

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE NIÑOS CON RASGOS DISMÓRFICOS Y/O RETRASO EN EL DESARROLLO

Dra. Raquel Sáez. Laboratorio de Genética. Hospital Donostia

CONCEPTOS BÁSICOS

La genética maneja hoy conceptos relativos a la herencia que se deben a las investigaciones realizadas por Gregor Mendel. Sin embargo, en el desarrollo de los principios básicos de la ley de la herencia han contribuido otros muchos científicos que generalizaron y ampliaron los planteamientos mendelianos a un gran número de organismos vivos.

La genética actual, a partir del trabajo de Mendel, ha desarrollado algunos conceptos que son clave para entender los mecanismos de la herencia:

- **Fenotipo:** Es la apariencia de un organismo, todo lo que podemos observar y que es la expresión de la información genética. Por ejemplo, el color de cabello, de la piel, de los ojos.
- **Alelos:** Son segmentos específicos del DNA que determinan una característica hereditaria. En los estudios de Mendel los factores "A" y "a" son alelos por que ambos codifican para la misma característica (tamaño en la planta), aunque con expresiones distintas. Además, cada gen se ubica en un cromosoma de par homólogo, y han de estar a la misma altura, en un lugar en que se conoce, locus.
- **Genotipo:** Es la constitución genética de un ser vivo que determina su fenotipo. Cuando un organismo tiene genes alelos iguales, se dice que el genotipo es homocigoto. Existen dos tipos de homocigotos: dominantes y recesivos. El primero tiene sólo genes alelos dominantes (AA); el segundo lleva sólo genes alelos recesivos (aa). Cuando el individuo porta genes alelos distintos (Aa), se dice que su genotipo es heterocigoto.

La información en las células reside en el genoma. Los genes eucariotas están formados por regiones codificantes o exones y regiones no codificantes o intrones. Durante la expresión génica, lo primero que ocurre es el proceso de transcripción, por el cual se realiza una copia de RNA del gen de interés de forma íntegra. Esta copia, que incluye exones e intrones del gen, se conoce como RNA inmaduro que va a sufrir un proceso de "splicing" por medio del cual los intrones son eliminados, generando una molécula madura que incluye únicamente los exones (RNA maduro). Este RNA contiene la información que codifica la proteína. Tras el proceso de maduración el RNA es utilizado por los ribosomas como molde para su traducción en proteínas.

CÓDIGO GENÉTICO

El código genético es el conjunto de reglas usadas para traducir la secuencia de nucleótidos del ARNm a secuencia de proteína en el proceso de traducción. Se descubrió en el año 1961 por Crick, Brenner y colaboradores.

El código genético en el RNA mensajero se lee en grupos de tres nucleótidos o tripletes, y cada grupo representa un aminoácido. Cada secuencia de tres nucleótidos se denomina codón. La lectura comienza en un codón de inicio (AUG), el cual marca la pauta de lectura, continúa en los siguientes trinucleótidos y termina en un codón de parada (UGA, UAA o UAG).

Características del código genético:

- La correspondencia entre nucleótidos y aminoácidos se hace mediante codones. Cada codón codifica un aminoácido concreto.
- El código genético es degenerado: un mismo aminoácido es codificado por varios codones, salvo triptófano y metionina que están codificados por un único codón. Existen 64 codones diferentes para codificar 20 aminoácidos lo que obliga a un cierto grado de degeneración en el código. Los codones que codifican un mismo aminoácido en muchos casos comparten los dos primeros nucleótidos con lo que se minimiza el efecto de las mutaciones. En estos casos una mutación en la tercera posición del codón no cambia el aminoácido codificado denominándose mutación silenciosa.
- El codón AUG que codifica la metionina es el codón de inicio y hay tres codones que establecen la señal de terminación de la traducción (UAA, UAG, UGA). Las mutaciones que ocurren en estos codones dan lugar a la síntesis de proteínas anómalas.
- Es un código sin solapamiento.
- Es universal. Está conservado en la mayoría de los organismos.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Mediante distintas técnicas podemos purificar, con relativa facilidad, el DNA o RNA de diversas muestras biológicas.

