

# Diagnóstico molecular en genética médica

I. Vallcorba Gómez del Valle

Servicio de Genética Médica. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

En los últimos años los avances en el estudio del genoma humano y el desarrollo de las técnicas moleculares han posibilitado un mayor conocimiento de la relación entre genes y enfermedad, de forma que los análisis moleculares se han incorporado, como una herramienta fundamental, en el diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades.

El conjunto de técnicas moleculares<sup>1</sup> permite abordar los estudios desde diferentes puntos de vista dependiendo del estado de conocimiento del gen o genes implicados y de las propias técnicas empleadas. En este artículo se hará un breve repaso a algunas de las técnicas utilizadas en la actualidad, así como sus aplicaciones más relevantes.

## PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA) (fig. 1)

La técnica, descrita por Mullis en 1983, se ha convertido en el punto de partida de la mayoría de los estudios genéticos por ser un procedimiento asequible y rápido<sup>2</sup>.

Se trata de un método de síntesis enzimática *in vitro* de secuencias específicas de ADN. A partir de ADN genómico, mitocondrial o incluso ARN, se genera un número de copias de un fragmento de ADN concreto, suficiente para su estudio, que se analizan rutinariamente en geles de poliacrilamida o agarosa. La carga negativa de las moléculas de ADN hace que éstas migren hacia el polo positivo, a una distancia que depende de su tamaño y estructura, cuando son sometidas a un campo eléctrico<sup>3</sup>.

La forma de afrontar un estudio genético depende de si se conoce el gen implicado y si existen mutaciones concretas responsables de una enfermedad determinada.

### Análisis indirecto

Cuando no se conoce el gen implicado en una determinada enfermedad, se estudian marcadores ligados a ella, generalmente mini y microsatélites, que son polimorfismos (variaciones no patológicas) que existen en el ADN y que se heredan según las leyes de Mendel. Si el polimorfismo se encuentra en el mismo cromosoma que el gen en cuestión, se dice que están ligados y la distancia entre ellos se mide por la frecuencia con la que ocurre un sobrecruzamiento (recombinación) entre ambos durante la meiosis. Cuanto menor sea esta distancia, mayor es la probabilidad de que ambos rasgos (enfermedad y polimorfismo) se transmitan unidos en la descendencia. Así, estos estudios moleculares nos ayudarán en el consejo genético, aunque no conozcamos el gen causante de la enfermedad.

### Análisis directo

Cuando se conoce el gen implicado en la enfermedad, se estudia éste directamente, con diferentes aproximaciones dependiendo de que el ADN se estudie para detectar una mutación concreta o

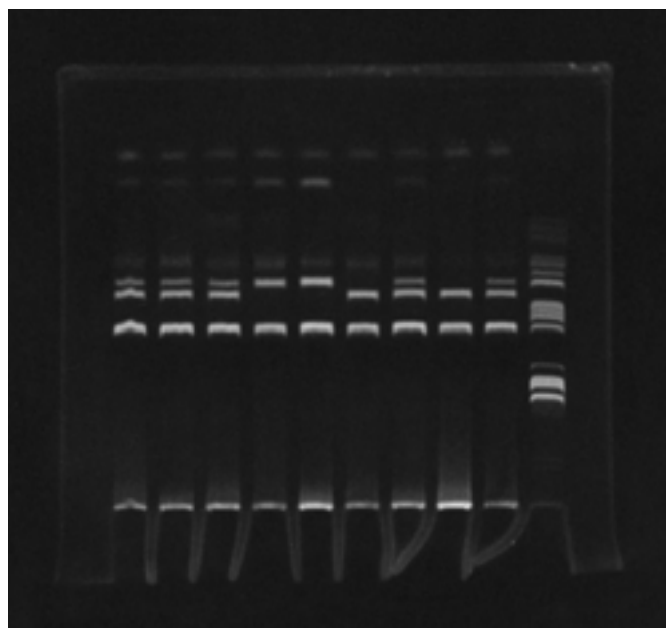


Figura 1 Estudio de la mutación C282Y del gen *HFE* (hemocromatosis) mediante amplificación por PCR y digestión enzimática.

bien que tengamos que rastrear el gen completo para intentar localizar cualquier variación en su secuencia.

