras la realización de la correspondiente prueba genética resultó que no portaban alguna o ninguna variante.

Como último hecho a destacar acerca del tema caso-control, llama la atención que en sólo uno de los artículos recuperados, el de Arnold et al (55), se expone como utilidad de la DHPLC el establecimiento de una población control. Y resulta llamativo dado que es un hecho rutinario en los centros que tienen implementada esta técnica para cribado mutacional: al hallar una variante no conocida en un sujeto de riesgo, se escoge un amplio grupo poblacional (sin riesgo para la mutación/patología objeto de estudio) y se analiza la posible presencia de la nueva variante hallada.

También sería rutinario realizar ‘pooles’ o mezclas de DNA para analizar variantes genéticas: un pool de, por ejemplo, el DNA de diez

pacientes, permitiría que en caso de resultar negativo para una mutación buscada, considerar negativos a todos ellos para dicha mutación. Esta posibilidad resulta crucial para calcular las consecuencias de su realización, en cuanto a tiempos de análisis, consumo de fungible y, por ende, de costes asociados. Sin embargo, tan sólo dos de los artículos recuperados (84,85) recurren a esta posibilidad y no concretamente con la finalidad anteriormente descrita, sino para establecer el límite de detección de la DHPLC.

Con respecto a la calidad global de los artículos recuperados, podría afirmarse que no es elevada: de los 61 resultantes del proceso de inclusión-exclusión, se realizó una posterior selección con objeto de descartar aquéllos que tenían defectos de diseño o de exposición de métodos y/o resultados (tales como la ausencia de definición del tamaño muestral, etc), escogiendo únicamente los que mostraban con cierta claridad sus resultados de forma cuantitativa; así, resultaron 18 artículos en total (un 28,5%).

De estos 18 artículos, la calidad en conjunto es alta o muy alta (entre 7 y 9/10) alcanzando 12 de ellos (el 66%) 9 puntos en la escala CASPe. La causa más frecuente de pérdida de puntuación, fue la ausencia de evaluación ciega de los resultados. Es lógico este resultado si atendemos a que en la mayoría de los estudios, se testaban simultáneamente las distintas técnicas y se cotejaban los resultados con posterioridad, sin conocer inicialmente los resultados del patrón de oro, o dicho de otra forma, sin identificar previamente los portadores de mutaciones/polimorfismos mediante secuenciación.

Siguiendo el orden de la guía CASPe, habría de afirmarse que la exposición de sensibilidades y especificidades no sólo fue correcta en términos absolutos, sino que además de ello, en más del 50% de los casos se mostró una relación detallada de tales aspectos y sus variaciones en función de posibles modificaciones de las condiciones analíticas (tales como temperatura, concentraciones de diferentes reactivos presentados de forma pormenorizada, etc), lo cual redundaría en una mejor reproducibilidad de la técnica.

Con respecto a la cuestión de la guía CASPe acerca de si los resultados modificarán la toma de decisiones, ésta se ha valorado generalmente de forma positiva, pese a que han transcurrido varios años desde la publicación de estos artículos y no se ha llevado a cabo una modificación universal de los algoritmos diagnósticos.

La puntuación máxima en la escala de CASPe no fue alcanzada en ningún artículo. Aunque la mayoría de trabajos no contemplaba el uso de fenómenos de enmascaramiento, como sugeríamos con anterioridad, dos de ellos (Eng (48) y Wagner (53)) sí lo hicieron, aunque presentaron alguna otra limitación que impidió obtener 10 puntos en la valoración establecida. En el artículo de Liu et al (80), se realizó una evaluación ciega con parte de la casuística analizada, además de aleatorizar; no obstante, no se ha consi-

derado este hecho dado que dichos casos correspondían a cáncer gástrico y no a enfermedad mitocondrial (pues dichas patologías se estudiaron conjuntamente).

El mejor diseño de estudio para la finalidad del presente trabajo (y por tanto, subsidiario de máxima puntuación) hubiera sido el que previamente hubiera identificado los sujetos portadores de variante/s genética/s mediante secuenciación; tras ello, los habría distribuido de forma aleatoria y habría realizado un análisis ciego mediante DHPLC (sola o conjuntamente con otras técnicas), determinando su validez analítica para cada variante en cuestión, y de forma global. Este modelo soslayaría los problemas de asignación de categorías que comentábamos a propósito de los casos-contróles, los cuales, por otro lado serían los estudios idóneos para el propósito del presente trabajo al tratarse de una técnica diagnóstica. Los artículos que más se aproximarían a dicho esquema serían los de Eng (48) y Wagner (53) antes nombrados. Llama la atención que éstos, junto los que se aproximan a estas líneas, no son los artículos más recientes de los recuperados sino que, por el contrario, podríamos calificarlos de ‘clásicos’ dentro de la literatura sobre DHPLC.

