

II. Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias

Herminia G. Martínez-Rodríguez,* Salvador L. Said-Fernández**

Resumen

Las enfermedades hereditarias constituyen una carga importante para la población humana. Anteriormente su diagnóstico se basaba en la detección de los productos génicos alterados a través de pruebas enzimáticas o de proteínas. Las técnicas de DNA recombinante han facilitado mucho su diagnóstico haciendo posible la detección de portadores y el diagnóstico prenatal o a edades tempranas. Por mucho tiempo el diagnóstico de enfermedades hereditarias era solo confirmatorio y no representaba alternativas de tratamiento para las personas enfermas, eso está cambiando al poder manipularse las condiciones ambientales que puedan modificar la gravedad de los síntomas o retrasarlos para que se presenten a una edad más tardía, en los individuos que se han identificado que están en riesgo genético, con lo que puede mejorarse sensiblemente la calidad de vida de los pacientes.

Palabras clave: *clave: Biología molecular, enfermedades hereditarias, diagnóstico*

Summary

Inherited diseases constitute an important burden to mankind. Prior to the development of diagnosis based on DNA analysis, inherited disease diagnosis was based on detection of abnormal gene products by protein or enzymatic analysis. DNA recombinant techniques have made the diagnosis of the above-mentioned diseases easier and have been allowed the detecting of carriers and performing prenatal diagnosis. For decades, diagnosis of inherited diseases was only confirmatory and did not allow physicians to offer any treatment choice. Fortunately this situation is now changing. At present, there exists the opportunity of manipulating the environment of individuals identified as genetically at risk, to achieve that symptoms be attenuated or postponed, thus increasing the quality of the life of the patients.

Key words: *Inherited diseases, molecular biology, diagnosis*

* Investigadora invitada. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Eduardo Aguirre Pequeño y Francisco I. Madero. Col. Mitras Centro CP 64460, Monterrey N.L.

** Académico numerario. Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste

Instituto Mexicano del Seguro Social, 2 de Abril y San Luis Potosí. Col. Independencia CP 64720. Monterrey N.L.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra Herminia G. Martínez-Rodríguez Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León. Eduardo Aguirre Pequeño y Francisco I. Madero. Col. Mitras Centro. CP 64460

Introducción

Se consideran enfermedades hereditarias aquellas que tienen un origen genético y se transmiten de padres a hijos.

Aparte de los traumatismos, el término "no genético" puede ser un nombre mal empleado, porque es difícil concebir alguna enfermedad completamente como no genética.

Anteriormente, se pensaba que el mejor ejemplo de enfermedades que no tenían causas genéticas eran las enfermedades infecciosas ya que el agente causal era claramente exógeno al organismo enfermo. Este concepto está cambiando ya que se han logrado identificar genes que tienen mucho que ver con la resistencia o susceptibilidad de un huésped a un agente infeccioso.¹

Aunque muchas enfermedades genéticas son raras, la carga total de estas enfermedades en la población humana no es despreciable. Las alteraciones en genes únicos afectan del 0.5 al 1% de la población general y las alteraciones cromosómicas cuentan para casi la misma frecuencia de la enfermedad. Si a esto le adicionamos que muchos trastornos comunes que no son enteramente genéticos, tienen un componente de susceptibilidad genética importante como son: enfermedades cardíacas, diabetes, algunos de los cánceres más frecuentes y muchas enfermedades autoinmunes, el resultado es que los factores genéticos cuentan mucho más que el 5% del total de enfermedades que se presentan en las naciones desarrolladas. Es muy probable que este porcentaje se modifique cuando otras fuentes de morbilidad como contaminación ambiental o una dieta poco saludable, sean modificadas y/o controladas.²