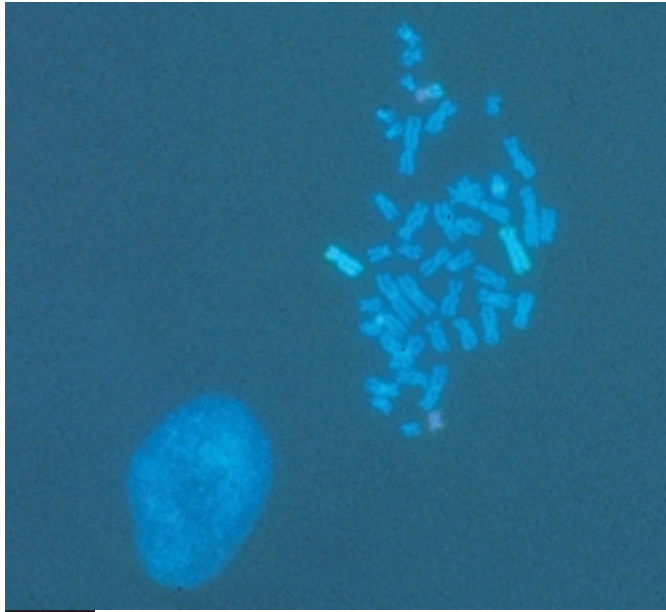
### Técnicas de rastreo de mutaciones

Son en general técnicas que ponen de manifiesto variaciones (mutaciones o polimorfismos) en la secuencia de uno o de los 2 alelos del gen, pero no nos permiten especificar en qué consiste ese cambio, ni en qué posición se encuentra. Se estudian genes enteros, amplificándolos mediante PCR, en pequeños fragmentos de 100-900 pares de bases. Los productos de PCR se someten posteriormente a un análisis electroforético en diferentes condiciones.

Las técnicas más utilizadas en el rastreo de mutaciones son: análisis de heterodúplex, polimorfismos de cadena sencilla (SSCP), electroforesis en geles de gradiente desnaturante (DGGE). Todas ellas se utilizan en la actualidad en el estudio de genes como *APC* (poliposis cólica familiar), *BRCA-1* (cáncer de mama), etc.

Recientemente se han desarrollado métodos de secuenciación no radiactivos de productos de PCR, que permiten su uso tanto en la confirmación y caracterización de las mutaciones detectadas previamente por métodos de rastreo como en el estudio directo de mutaciones.

Una aproximación diferente al rastreo de mutaciones es el llamado<sup>4</sup> test de la proteína truncada (PTT). En esta técnica analizamos el producto "artificial" (polipéptido) sintetizado a partir de un fragmento de ADN y de su estudio deducimos las posibles mutaciones. Este método también denominado "traducción *in vitro*" permite localizar las mutaciones que producen terminación prematu-



**Figura 2** Translocación t(4;19) caracterizada por hibridación *in situ* con sondas para los cromosomas 4 (verde) y 19 (rojo) en cultivo de líquido amniótico.

ra de la síntesis de proteínas. Para ello se llevará cabo una amplificación mediante PCR del fragmento de ADN o cADN que se desea estudiar. El producto de PCR resultante sirve de molde para la transcripción mediante una ARN polimerasa. El tránsito así obtenido se traduce a proteína en un sistema de traducción *in vitro* que presenta todos los componentes necesarios para llevar a cabo esa síntesis proteica. De esta forma se sintetiza una proteína cuyo tamaño y composición dependen de la secuencia amplificada mediante PCR. El posterior análisis del producto en geles de SDS-acrilamida nos permitirá determinar si en ese fragmento de ADN estudiado existe una mutación que interrumpa la traducción en algún punto y produzca una proteína truncada de menor tamaño que la esperada. Esta técnica de rastreo de mutaciones presenta algunas ventajas sobre otros métodos descritos, ya que permite el estudio de regiones relativamente largas en cada experimento, lo que es importante cuando se investiga un gen grande.

#### Técnicas de detección de mutaciones

Estas técnicas son más sencillas ya que persiguen la demostración de la presencia o ausencia de una mutación específica previamente descrita y no un rastreo de mutaciones en todo un gen. Se emplean en enfermedades donde la mayoría de la población afectada tiene una o varias mutaciones concretas: hemocromatosis (2 mutaciones), distrofia muscular de Duchenne (deleciones), linfomas (reordenamiento gen *bcl-2*), etc.

También se emplean para el diagnóstico clínico y presintomático en familias en las que el previo rastreo de mutaciones ha dado lugar a la caracterización de una mutación específica.

Se parte generalmente de un fragmento de ADN amplificado por PCR. Entre las más utilizadas se encuentran: presencia/ausencia de producto de PCR, tamaño del producto de amplificación, digestión con enzimas de restricción, amplificación específica de alelos.

#### HIBRIDACIÓN *IN SITU* (fig. 2)

Es una técnica que combina la citogenética clásica con métodos moleculares<sup>5</sup>. Su gran sensibilidad permite detectar y localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos en cromosomas, células y

tejidos preservados morfológicamente. La técnica utiliza fragmentos de ADN o ARN marcados (sondas), que hibridan específicamente con sus secuencias complementarias de ADN presentes en cromosomas, células interfásicas y mitocondrias o ARN citoplásmico, formando híbridos estables que luego pueden ser detectados.

Existen diferentes sondas diseñadas para multitud de aplicaciones en medicina.