No obstante, el diseño antes planteado tendría alguna limitación, como la hallada en el estudio de Emmerson sobre APC (61), en que la DHPLC detecta variantes que la secuenciación no discrimina, lo cual ya se apuntaba al introducir el tema. En el análisis mutacional del genoma mitocondrial completo, van den Bosch (82) advierte el mismo obstáculo; en concreto, observa cómo la secuenciación y la SSCP son menos sensibles que la DGGE y la DHPLC, destacando la mayor facilidad de esta última frente a la anterior para ser automatizada.

Dicha automatización es un factor determinante al proponer la DHPLC como herramienta para cribado de muestras para secuenciar, al redundar en aspectos como la minimización los costes de personal, además de ahorrar un 86% de las secuenciaciones, con los gastos asociados de fungible, personal y tiempo de respuesta, lo cual se sugiere en diferentes artículos. Si a esta consideración le añadimos los resultados observados en diferentes trabajos en cuanto a validez analítica y validez clínica ya comentados, la DHPLC podría perfilarse como una técnica de recomendable introducción en ámbitos clínicos asistenciales, una vez realizado un análisis pormenorizado de costes. Para ello, los parámetros anteriores se habrían de conjugar con el aspecto de las prevalencias de las diferentes mutaciones o, mejor aún, con el número de sospechas diagnósticas o sujetos candidatos a la realización de las diferentes pruebas genéticas, como verdadera población diana.

Con respecto a este último aspecto de las prevalencias, los análisis de sensibilidad de la evaluación económica incluida en el presente informe,

indican que la secuenciación de DNA sería coste-efectiva en el hipotético caso de que en los análisis correspondientes a las muestras seleccionadas, la prevalencia de variantes genéticas fuera superior al 80%. En la práctica, este hecho sería muy improbable, puesto que varios análisis corresponderían a una misma muestra biológica de un mismo individuo seleccionado (o sospechoso de portar dicha variante), consecuencia de estudiar diversas posibles variantes de un mismo gen; debido a ello, pese a que la selección de sujetos sospechosos de portar variantes genéticas fuera muy específica, la prevalencia de posibles pruebas positivas sería escasa al estar aumentando el número de pruebas por individuo y, por tanto, el número de pruebas total.

Las premisas anteriores habrán sido determinantes a la hora de implementar la DHPLC en el análisis rutinario de los genes expuestos, en centros de investigación y algunos hospitales (86,87).

# Conclusiones

Para la evaluación de la propuesta de empleo de DHPLC como herramienta de cribado en el diagnóstico molecular de los genes *BRCA 1*, *BRCA 2*, *APC*, *RET* y genes relacionados con enfermedades mitocondriales, ha sido necesario una aproximación a la literatura científica por separado, extrayendo de un análisis global las siguientes conclusiones:

1. La DHPLC es utilizada actualmente en el estudio de variantes en dichos genes, entre otros muchos, siendo la producción científica, por orden de frecuencia: *BRCA 1* y *BRCA 2* (estudiados de forma conjunta), enfermedades mitocondriales, *APC* y *RET*. El estudio por DHPLC de los 4 oncogenes se realiza actualmente en algunos centros de investigación y hospitales de referencia, dentro de los análisis rutinarios de uso clínico.
2. Los artículos recuperados muestran sensibilidades y especificidades altas (próximas al 100%) al utilizar la DHPLC en la detección de variantes genéticas, próximas al estándar de oro y generalmente superiores a otras técnicas de diagnóstico genético, cuando se han establecido comparaciones entre ellas.
3. La posible incorporación de DHPLC como herramienta de cribado mutacional, puede hacer disminuir el número de muestras seleccionadas para secuenciación, además de lograr detectar ciertas variantes genéticas no detectadas al secuenciar.
4. El decremento del número de muestras para secuenciación de DNA, supondría una disminución de los costes asociados a dicha técnica (en fungible, personal, tiempos de respuesta, etc). La posibilidad de automatización de la DHPLC, reduciría los costes de personal derivados de forma proporcional a la velocidad y número de muestras por ensayo.
5. La evaluación económica realizada en el presente informe, muestra a la secuenciación de DNA como una prueba más costosa que la DHPLC, con una ratio coste-efectividad incremental (ICER) de 278,13 €, pese a ser más efectiva.