Tipos de mutaciones más frecuentes y sus patrones de herencia

De acuerdo al número de genes dañados, las enfermedades hereditarias pueden ser: monogénicas o poligénicas. Las monogénicas se deben a alteraciones en un solo gen, tienen un patrón de herencia tipo mendeliano, se presentan con mayor frecuencia a edades tempranas (infancia y adolescencia), a la fecha hay descritas aproximadamente 4000 enfermedades de este tipo y para más de 600

de ellas, se han descrito mutaciones. Las poligénicas o multifactoriales tienen una interacción muy fuerte con factores ambientales, muestran un patrón de herencia no mendeliano, se presentan con mayor frecuencia a una edad madura y entre ellas están diabetes, enfermedad coronaria, hipertensión, algunas de las más importantes psicosis y muchas otras más.³

Las alteraciones génicas pueden deberse a mutaciones en punto, en las que hay alteración de un solo par de bases en el DNA, por ejemplo anemia de células falciformes y acondroplasia, o pueden deberse a delecciones o inserciones que pueden ser tan pequeñas como un par de bases o involucrar uno o varios exones o incluso todo el gen, ejemplos de ellas serían la neurofibromatosis, la distrofia muscular y la fibrosis quística. El fenotipo de enfermedad puede ser el resultado de pérdida o ganancia de función del producto génico.⁴

El análisis molecular de las enfermedades hereditarias

Antes de la tecnología del DNA recombinante, las enfermedades hereditarias se diagnosticaban detectando los productos afectados, por pruebas enzimáticas o de proteínas. Ahora, con las técnicas que se han desarrollado para el análisis molecular de las mutaciones, ni siquiera es necesario conocer el producto génico afectado. En principio todas las enfermedades genéticas pueden ser analizadas en términos moleculares y muchas de ellas podrán eventualmente ser tratables y/o curables a causa de descripciones moleculares precisas de los defectos subyacentes en el DNA y sus consecuencias metabólicas.²

Las técnicas de DNA dada su alta sensibilidad, tienen las siguientes ventajas: no se necesita hacer determinaciones de proteínas o enzimas ni cultivar células, no se requieren grandes cantidades de muestra, ni siquiera se requiere conocer el producto génico normal. Esto ha facilitado grandemente el diagnóstico prenatal, así como la detección de individuos portadores (es decir, que son sanos, pero portan un alelo mutado y por lo tanto pueden heredar la mutación a sus hijos). Estos son, sin duda, dos de los grandes beneficios que ha traído el diagnóstico molecular a la genética clínica.⁵

Se han desarrollado muchas técnicas para la detección de mutaciones, las que vamos a explicar a continuación, son solo algunos ejemplos de las que más se usan y es conveniente decir que para muchas enfermedades se usan varias de ellas. Algunas enfermedades se deben a un solo tipo de mutación y su detección es suficiente para hacer el diagnóstico. Sin embargo, muchas veces, puede haber mutaciones distribuidas a todo lo largo del gen, y pueden ser mutaciones puntuales, deleciones o inserciones, por lo que puede requerirse de la aplicación de varias de las técnicas aquí señaladas.

Prácticamente todas las técnicas requieren el aislamiento de DNA del paciente. Esto puede hacerse a partir de sangre o de una muestra de tejido, o de los amniocitos (células presentes en el líquido amniótico). Después de recuperar el DNA, éste puede digerirse con enzimas de restricción (endonucleasas que cortan el DNA en sitios específicos) y posteriormente analizar los fragmentos generados por electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida. En muchos casos el tamaño y/o el número de los fragmentos generados durante la digestión, puede poner de manifiesto la mutación de interés, pero en algunos otros, es necesario llevar a cabo hibridación de los fragmentos con una sonda que puede ser de DNA, RNA, o un oligonucleótido sintético, que reconozca específicamente a la secuencia de interés.