Se utilizan para detectar *aneuploidías*, alteraciones del número cromosómico que son responsables de numerosos síndromes: Down (trisomía 21), Patau (trisomía 13), Turner (X0), etc. y pueden ser diagnosticados o confirmados por hibridación *in situ*. Las aneuploidías pueden detectarse en líquido amniótico sin cultivar, pudiéndose descartar las más frecuentes en pocas horas. Dado que las aneuploidías suponen las aberraciones cromosómicas más frecuentes en los nacidos vivos con algún defecto, la hibridación *in situ* puede proporcionar información rápida en el diagnóstico prenatal.

Las alteraciones en el número de cromosomas son también muy frecuentes en procesos malignos y se manifiestan en tumores sólidos y leucemia. Muchas de estas alteraciones están asociadas a tumores concretos (trisomía 12 en leucemia linfocítica crónica) que varían con la evolución de la enfermedad. La utilización de sondas que permiten contar cromosomas son, por tanto, de gran utilidad en el diagnóstico y seguimiento de numerosos tipos de cáncer diferentes.

También hay sondas que hibridan específicamente a lo largo de todo el cromosoma. Sólo se utilizan en células en metafase y permiten la identificación del par cromosómico que deseamos. Son de gran utilidad en el estudio de translocaciones e inserciones y se utilizan principalmente en la caracterización de cromosomas marcadores, tanto en genética del cáncer como en el diagnóstico prenatal.

Existen otras sondas –específicas de *locus*– que, aunque se pueden utilizar para contar cromosomas, están diseñadas para la *localización de secuencias génicas*. Se usan en el estudio de microdeleciones que no pueden detectarse por citogenética y que son responsables de diferentes síndromes como el del maullido de gato, el síndrome de Williams, etc. También son de gran utilidad en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermos de cáncer que presentan células con microdeleciones (5q en síndromes mielodisplásicos), reordenamientos (*bcr/abl* en la leucemia mieloide crónica) o amplificaciones génicas (*N-Myc* en el neuroblastoma).

En la actualidad se ha puesto a punto la tecnología necesaria para el análisis automático de imágenes, que permite la utilización simultánea de multitud de sondas marcadas con mezclas de fluorocromos que son percibidas como colores diferentes por el analizador, aunque no son distinguibles por el ojo humano. Esta tecnología permite hibridar todos los cromosomas simultáneamente, obteniéndose un cariotipo de 24 colores, o incluso obtener un patrón de bandas de colores asignando diferentes combinaciones de fluorocromos a sondas de regiones cromosómicas diferentes.

La hibridación *in situ* es una técnica de gran sensibilidad y especificidad, que mejora la capacidad de la citogenética clásica en la detección de alteraciones. Generalmente se utilizan conjuntamente, pero la hibridación *in situ* es insustituible en el estudio de alteraciones muy pequeñas, cuando los cultivos no crecen bien y no pueden obtenerse metafases para su estudio, o cuando el tiempo es el factor limitante del análisis.

#### MICROARRAYS (MICROCHIPS DE ADN)

El chip de ADN es hasta ahora la última de las técnicas que utilizan una de las características básicas de los ácidos nucleicos: la complementariedad de secuencia de las 2 cadenas<sup>6</sup>.

Los polinucleótidos a ensayar (sondas) se unen covalentemente a un soporte rígido (cristal) que posteriormente se hibridará con las muestras de ADN y se analizarán automáticamente.

Los microchips de ADN están empezando a utilizarse en múltiples aplicaciones:

#### *Análisis de expresión génica*

La mayoría de los estudios basados en esta tecnología son de monitorización de niveles de expresión de ARN. Estos estudios se pueden realizar con chips de polinucleótidos derivados del extremo 3' del transcrito de ARN. Esta matriz se hibrida entonces con el ADNc fluorescente (procedente del transcrito celular) que deseamos estudiar, determinándose así la cantidad de transcrito presente en la célula por la señal fluorescente generada.

#### *Genotipificación*

Permite el análisis de cientos de miles de *loci* en un elevado número de muestras de ADN al mismo tiempo, posibilitando los estu-

dios de asociación génica y el esclarecimiento de la contribución genética en enfermedades poligénicas complejas.

#### *Análisis de mutaciones*

Esta tecnología permite el estudio de todas las posibles variaciones en la secuencia de un fragmento de ADN. ■

#### **Bibliografía**

1. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, (2.ª ed.). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
2. Eisenstein B et al. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990; 322: 178-183.
3. Westermeier R. Electrophoresis in Practice. VCH, 1997.
4. Van der Lijft R, Meera Khan P, Vasen HFA et al. Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test. *Genomics* 1994; 20: 1-4.
5. Brahic M, Ozden S. In situ hybridization: a practical approach. DG Wilkinson, editor. Oxford: IRL Press, 1992.
6. The chipping forecast. *Nature Genet* 1999; 21 (Supl).