# Referencias

1. Kwok PY, Xiao M. Single-molecule analysis for molecular haplotyping. *Hum Mutat.* 2004; 23:442-6.
2. Liu W, Smith DI, Reetz KJ, Thibodeau SN, James CD. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations. *Nucleic Acids Research.* 1998; 26:1396-1400.
3. Kosaki K, Uda T, Okuyama T. DHPLC in clinical molecular diagnostic services. *Mol Genet Metab.* 2005; 86:117-23.
4. Pons Castillo A, Bennani F, Cañizares Hernández F. HPLC desnaturizante (DHPLC): Nuevo método de screening de enfermedades genéticas. *AEFA Actualidades.* 2005; 59-64.
5. O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, et al. Blind analysis of denaturing high performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics.* 1998; 52:44-9.
6. Bai RK, Wong LJC. Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach. *Clin Chem.* 2004; 50:996-1001.
7. Breast Cancer information Core (BIC). [consulta el 14/08/2006]. URL: [http://www.nhgri.nih.gov/Intramural\\_research/Lab\\_transfer/Bic/](http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/).
8. Foode R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002; 38:867-71.
9. de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev.* 2006; 27:535-60.
10. von Kleist-Retzow JC, Schauseil-Zipf U, Michalk DV, Kunz WS. Mitochondrial diseases-an expanding spectrum of disorders and affected genes. *Exp Physiol.* 2003; 88:155-66.
11. DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1658:80-8.
12. Khan KS, ter Riet G, Glanville J, Sowden AJ, Kleijnen J, editores. Undertaking systematic reviews of research on effectiveness. CRD's guidance for those carrying out or commissioning reviews. CRD report number 4. York: Center for Reviews and Dissemination. University of York, 2001.
13. Cochrane Reviewers' Handbook 4.2.2 [updated March 2004]. In: Alderson P, Green S, Higgins JPT, editors. *The Cochrane Library*, Issue 1, 2004. Chichester, UK: John Wiley & Son, Ltd.

14. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *BMJ*. 2003; 326(7379):41-4.
15. Guías CASPe de Lectura Crítica de la Literatura [Internet]. Alicante: CASPe España, Coordinación General, 2005. [consulta el 29/12/2006]. URL:  
<http://www.redcaspe.org/herramientas/lectura/11economica.pdf>.
16. Servicio central de apoyo a la investigación tarifas 2007. [consulta el 9/4/2007]. URL:  
<http://www.uco.es/organiza/servicios/apoyo/scai/marcos-servicios/analisis/cromatografia/index.htm>.
17. Stanford Genome Technology Center. [consulta el 16/11/2006]. URL:  
[http://insertion.stanford.edu/pub\\_sensitivity\\_specific.html](http://insertion.stanford.edu/pub_sensitivity_specific.html).
18. Ellis LA, Taylor CF, Taylor GR. A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. *Hum Mutat*. 2000; 15(6):556-64.
19. Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, et al. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem*. 1999; 45(8):1133-1140.
20. Spiegelman JI, Mindrinos MN, Oefner PJ. High accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC. *BioTechniques*. 2000;29(5):1084-1092.
21. Choy YS, Dabora SL, Hall F, Ramesh V, Niida Y, Franz D, et al. Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2. *Ann Hum Genet*. 1999; 63:383-391.
22. Li N, Zhang X, Cai Y, Xu X, Zhang L, Pan KF, et al. BRCA1 germline mutations in Chinese patients with hereditary breast and ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006; 16 Suppl 1:172-8.
23. Weber J, Looten R, Houdayer C, Stoppa-Lyonnet D, Viovy JL. Improving sensitivity of electrophoretic heteroduplex analysis using nucleosides as additives: Application to the breast cancer predisposition gene BRCA2. *Electrophoresis*. 2006; 27:1444-52.
24. Song CG, Hu Z, Yuan WT, Di GH, Shen ZZ, Huang W, et al. BRCA1 and BRCA2 gene mutations of familial breast cancer from Shanghai in China. *Chinese Journal of Medical Genetics*. 2006; 23:27-31.
25. Song CG, Hu Z, Wu J, Luo JM, Shen ZZ, Huang W, et al. The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in eastern Chinese women with breast cancer. *J Cancer Res & Clin Oncol*. 2006; 132:617-26.

26. Kim YT, Nam EJ, Yoon BS, Kim SW, Kim SH, Kim JH, et al. Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 in Korean sporadic ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005; 99:585-90.
27. Tommasi S, Crapolicchio A, Lacalamita R, Bruno M, Monaco A, Petroni S, et al. BRCA1 mutations and polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy. *Mutat Res.* 2005; 578:395-405.
28. Palomba G, Pisano M, Cossu A, Budroni M, Redola MF, Farris A, et al. Spectrum and prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Sardinian patients with breast carcinoma through hospital-based screening. *Cancer.* 2005; 104:1172-9.
29. Song CG, Hu Z, Yuan WT, Di GH, Shen ZZ, Huang W, et al. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in early-onset breast cancer patients in Shanghai. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85:3030-4.
30. Belogianni I, Apeessos A, Mihalatos M, Razi E, Labropoulos S, Petounis A, et al. Characterization of a novel large deletion and single point mutations in the BRCA1 gene in a Greek cohort of families with suspected hereditary breast cancer. *BMC Cancer.* 2004; 4:61.
31. Hartmann C, John AL, Klaes R, Hofmann W, Bielen R, Koehler R, et al. Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German high-risk breast cancer families. *Hum Mutat.* 2004; 24:534.
32. Deng S, Wang Y, Ke Y, Xu G. Analysis of the mutations of BRCA1 in 9 familiar breast cancer patients. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2003; 35:373-6.
33. Oberacher H, Huber CG, Oefner PJ. Mutation scanning by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (ICEMS). *Hum Mutat.* 2003; 21:86-95.
34. Perkowska M, BroZek I, Wysocka B, Haraldsson K, Sandberg T, Johansson U, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in breast-ovarian cancer families from northeastern Poland. *Hum Mutat.* 2003; 21:553-4.
35. Meyer P, Voigtlaender T, Bartram CR, Klaes R. Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families in Southern Germany. *Hum Mutat.* 2003; 22:259.
36. Rajkumar T, Soumitra N, Nancy NK, Swaminathan R, Sridevi V, Shanta V. BRCA1, BRCA2 and CHEK2 (1100 del C) germline mutations in hereditary breast and ovarian cancer families in South India. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2003; 4:203-8.
37. Footz T, Somerville MJ, Tomaszewski R, Sprysak KA, Backhouse CJ. Heteroduplex-based genotyping with microchip electrophoresis and dHPLC. *Genet Test.* 2003; 7:283-93.

