

# Técnicas diagnósticas mediante ADN

ENCARNA GUILLÉN<sup>a</sup> Y GUILLERMO GLOVER<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Genética Médica del Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El Palmar. Murcia.

<sup>b</sup>Unidad de Genética Molecular del Centro de Bioquímica y Genética. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El Palmar. Murcia. España.  
encarna.guillen@carm.es; guillermo.glover@carm.es

El desarrollo de las técnicas biológicas e informáticas de las últimas décadas ha propiciado la consecución del Proyecto Genoma Humano<sup>1,2</sup>, un esfuerzo científico internacional que ha culminado en un mapa genético de alta resolución y en un borrador de la secuencia de nucleótidos del genoma humano. Su aplicación más inmediata ha sido la identificación y caracterización de nuevos genes, lo que está permitiendo un avance espectacular en el conocimiento de las bases moleculares de las enfermedades genéticas y está mejorando la capacidad de diagnóstico molecular<sup>3,4</sup>. La ampliación progresiva del número de análisis genéticos disponibles para el diagnóstico hace imprescindible que el pediatra conozca sus fundamentos, indicaciones y limitaciones y sea capaz de interpretar sus resultados.

### Puntos clave

- Las enfermedades genéticas que se diagnostican mediante estudio del ADN son las enfermedades monogénicas, causadas por mutaciones en un solo gen y que siguen un patrón de herencia mendeliano.
- El estudio genético indirecto (o de ligamiento) se emplea cuando el gen se ha localizado pero no se ha caracterizado, cuando se ha caracterizado pero es grande y muestra gran dispersión de mutaciones o cuando más de un gen está implicado en la enfermedad.
- Las distintas técnicas empleadas en el estudio genético directo dependerán de las características del gen y del tipo de mutaciones. En la búsqueda de mutaciones puntuales se suele utilizar un método de cribado (SSCP, DGGE), etc. seguido de secuenciación.
- Las principales aplicaciones de las técnicas diagnósticas mediante ADN son la confirmación diagnóstica, el diagnóstico presintomático, el estudio de portadores, el diagnóstico prenatal y el diagnóstico preimplantacional.
- El estudio genético, en cualquiera de sus aplicaciones, precisa de consentimiento informado y de asesoramiento genético apropiado.

## Base molecular de las enfermedades monogénicas

Las técnicas diagnósticas moleculares se aplican fundamentalmente a las enfermedades monogénicas, causadas por mutaciones en genes del ADN nuclear y que siguen un patrón de herencia mendeliano (autosómico dominante, recesivo y ligado al sexo). Hay que diferenciar las enfermedades mitocondriales en las que pueden estar implicados genes del ADN mitocondrial<sup>5</sup> y cuya transmisión se realiza por vía materna exclusivamente.