Dos técnicas que han resultado muy útiles en el diagnóstico de mutaciones son: Southern blot y Northern blot. Estas técnicas permiten la detección de fragmentos de DNA genómico o RNA mensajeros (RNAs) específicos en mezclas complejas. El Southern blot permite visualizar un solo fragmento específico en una mezcla que contenga millones de fragmentos. El tamaño del fragmento puede determinarse por su migración en el gel. Con Northern blot, una molécula específica de RNA mensajero puede detectarse en una mezcla de 10,000 o más RNA mensajeros derivados de una muestra de tejido. Con esta técnica, puede determinarse si el mensajero está presente en cantidades normales o alteradas y también si el tamaño corresponde a una molécula normal.

Ambas técnicas requieren el aislamiento del ácido nucleico (DNA o RNA), la separación de los fragmentos en gel, su transferencia a una membrana y su hibridación con una sonda ya sea con radioactividad o con métodos no isotópicos para detectar el fragmento.¹

Tanto el Southern como el Northern blot son pruebas muy valiosas pero tienen el inconveniente de requerir grandes cantidades de muestra y sondas marcadas. La reacción en cadena de la polimerasa, en cambio, permite que una muestra pequeña se amplifique hasta un millón de veces, por lo que la detección de la mutación, muchas veces no requiere de la utilización de radioactividad o de marcaje no isotópico y la cantidad de muestra que se requiere se reduce considerablemente.

Otra área de la tecnología de la genética molecular muy importante para la identificación de genes de enfermedades humanas, ha sido el análisis de secuencias comunes de DNA o polimorfismos. Estos permiten seguir a los genes en las familias en las que se presenta la enfermedad, lo cual de otra manera sería imposible. Las diferencias en secuencias destruyen o crean sitios de reconocimiento para enzimas de restricción y por consecuencia pueden ser detectados por Southern blot o PCR.

Para algunas enfermedades, como la distrofia muscular, las mutaciones descritas son muchas y están distribuidas a lo largo de todo el gen. La distrofia muscular se debe a una anomalía en el gen estructural de la distrofina; este gen está localizado en el cromosoma X, es muy grande (2 300 kb) y tiene 79 exones. Para detectar mutaciones en él, se han desarrollado ensayos de PCR múltiple en el que en un solo tubo se amplifican varios exones a la vez utilizando los juegos adecuados de oligonucleótidos.¹

Otra técnica que permite la detección de mutaciones, utiliza las sondas denominadas ASO (oligoalelo específicas). Estas son normalmente de 15-19 pb de largo y mediante experimentos de hibridación que se realizan en condiciones muy estrictas, se aparean específicamente solo con las secuencias perfectamente complementarias. Con un solo nucleótido que no sea complementario, no hay hibridación. Las sondas ASO están marcadas para su detección. Esta técnica requiere que se conozca perfectamente el sitio de la mutación así como de la inclusión de los controles adecuados para asegurar que solo hibridan con la mutación.

Aunque la secuenciación es la técnica que detecta los cambios de mutaciones de manera precisa, ésta técnica no se usa de rutina para el análisis de mutaciones porque es cara y todavía no se dispone de la tecnología que permita secuenciar rápidamente un gran número de muestras.⁶

Para los casos en que la mutación precisa se desconoce, se han desarrollado técnicas que permiten analizar grandes segmentos de genes para buscar posibles diferencias. Entre ellas está el análisis de heteroduplex (HA) y los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP).

En HA, las cadenas normales y las mutadas se desnaturalizan para que formen cadena sencilla y luego se corren en geles de gradiente desnaturalizante. Cuando una cadena normal se asocia con una mutante, se forma un heteroduplex que migra de manera diferente que las homoduplex.