38. Kanaan Y, Kpenu E, Utley K, Adams-Campbell L, Dunston GM, Brody LC, et al. Inherited BRCA2 mutations in African Americans with breast and/or ovarian cancer: A study of familial and early onset cases. *Human Genetics*. 2003; 113:452-60.
39. Heike Y. Methodology of genetic diagnosis for inheritant breast cancer. *IRYO Japanese Journal of National Medical Services*. 2003; 57:409-13.
40. Sevilla C, Julian-Reynier C, Eisinger F, Stoppa-Lyonnet D, Bressac de Paillerets B, Sobol H, et al. Impact of gene patents on the cost-effective delivery of care: The case of Int J Technol Assess Health Care. 2003; 19:287-300.
41. Andrulis IL, Anton-Culver H, Beck J, Bove B, Boyd J, Buys S, et al. Comparison of DNA- and RNA-based methods for detection of truncating BRCA1 mutations. *Hum Mutat*. 2002; 20:65-73.
42. Kang HC, Kim IJ, Park JH, Kwon HJ, Won YJ, Heo SC, et al. Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 in Korean breast and/or ovarian cancer families. *Hum Mutat*. 2002; 20:235.
43. Sevilla C, Moatti JP, Julian-Reynier C, Eisinger F, Stoppa-Lyonnet D, Bressac de Paillerets B, et al. Testing for BRCA1 mutations: a cost-effectiveness analysis. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10:599-606.
44. Pfeiffer RM, Bura E, Smith A, Rutter JL. Two approaches to mutation detection based on functional data. *Stat Med*. 2002; 21:3447-64.
45. Palmieri G, Palomba G, Cossu A, Pisano M, Dedola MF, Sarobba MG, et al. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Sardinian breast cancer families and their implications for genetic counseling. *Ann Oncol*. 2002; 13:1899-907.
46. Arnold N, Peper H, Bandick K, Kreikemeier M, Karow D, Teegen B, et al. Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002; 782:99-104.
47. Muhr D, Wagner T, Oefner PJ. Polymerase chain reaction fidelity and denaturing high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002; 782:105-10.
48. Eng C, Brody LC, Wagner TM, Devilee P, Vijn J, Szabo C, et al. Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1. *J Med Genet*. 2001; 38:824-33.
49. Tomka M, Sedlakova O, Reinerova M, Veselovska Z, Stevurkova V, Bartosova Z, et al. Mutation screening of the BRCA1 gene in Slovak patients. *Neoplasma*. 2001; 48:451-5.
50. Gross E, Arnold N, Pfeifer K, Bandick K, Kiechle M. Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. *Hum Mutat*. 2000; 16:345-53.