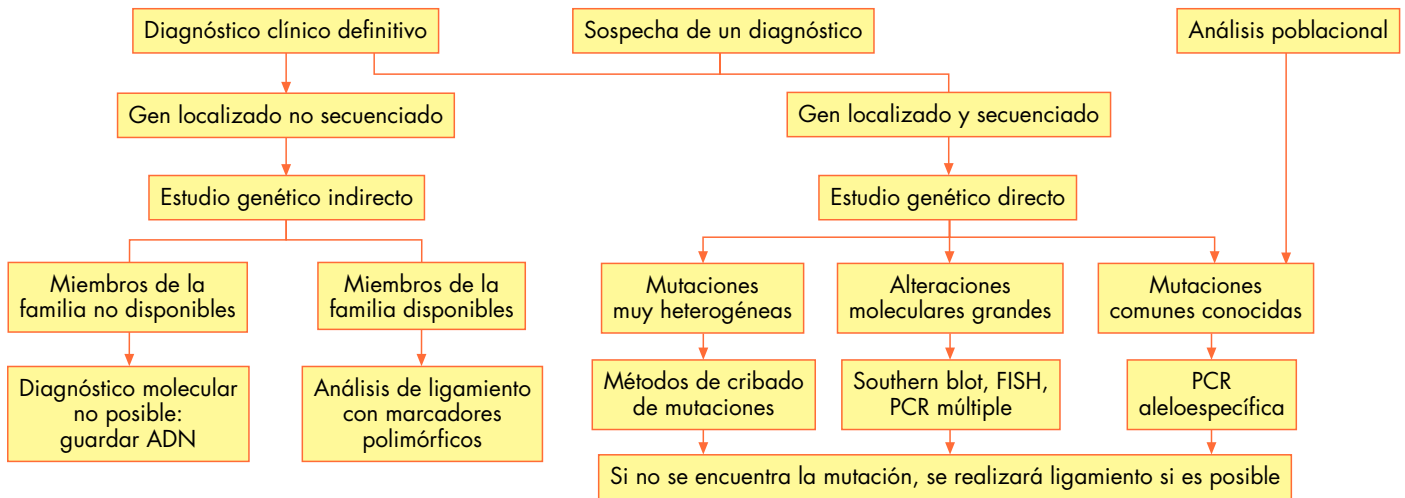
Se estima que existen de 30.000 a 40.000 genes en los 46 cromosomas que componen cada una de nuestras células<sup>1,2</sup>. Los genes son fragmentos de ADN<sup>6</sup>, con 2 copias alternativas o alelos, cuya secuencia de nucleótidos determina la secuencia de aminoácidos de la proteína. Aunque la mayoría de los cambios en la secuencia del ADN pueden no tener efecto fenotípico (polimorfismos), algunos otros alteran la función de la proteína (mutaciones) provocando distintas enfermedades<sup>7</sup>. La mayoría de las enfermedades monogénicas son el resultado de mutaciones puntuales (p. ej., fibrosis quística<sup>8</sup>), por delección, inserción o sustitución de un nucleótido por otro, y según su efecto se clasifican en *silenciosas* (no cambia el aminoácido), cambio de sentido o *missense* (cambia el aminoácido), sin sentido o *non-sense* (da lugar a un codón de parada y trunca la proteína) y de *splicing*, que afecta al procesamiento del ARN. Existen otros tipos de mutaciones patogénicas, como grandes delecciones (p. ej., distrofia muscular de Duchenne), inserciones (p. ej., hemofilia A) o expansión de tripletes (p. ej., síndrome de X frágil), que precisan diferentes técnicas moleculares para su diagnóstico<sup>9,10</sup>.

## Técnicas básicas de biología molecular

Existen técnicas comunes en todos los laboratorios de diagnóstico molecular.

### Hibridación de ácidos nucleicos

Las cadenas complementarias de ADN se separan aumentando la temperatura, rompiendo los enlaces químicos o disminuyendo la concentración salina (desnaturalización), y se



**Figura 1.** Estrategia en el diagnóstico molecular. PCR: reacción en cadena de la polimerasa; FISH: hibridación in situ fluorescente

vuelven a unir (renaturalización) modificando estos parámetros en sentido inverso. Se pueden identificar secuencias de ADN mediante la hibridación con sondas genómicas (fragmentos de ADN de secuencia complementaria marcados enzimática o radiactivamente), que se detectan por fluorescencia (hibridación *in situ* fluorescente [FISH]) o autorradiografía<sup>11</sup>.

### Amplificación enzimática del ADN (PCR)

Consiste en la obtención de millones de copias de una secuencia específica de ADN, con la ayuda de cebadores o *primers* (secuencias de nucleótidos complementarias a los extremos de la región que queremos amplificar) y de la enzima ADN polimerasa<sup>12</sup>. La RT-PCR (*reverse transcription PCR*) es una modificación, y consiste en la síntesis y posterior amplificación de ADN complementario a partir de ARNm con la enzima transcriptasa inversa. Se utiliza para detectar mutaciones que alteran el *splicing*.

Los productos resultantes de la PCR se separan por electroforesis, en gel de agarosa o poliacrilamida, y dan lugar a unas bandas con movilidad diferente según su tamaño y conformación. Del gel pueden transferirse a un papel de filtro para ser detectados mediante sondas específicas (Southern blot). Esta técnica es muy útil en defectos moleculares grandes.

### Estudio de marcadores genéticos: RFLP, micro y minisatélites

Cualquier marcador ligado al gen causal de una enfermedad puede utilizarse para seguir la transmisión del alelo mutado en una familia. Los RFLP, o polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, son fragmentos de ADN generados tras el corte con una enzima de restricción que reconoce una secuencia específica de nucleótidos diana. Un cambio puntual en una diana de restricción puede alterar el tamaño de los fragmentos resultantes. Otros polimorfismos son los microsatélites o STR (*short tandem repeats*), que son secuencias de 2 a 4 nucleótidos repetidos en un número variable de veces a lo largo del genoma<sup>13</sup>, y minisatélites o VNTR (*variable number of tandem repeats*), que son repeticiones de 11 a 60 nucleótidos. El número

de repeticiones varía de un individuo a otro, originando distintos alelos. Los diferentes alelos de los marcadores polimórficos en un segmento cromosómico o en un gen forman el haplotipo, que se hereda en bloque a través de generaciones.