Los SSCP se forman cuando cadenas sencillas normales y mutantes se separan por electroforesis no desnaturalizante, aquí se favorece que las cadenas sencillas se plieguen sobre si mismas formando una estructura tridimensional que es diferente, aunque haya solo una base de diferencia.⁶

Tradicionalmente, los genes humanos se han considerado entidades estables con secuencias idénticas que se transmiten a generaciones sucesivas. Las variaciones a esta regla son raras pero recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo que ha representado un reto para las creencias tradicionales. Se trata de las "mutaciones dinámicas" o repeticiones inestables de tripletes⁷. Entre las enfermedades que presentan estas mutaciones tenemos el síndrome de X frágil que es la forma más común de retraso mental heredado, la distrofia miotónica y la enfermedad de Huntington que es una enfermedad neurodegenerativa, progresiva que se presenta en 1 en 10,000 individuos. Se hereda de manera autosómica dominante con una penetrancia completa y edad de manifestación variable, con una media de 40 años. Estas mutaciones pueden ser diagnosticadas por la reacción de amplificación de la polimerasa y utilizando una sonda oligonucleotídica que hibride con los fragmentos amplificados.¹

Aunque muy brevemente, hemos revisado aquí algunas de las principales técnicas (obviamente no todas) empleadas para el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias.

Beneficios y perspectivas con el diagnóstico molecular de las enfermedades hereditarias

Es pertinente comentar en este momento la importancia de que los genetistas clínicos conozcan cuando menos las generalidades de estas

técnicas, para no esperar de ellas más de lo que pueden dar, pero tampoco para que por desconocimiento de las mismas, no las empleen y se pierdan ellos mismos y sus pacientes, de las grandes ventajas que representan para la medicina moderna, el uso de estas técnicas para el diagnóstico de enfermedades.

Por mucho tiempo, el diagnóstico de enfermedades hereditarias fue solo confirmatorio y no representaba alternativas de tratamiento para las personas enfermas. Afortunadamente las cosas están cambiando y esto es muy notable para el asesoramiento genético en el diagnóstico prenatal y el de portadores.

Uno de los beneficios más importantes de la identificación de factores genéticos en la susceptibilidad a enfermedades, puede ser no el potencial de terapia génica, como pudiera pensarse, sino la oportunidad para el tratamiento y prevención de la enfermedad clínica manipulando el ambiente de individuos genéticamente en riesgo¹, lo cual puede retrasar la presentación de los síntomas o cuando menos moderarlos, para que el paciente tenga una mejor calidad de vida. Esto es particularmente aplicable a las enfermedades multifactoriales como las que se deben a repeticiones inestables de tripletes y a los síndromes de cáncer familiar⁸. Sin embargo también debe mencionarse la controversia que existe cuando la detección de una mutación se realiza en un individuo asintomático en el que la enfermedad detectada no puede ser tratada o prevenida o en los posibles casos en los que de saberse que un individuo es portador de una mutación pudiera ser causa de una discriminación social o laboral.⁹

Referencias

1. **Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D.** Principles of medical genetics. 2da. ed. Ed William and Wilkins, 1998.
2. **McConkey EH,** Human genetics: the molecular revolution. Jones and Bartlett Publishers Inc. Boston, 1993.
3. **Oliva VR.** Genoma humano. Masson S.A. Barcelona, España, 1996.
4. **Speer MC.** Basic concepts in genetics in haines J.L., Pericak-Vanve M.A. Approaches to gene mapping in complex human diseases. John Wiley & Sons, Inc. New York 1998.
5. **Watson JD, Gilman M, Witkouski J, Zoller M.** Recombinant DNA. 2da Ed. Scientific American Books;1998.
6. **Coleman WB, Tsongalis GJ.** Molecular diagnosis for the clinical laboratorian. Humana Press. New Jersey, 1997.
7. **Sutherland GR, Richard RI.** Dynamic mutations on the move. J. Med Genet, 1993;30: 978-981.

8. **Murigia AR, Polli M, Martella C, Vinanzi G, Opocher G.** Molecular diagnosis of inherited diseases. Clinica et Chemical Acta, 1999; 280: 73-80.
9. **Motulsky AG.** If I had a gene test, what would have and who would I tell?. Lancet, 1999: 35-37 (suppl 1).