51. Shiri-Sverdlov R, Oefner P, Green L, Baruch RG, Wagner T, Kruglikova A, et al. Mutational analyses of BRCA1 and BRCA2 in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jewish women with familial breast and ovarian cancer. *Hum Mutat.* 2000; 16:491-501.
52. Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pages S, Sandberg T, et al. Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics.* 1999; 62:369-76.
53. Wagner TM, Hirtenlehner K, Shen P, Moeslinger R, Muhr D, Fleischmann E, et al. Global sequence diversity of BRCA2: analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations. *Hum Mol Genet.* 1999; 8:413-23.
54. Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Gene.t* 1999; 105:72-8.
55. Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Kiechle M. A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat.* 1999; 14:333-9.
56. Liu XR, Shan XN, Friedl W, Uhlhaas S, Propping P, Wang YP. Analysis of germline mutations in the APC gene in familial adenomatous polyposis patients. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2005; 22:261-4.
57. Mihalatos M, Apessos A, Dauwerse H, Kosmidis PA, Fountzilas G, Agnantis NJ, et al. Rare mutations predisposing to familial adenomatous polyposis in Greek FAP patients. *BMC Cancer.* 2005; 5:40.
58. Wei SC, Su YN, Tsai-Wu JJ, Wu CH, Huang YL, Sheu JC, et al. Genetic analysis of the APC gene in Taiwanese familial adenomatous polyposis. *J Biomed Sci.* 2004; 11:260-5.
59. Zhou XL, Eriksson U, Werelius B, Kressner U, Sun XF, Lindblom A. Definition of candidate low risk APC alleles in a Swedish population. *Int J Cancer.* 2004; 110:550-7.
60. Lilleberg SL, Durocher J, Sanders C, Walters K, Culver K. High sensitivity scanning of colorectal tumors and matched plasma DNA for mutations in APC, TP53, K-RAS, and BRAF genes with a novel DHPLC fluorescence detection platform. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1022:250-6.
61. Emmerson P, Maynard J, Jones S, Butler R, Sampson JR, Cheadle JP. Characterizing mutations in samples with low-level mosaicism by collection and analysis of DHPLC fractionated heteroduplexes. *Hum Mutat.* 2003; 21:112-5.
62. Mihalatos M, Apessos A, Triantafillidis JK, Kosmidis PA, Fountzilas G, Agnantis NJ, et al. Evaluation of dHPLC in mutation screening of the APC gene in a Greek FAP cohort. *Anticancer Res.* 2003; 23:2691-5.

63. Young J, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Spring K, Biden KG, et al. Mutation searching in colorectal cancer studies: experience with a denaturing high-pressure liquid chromatography system for exon-by-exon scanning of tumour suppressor genes. *Pathology*. 2002; 34:529-33.
64. Wu G, Wu W, Hegde M, Fawcner M, Chong B, Love D, et al. Detection of sequence variations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene using denaturing high-performance liquid chromatography. *Genet Test*. 2001; 5:281-90.
65. Pazaitou-Panayiotou K, Kaprara A, Sarika L, Zovoilis T, Belogianni I, Vainas I, et al. Efficient testing of the RET gene by DHPLC analysis for MEN 2 syndrome in a cohort of patients. *Anticancer Res*. 2005; 25:2091-5.
66. Torrente I, Arturi F, D'Aloiso L, Colosito A, De Luca A, Ferretti E, et al. Evaluation of a DHPLC-based assay for rapid detection of RET germline mutations in Italian patients with medullary thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest*. 2004; 27:111-6.
67. Wurzbarger RJ, Gupta R, Parnassa AP, Jain S, Wexler JA, Chu JL, et al. Use of GC clamps in DHPLC mutation scanning. *Clin Med Res*. 2003; 1:111-8.
68. Marsh DJ, Theodosopoulos G, Howell V, Richardson AL, Benn DE, Proos AL, et al. Rapid mutation scanning of genes associated with familial cancer syndromes using denaturing high-performance liquid chromatography. *Neoplasia*. 2001; 3:236-44.
69. Naimi M, Bannwarth S, Procaccio V, Pouget J, Desnuelle C, Pellissier JF, et al. Molecular analysis of ANT1, TWINKLE and POLG in patients with multiple deletions or depletion of mitochondrial DNA by a dHPLC-based assay. *Eur J Hum Genet*. 2006; 14:917-22.
70. Bayat A, Walter J, Lamb H, Marino M, Ferguson MW, Ollier WE. Mitochondrial mutation detection using enhanced multiplex denaturing high-performance liquid chromatography. *Int J Immunogenet*. 2005; 32:199-205.
71. Winterthun S, Ferrari G, He L, Taylor RW, Zeviani M, Turnbull DM, et al. Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology*. 2005; 64:1204-8.
72. Meierhofer D, Mayr JA, Ebner S, Sperl W, Kofler B. Rapid screening of the entire mitochondrial DNA for low-level heteroplasmic mutations. *Mitochondrion*. 2005; 5:282-96.
73. Biggin A, Henke R, Bennetts B, Thorburn DR, Christodoulou J. Mutation screening of the mitochondrial genome using denaturing high-performance liquid chromatography. *Mol Genet Metab*. 2005; 84:61-74.
74. Mashima Y. DNA diagnosis in the age of individual made-to-order medications. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2004; 108:863-85.