## Estrategia para el diagnóstico mediante ADN

Depende del estado del conocimiento del gen y del tipo de mutaciones (fig. 1)<sup>14</sup>.

### Estudio genético indirecto o de ligamiento

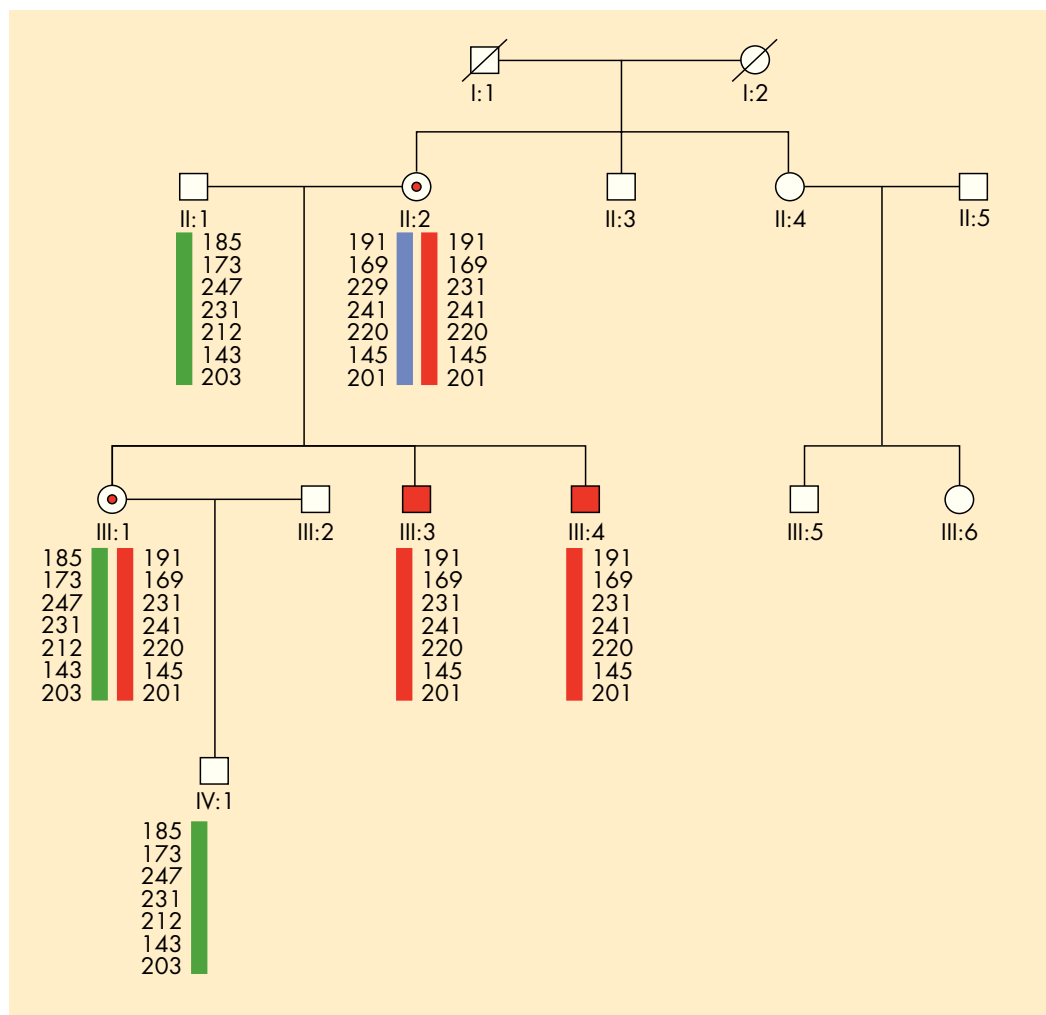
Identifica el haplotipo de riesgo asociado a la enfermedad en una determinada familia. No identifica las mutaciones de un gen. Se puede realizar cuando el gen se ha localizado, aunque no esté identificado ni secuenciado. También se emplea en genes perfectamente caracterizados cuando son muy grandes y con gran dispersión de mutaciones. Es necesario estudiar a toda la familia, incluyendo a individuos de diagnóstico conocido (sanos y afectados) de varias generaciones. Es muy útil en diagnóstico prenatal (fig. 2).