75. Krajewski KM, Shy ME. Genetic testing in neuromuscular disease. *Neurologic Clinics*. 2004; 22:481-508.
76. Frueh FW, Noyer-Weidner M. The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41:452-61.
77. Danielson PB, Shelton RJ, Laberge GS. Clinical applications of denaturing high-performance liquid chromatography-based genotyping. *Croat Med J*. 2003; 44:447-54.
78. Conley YP, Brockway H, Beatty M, Kerr ME. Qualitative and quantitative detection of mitochondrial heteroplasmy in cerebrospinal fluid using denaturing high-performance liquid chromatography. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2003; 12:99-103.
79. Lilleberg SL. In-depth mutation and SNP discovery using DHPLC gene scanning. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2003; 6:237-52.
80. Liu MR, Pan KF, Li ZF, Wang Y, Deng DJ, Zhang L, et al. Rapid screening mitochondrial DNA mutation by using denaturing high-performance liquid chromatography. *World J Gastroenterol*. 2002; 8:426-30.
81. Benit P, Chretien D, Kadhon N, Lonlay-Debeney P, Cormier-Daire V, Cabral A, et al. Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet*. 2001; 68:1344-52.
82. van den Bosch BJ, de Coo RF, Scholte HR, Nijland JG, van den Bogaard R, de Visser M, et al. Mutation analysis of the entire mitochondrial genome using denaturing high performance liquid chromatography. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28:89.
83. Rogowski W. Genetic screening by DNA technology: a systematic review of health economic evidence. *Int J Technol Assess Health Care*. 2006; 22:327-37.
84. Wolford JK, Blunt D, Ballecer C, Prochazka M. High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Hum Mutat*. 2000; 107:483-7.
85. Hoogendoorn B, Norton N, Kirov G, Williams N, Hamshire ML, Spurlock G, et al. Cheap, accurate and rapid allele frequency estimation of single nucleotide polymorphisms by primer extension and DHPLC in DNA pools. *Hum Mutat*. 2000; 107:488-93.
86. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Programa de patología molecular. [consulta el 17/12/2006]. URL: <http://www.cnio.es/es/programas/prog504a.asp>.
87. Plan de Genética de Andalucía 2006. [consulta el 17/12/2006]. p 68. URL: <http://www.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/principal/documentos.asp>?



# Anexos

## Anexo 1. Estrategias de búsqueda:

### 1. Genes *BRCA 1* y *BRCA 2*:

#### **MEDLINE**

- #1 “denaturing high-performance liquid chromatography” in TI,AB
- #2 dhplc in TI,AB
- #3 “Chromatography-High-Pressure-Liquid”/ economics , methods, trends , utilization
- #4 #1 or #2 or #3
- #5 brca\*
- #6 #5 in ti,ab
- #7 “Genes-BRCA1”/ all subheadings
- #8 “BRCA1-Protein”/ all subheadings
- #9 “BRCA2-Protein”/ all subheadings
- #10 “Genes-BRCA2”/ all subheadings
- #11 #7 or #8 or #9 or #10
- #12 #6 or #11
- #13 #4 and #12

#### **EMBASE**

- #1. dhplc:ti,ab
- #2. ‘high performance liquid chromatography’/exp
- #3. ‘denaturing high-performance liquid chromatography’:ab,ti AND [1999-2006]/py
- #4. #18 OR #19 OR #20
- #5. brca\*:ti,ab AND [1999-2006]/py
- #6. ‘brca1 protein’/exp AND [1999-2006]/py
- #7. ‘brca2 protein’/exp AND [1999-2006]/py
- #8. #26 OR #27 OR #28
- #9. #25 AND #29

### 2. Gen *APC*:

#### **MEDLINE**

- #1 “denaturing high-performance liquid chromatography” in TI,AB
- #2 dhplc in TI,AB

- #3 “Chromatography-High-Pressure-Liquid”/ economics, methods, trends , utilization
- #4 #1 or #2 or #3
- #5 (apc in ti,ab)
- #6 “Genes-APC”/ all subheadings
- #7 explode “Colorectal-Neoplasms”/ diagnosis, epidemiology, etiology , prevention-and-control
- #8 #6 OR #7
- #9 #5 or #8
- #10 #4 and #9

### **EMBASE**

- #1. dhplc:ti,ab
- #2. ‘high performance liquid chromatography’/exp
- #3. ‘denaturing high-performance liquid chromatography’:ab,ti AND [1999-2006]/py
- #4. #18 OR #19 OR #20
- #5. ‘tumor suppressor gene’/exp AND [1999-2006]/py
- #6. ‘apc protein’/de AND [1999-2006]/py
- #7. #26 OR #27
- #8. ‘colon cancer’/exp AND [1999-2006]/py
- #9. #25 AND #28 AND #29

### 3. Gen RET:

#### **MEDLINE**

- #1 “denaturing high-performance liquid chromatography” in TI,AB
- #2 dhplc in TI,AB
- #3 “Chromatography-High-Pressure-Liquid”/ economics, methods, trends, utilization
- #4 #1 or #2 or #3
- #5 “Multiple-Endocrine-Neoplasia-Type-2a”/ congenital, diagnosis, epidemiology, etiology, genetics, mortality, pathology, prevention- and-control, psychology, surgery
- #6 “Multiple-Endocrine-Neoplasia-Type-2b”/ congenital, diagnosis, epidemiology, etiology, genetics, mortality, pathology, prevention-and- control, psychology, surgery
- #7 “Thyroid-Neoplasms”/ congenital, diagnosis, epidemiology, etiology, genetics, mortality, pathology, prevention-and-control, psychology, surgery