### Estudio genético directo

De elección siempre que sea posible. Identifica la mutación responsable de la enfermedad. Implica el conocimiento del gen y su secuencia. No precisa el estudio de familiares.

Existen diferentes técnicas para analizar un gen en busca de mutaciones<sup>15,16</sup>. La elección del método depende de las características del gen y del tipo de mutación. Para identificar reordenamientos tales como deleciones e inserciones moderadas-grandes, se utiliza PCR múltiple y electroforesis (fig. 3)<sup>17</sup>, FISH o Southern blot. En la búsqueda de mutaciones puntuales se suele utilizar diversas técnicas, tras PCR, como análisis de conformación de la cadena simple (SSCP), análisis de heterodúplex (HD), electroforesis en gradientes de geles desnaturalizantes (DGGE) o cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (DHPLC), que identifican el frag-

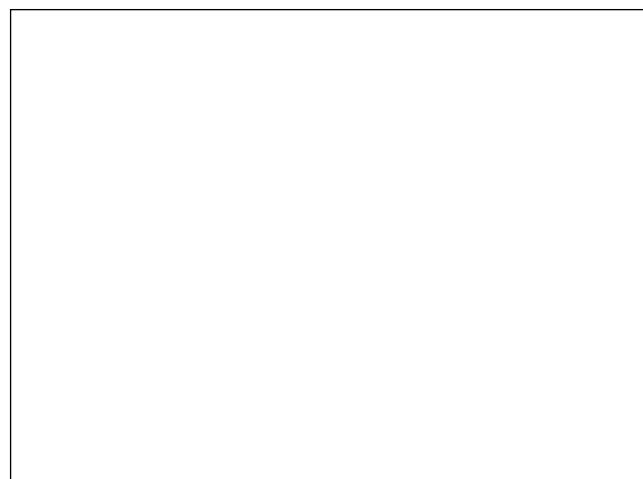
**Figura 2.** Estudio de ligamiento en la distrofia muscular de Duchenne. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis del número de repeticiones de 7 microsatélites próximos e internos al gen de la distrofina en cada individuo. A partir de la información clínica y genética se deduce que el haplotipo de riesgo asociado a la enfermedad es el que se representa por la barra de color rojo. La DMD es una enfermedad recesiva ligada a X; por tanto, las mujeres que presentan este haplotipo serán portadoras (II:2 y III:1) y los varones estarán afectados (III:3 y III:4). Esta información se puede utilizar para diagnóstico prenatal.



mento o exón que contiene la mutación, con una sensibilidad del 80-100%, dependiendo de la técnica. La secuenciación automática caracteriza la mutación al determinar el orden preciso de los nucleótidos. En genes de gran tamaño se puede estudiar sólo la región codificadora a partir del ARN con técnicas como el test de la proteína truncada (PTT). Las limitaciones del estudio genético directo son la heterogeneidad de locus o genética (2 o más genes implicados en la enfermedad [p. ej., poliquistosis renal autosómica dominante y sordera], que suele implicar un estudio de ligamiento previo para identificar el gen responsable) y alélica (un gran número de mutaciones diferentes en un gen provocan la enfermedad [p. ej., fibrosis quística]). Recientemente se ha comercializado un kit de detección rápida, mediante *oligonucleotide ligation assay* (OLA), de mutaciones más frecuentes en la fibrosis quística (fig. 4). Actualmente están en desarrollo *chips* de ADN para el análisis simultáneo de un gran número de genes y mutaciones.