- #8 #5 or #6 or #7
- #9 “Carcinoma-Medullary”/ congenital, diagnosis, epidemiology, etiology, genetics, mortality, pathology, prevention-and-control, psychology, surgery
- #10 #8 or #9
- #11 “Proto-Oncogene-Proteins-c-ret”/ all subheadings
- #12 ret or (MEN 2 gene) in ti,ab

#### **EMBASE**

- #1. denaturing:ab,ti AND ‘high performance’:ab,ti AND liquid:ab,ti AND chromatography:ab,ti
- #2. dhplc:ti,ab
- #3. ‘high performance liquid chromatography’/exp
- #4. #17 OR #18 OR #19
- #5. ‘multiple endocrine neoplasia’/exp
- #6. ‘thyroid tumor’/exp
- #7. ‘thyroid cancer’/de
- #8. ‘thyroid medullary carcinoma’/de OR ‘thyroid carcinoma’/de
- #9. #21 OR #22 OR #23 OR #24
- #10. ‘protein ret’/de OR ‘oncogene ret’/de
- #11. ret:ab,ti OR (men:ab,ti AND 2:ab,ti AND gene:ab,ti)
- #12. #26 OR #27
- #13. #20 AND #25 AND #28

#### 4. Genes relacionados con enfermedades Mitocondriales:

#### **MEDLINE**

- #1 “denaturing high-performance liquid chromatography” in TI,AB
- #2 dhplc in TI,AB
- #3 “Chromatography-High-Pressure-Liquid”/ economics, methods, trends, utilization
- #4 #1 or #2 or #3
- #5 explode “Mitochondrial-Diseases”/ all subheadings
- #6 mitochondr\*
- #7 #5 or #6
- #8 melas or merrf or (kerns?sayre) or (leigh near3 (syndrome or disease)) or friedreich
- #9 #4 and (#7 or #8)

#### **EMBASE**

- #1. dhplc:ti,ab
- #2. ‘high performance liquid chromatography’/exp

- #3. 'denaturing high-performance liquid chromatography':ab,ti AND [1999-2006]/py
- #4. 'disorders of mitochondrial functions'/exp AND [1999-2006]/py
- #5. 'melas'/exp OR 'merrf'/exp OR (kerns?sayre) OR 'leigh \*3 syndrome' OR 'leigh \*3 disease' OR friedreich AND [1999-2006]/py
- #6. #18 OR #19 OR #20
- #7. #23 OR #24
- #8. #25 AND #26

## Anexo 2. Guía CASPe:

Puntúa la evidencia sobre la eficacia clínica: 10 preguntas para dar sentido a un artículo sobre diagnóstico.

### **A: ¿SON VÁLIDOS LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO?**

#### *Preguntas “de eliminación”:*

#### **1. ¿Existió una comparación con una prueba de referencia adecuada?**

PISTAS:

- ¿Es correcto el patrón de oro? (no siempre se puede aplicar el mismo patrón de oro a todos los pacientes):

**SI** , **NO SE PUEDE SABER** , **NO**

#### **2. ¿Incluyó la muestra un espectro adecuado de pacientes?** PISTAS:

- ¿Están adecuadamente descritos los pacientes y cómo se seleccionaron?
- Casi cualquier prueba distingue entre sanos y gravemente enfermos.

**SI** , **NO SE PUEDE SABER** , **NO**

#### **3. ¿Existe una adecuada descripción de la prueba?** PISTAS:

- ¿Se define con claridad que es un resultado positivo y qué es un resultado negativo?
- ¿Se especifica la reproducibilidad de la prueba (este puede ser un punto clave en pruebas que dependen del observador como las técnicas de imagen)?

**SI** , **NO SE PUEDE SABER** , **NO**

#### **¿Merece la pena continuar?: Preguntas “de matiz”.**

#### **4. ¿Hubo evaluación “ciega” de los resultados?** PISTA:

- ¿Las personas que interpretaron la prueba conocían los resultados del patrón de oro (y viceversa)?

**SI** , **NO SE PUEDE SABER** , **NO**

#### **5. ¿La decisión de realizar el patrón de oro fue independiente del resultado de la prueba problema?** PISTAS: Considerar si:

- Se incluyeron preferentemente los resultados positivos en la prueba a evaluar.

- Se utilizaron diferentes patrones de oro en los positivos y en los negativos.

**SI , NO SE PUEDE SABER , NO**

## **B: ¿CUÁLES SON LOS RESULTADOS?**

### **6. ¿Se pueden calcular los Cocientes de Probabilidad (*Likelihood ratios*)?**

PISTAS:

- ¿Se han tenido en cuenta los pacientes con resultado “no concluyentes”?
- ¿Se pueden calcular los cocientes de probabilidad para distintos niveles de la prueba, si procede?