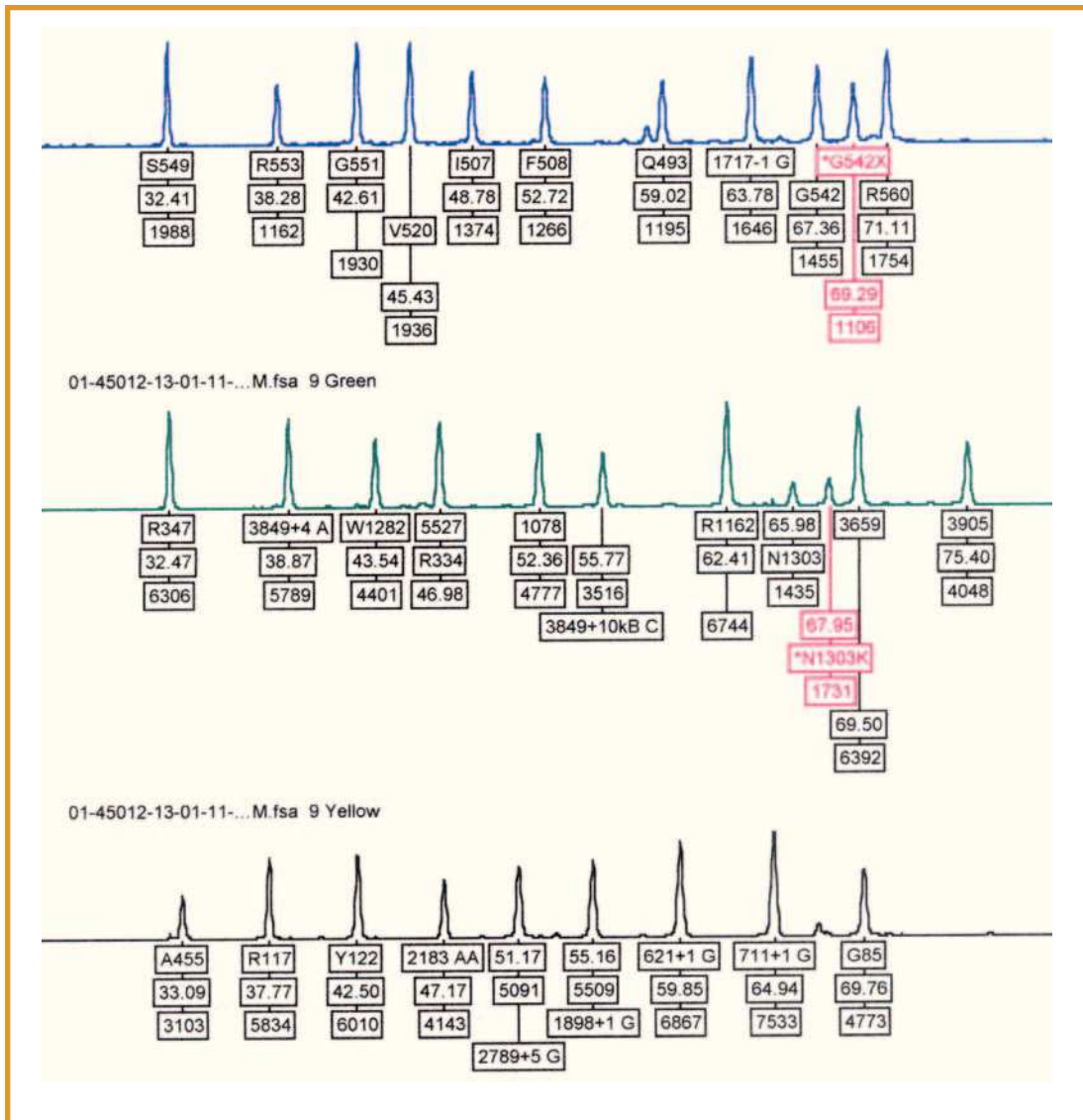
## Aplicaciones del diagnóstico molecular

Las principales aplicaciones de las técnicas diagnósticas mediante ADN son la confirmación diagnóstica, el diagnóstico presintomático, el estudio de portadores, el diagnóstico prenatal y el diagnóstico preimplantacional<sup>18</sup>. Cualquier tipo de diagnóstico molecular precisa de asesoramiento genético y



**Figura 3.** Estudio genético directo de distrofia muscular de Duchenne. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple de 8 exones y el promotor del gen de la distrofina en 6 individuos. El individuo 1 presenta delección de los exones 47-50; el individuo 2, delección del exón 47, y el individuo 5, delección del exón 43. Los individuos 3, 4 y 6 no muestran delecciones de los exones amplificados.

consentimiento informado del paciente o sus padres, si es un menor de edad. Los estudios presintomáticos en niños no se realizarán a menos que se puedan beneficiar de medidas preventivas o curativas inmediatas<sup>19-21</sup>.



**Figura 4.** Estudio genético directo de algunas mutaciones del gen CFTR de la fibrosis quística. Mediante oligonucleotide ligation assay (OLA) se detecta un heterocigoto compuesto G542X/N1303K (señalados en rojo) a través de los picos generados en un analizador ABI PRISM 310.