### **7. ¿Cuál es la precisión de los resultados? PISTA:**

- Hay que buscar o calcular los intervalos de confianza de los cocientes de probabilidad.

## Anexo 3. Motivos de exclusión de Artículos:

<b>Tabla 13.: ARTÍCULOS SOBRE BRCA 1-BRCA 2.</b>	
<b>CAUSA PRINCIPAL DE EXCLUSIÓN</b>	<b>Nº ARTÍCULOS</b>
Tratar sobre otros oncogenes y citar BRCA tangencialmente	6
No tratar sobre BRCA (las siglas tienen otra correspondencia)	1
Exponer hallazgo de nuevas mutaciones y/o sus implicaciones	6
Revisiones narrativas, cartas al director y artículos de opinión	3
No contemplar el uso de DHPLC	2
<b>TOTAL ARTÍCULOS SOBRE BRCA EXCLUIDOS</b>	<b>18</b>

<b>Tabla 14.: ARTÍCULOS SOBRE APC.</b>	
<b>CAUSA PRINCIPAL DE EXCLUSIÓN</b>	<b>Nº ARTÍCULOS</b>
Tratar sobre otros oncogenes y citar APC tangencialmente	5
No tratar sobre APC (las siglas tienen otra correspondencia)	5
Exponer hallazgo de nuevas mutaciones y/o sus implicaciones	5
No tratar sobre la especie humana	3
No contemplar el uso de DHPLC	2
<b>TOTAL ARTÍCULOS SOBRE APC EXCLUIDOS</b>	<b>20</b>

<b>Tabla 15: ARTÍCULOS SOBRE RET.</b>	
<b>CAUSA PRINCIPAL DE EXCLUSIÓN</b>	<b>Nº ARTÍCULOS</b>
Tratar sobre otros oncogenes y citar RET tangencialmente	1
No tratar sobre RET (las siglas tienen otra correspondencia)	1
<b>TOTAL ARTÍCULOS SOBRE RET EXCLUIDOS</b>	<b>2</b>

**Tabla 16: ARTÍCULOS SOBRE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES.**

<b>CAUSA PRINCIPAL DE EXCLUSIÓN</b>	<b>Nº ARTÍCULOS</b>
Tratar sobre alteraciones del genoma mitocondrial, pero no incluidas en la clasificación de enfermedades mitocondriales	59
No tratar sobre la especie humana	21
No contemplar el uso de DHPLC	21
Exponer hallazgo de nuevas mutaciones y/o sus implicaciones	2
Revisiones narrativas, cartas al director y artículos de opinión	1
<b>TOTAL ARTÍCULOS SOBRE ENF. MITOCONDRIALES EXCLUIDOS</b>	<b>104</b>

## Anexo 4. Limitaciones de los artículos según CASPe:

Artículo	Gen-patología	Limitación	Score CASPe
Weber et al, 2006 (17)	BRCA 2	No patrón de oro. No evaluación ciega.	7
Andrulis et al, 2002 (35)	BRCA 1 y BRCA 2	No evaluación ciega.	9
Sevilla et al, 2002 (37)	BRCA 1 y BRCA 2	No evaluación ciega.	9
Eng et al, 2001 (42)	BRCA 1	No patrón de oro.	9
Gross et al, 2000 (44)	BRCA 1 y BRCA 2	No evaluación ciega.	9
Wagner et al, 1999 (47)	BRCA 1 y BRCA 2	No se calculan las <i>likelihood ratios</i> .	9
Gross et al, 1999 (48)	BRCA 1	No evaluación ciega.	9
Arnold et al, 1999 (49)	BRCA 1	No evaluación ciega.	9
Sevilla et al, 2003 (34)	BRCA 1	No evaluación ciega.	9
Emmerson et al, 2003 (55)	APC	No evaluación ciega. No espectro adecuado de pacientes.	8
Mihalatos et al, 2003 (51)	APC	No evaluación ciega.	9
Wu et al, 2001 (58)	APC	No evaluación ciega. No patrón de oro.	7
Pazaitou et al, 2005 (59)	RET	No evaluación ciega.	9
Torrente et al, 2004 (60)	RET	No evaluación ciega. No patrón de oro.	7
Meierhofer et al, 2005 (66)	Enf Mitocondriales	No evaluación ciega. No define N° pacientes.	8
Biggin et al, 2005 (67)	Enf Mitocondriales	No evaluación ciega.	9
Liu et al, 2002 (74)	Enf Mitocondriales	No evaluación ciega.	9
van den Bosch et al, 2000 (76)	Enf Mitocondriales	No evaluación ciega. No espectro adecuado de pacientes.	8



9 788496 990012

Precio: 6 €



MINISTERIO  
DE SANIDAD  
Y CONSUMO

[www.msc.es](http://www.msc.es)