## Conclusión

El avance de la biología molecular está mejorando la capacidad diagnóstica en el área de la pediatría. El conocimiento de la estrategia del estudio genético de una enfermedad es relevante para el clínico a la hora de solicitarlo e interpretar su resultado. Algunas aplicaciones del diagnóstico molecular, como el diagnóstico presintomático y de portadores, pueden tener importantes implicaciones legales, éticas y sociales que el pediatra debe tener en cuenta. Por ello, siempre que sea posible es recomendable la consulta con un genetista clínico que establezca la idoneidad del estudio y, si procede, asesore y prepare a la familia antes y después de su realización. El futuro del diagnóstico genético viene marcado por el análisis de *single nucleotide polymorphisms* (SNP), base de la individualidad genética<sup>22</sup>, que abre nuevas posibilidades en el estudio de las enfermedades multifactoriales con el establecimiento de perfiles de riesgo en los individuos y predicción de la respuesta al tratamiento.

## Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-51.
3. ● Collins FS, McKusick VA. Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA* 2001;285:540-4.
4. Subramanian G, Adams MD, Venter JC, Broder S. Implications of the human genome for understanding human biology and medicine. *JAMA* 2001;286:2296-307.
5. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MH, Coulson AR, Drouin A, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:427-65.
6. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737.
7. ●● Antonarakis SE. Mutations in human diseases: nature and consequences. En: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, editors. *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1997; p. 53-66.
8. Lyon E, Miller C. Current challenges in cystic fibrosis screening. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1133-9.
9. Hofstra RM, Mulder IM, Vossen R. DGGE-based whole-gene mutation scanning of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 2004;23:57-66.



10. Hecimovic S, Barisic I, Muller A, Petkovic I, Baric I, Ligutic I, et al. Expand long PCR for fragile X mutation detection. *Clin Genet* 1997;52:147-54.
11. ●● Malcolm S. Molecular methodology. En: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, editors. *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1997; p. 67-86.
12. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51:263.
13. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996;380:152-4.
14. ●● Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. Genetics, biochemistry, and molecular bases of variant human phenotypes. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw Hill, 2001; p. 1-45.
15. Strachan T, Read AP. Genetic testing in individuals and population. En: Strachan T, Read AP, editors. *Human molecular genetics*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1996; p. 427-55.
16. Guillén Navarro E. Estudios moleculares en dismorfología. *An Esp Pediatr* 2001;54(Supl 4):105-12.
17. Begg AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990;86:45-8.
18. Strom CM, Levin R, Strom S, Masciangelo C, Kuliev A, Verlinsky Y. Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: the first 109 infants. *Pediatrics* 2000;106:650-65.
19. American Society of Human Genetics Board of Directors, American College of Medical Genetics Board of Directors. Point to consider: ethical, legal and psychosocial implications of genetic testing in children and adolescents. *Am J Hum Genet* 1995;57:1233-41.
20. ●● Committee on Genetics. American Academy of Pediatrics. Molecular genetic testing in pediatric practice. *Pediatrics* 2000;106:1494-7.
21. Ross LF, Moon MR. Ethical issues in genetic testing of children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000;154:873-87.
22. Ke X, Hunt S, Tapper W, Lawrence R, Stavrides G, Ghori J, et al. The impact of SNP density on fine-scale patterns of linkage disequilibrium. *Hum Mol Genet* 2004;13:577-88.

## Bibliografía recomendada

**Antonarakis SE. Mutations in human diseases: nature and consequences.** En: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, editors. *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1997; p. 53-66.

*Este capítulo expone los tipos de mutaciones en los genes humanos y sus consecuencias. Hace consideraciones muy interesantes acerca de la correlación genotipo-fenotipo.*

**Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. Genetics, biochemistry, and molecular bases of variant human phenotypes.** En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw Hill, 2001; p. 1-45.

*Importante revisión actualizada sobre las bases moleculares de las enfermedades, así como de las técnicas de estudio molecular disponibles para su estudio, ilustradas con ejemplos muy demostrativos.*

**Committee on Genetics. American Academy of Pediatrics. Molecular genetic testing in Pediatric Practice.** *Pediatrics* 2000;106:1494-7.

*Revisión sobre los estudios genéticos moleculares aplicados al estudio de enfermedades monogénicas y síndromes de microdelección. Reflexión acerca de las limitaciones de su uso en niños y adolescentes.*

**Malcolm S. Molecular methodology.** En: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, editors. *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1997; p. 67-86.

*Repasa las principales técnicas moleculares para el diagnóstico genético partiendo de las herramientas básicas.*