Los métodos de amplificación y detección de ácidos nucleicos son útiles para el diagnóstico y manejo de una variedad de enfermedades. De estas metodologías la más ampliamente utilizada en el campo de la genética molecular es **la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**; la PCR amplifica cantidades diminutas de ácidos nucleicos y genera millones de copias idénticas de la secuencia del ADN o ARN en cuestión de horas. Esto le permite tener una alta sensibilidad (entre un 90%-100%) y una gran especificidad (más del 95%).

La correcta expresión de un gen puede verse afectada por modificaciones locales (mutaciones o polimorfismos) en la secuencia del DNA del mismo.

Entre las técnicas empleadas para la detección de mutaciones nos encontramos con técnicas de cribado, que las utilizaremos cuando tenemos que analizar genes muy grandes (SSCP, DGGE, DHPLC...) y técnicas directas, que nos ayudarán a definir la mutación concreta que está ocasionando la enfermedad. Entre las técnicas directas podemos destacar: RFLP (el cambio puntual generado por la mutación a estudio debe generar o destruir una diana de reconocimiento de una enzima de restricción específica), PCR tiempo real (método capaz de cuantificar el DNA de cada ciclo en forma de fluorescencia), hibridación en fase sólida (oligonucleótidos complementarios a mutaciones sobre un soporte tipo papel, vidrio...) y secuenciación.

A la hora de detectar mutaciones en un estudio de diagnóstico molecular, la técnica de referencia es la **secuenciación** que consiste en determinar el orden exacto de los nucleótidos (bases C, A, G y T) a lo largo de un segmento de DNA. De esta secuencia se deduce la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. El DNA que se va a secuenciar se desnaturaliza y se mezcla con un cebador (complementario a un sitio en una de las hebras), polimerasa de DNA y los cuatro nucleótidos (dNTPs). También se añaden pequeñas cantidades de los cuatro terminadores de la síntesis (ddNTPs) marcados cada uno con un fluoróforo distinto. Cada vez que uno de ellos se incorpora previene la incorporación de otros nucleótidos a la cadena. De esta manera se genera un conjunto de fragmentos de DNA marcados con fluorescencia que difieren en tamaño solo en un nucleótido. Los fragmentos se separan mediante electroforesis en un capilar de un analizador automático. Cuando los fragmentos van migrando por el capilar pasan por un rayo láser que los estimula. Un detector de fluorescencia graba el orden del color de las bandas que luego se traduce en la secuencia. Finalmente la secuencia de los fragmentos del gen se compara con la secuencia normal para determinar la presencia de mutaciones.

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES

Existen diversos programas informáticos que, mediante estudios comparativos de las secuencias, permiten predecir si un cambio de aminoácido por otro afecta a la función de la proteína y, por tanto, si es potencialmente patogénico.

Podemos diferenciar distintos tipos de mutaciones según sus efectos sobre los diferentes pasos que conforman la expresión génica. Cuando el cambio ocurre en la región codificante del gen, podemos hablar, de forma general, de tres tipos de mutaciones: silentes, nonsense y missense.

. Las **mutaciones silentes** son aquellas donde, a pesar de que ocurra un cambio de un nucleótido por otro, el cambio no supone una alteración en el mensaje codificado por el RNA mensajero, de forma que la secuencia final de la proteína no se ve alterada.

. Por otro lado, cuando ese cambio nucleotídico sí afecta al mensaje codificado por la molécula de RNA haciendo que se sustituya un aminoácido por otro en la cadena polipeptídica, estamos ante una **mutación missense**. Este tipo de mutaciones puede afectar gravemente a la conformación de la proteína resultante y, por consiguiente, a su actividad o función.

. Las **mutaciones nonsense** son aquellas en las que el cambio introducido hace que en el mRNA aparezca una señal de parada prematura de la síntesis proteica, generando de este modo una proteína truncada, más corta que la normal y carente de regiones que pudiesen ser importantes para su función o localización.

Existen otro tipo de mutaciones que pueden afectar de forma más severa a un gen, y en las que el cambio no es puntual sino que implica a regiones mayores del mismo. Es el caso de las deleciones (donde una región del gen se elimina completamente), inserciones (donde ocurre la incorporación de fragmentos de DNA dentro del mismo gen) y duplicaciones (cuando una región del gen se incluye varias veces seguidas en la región del mismo, afectando a su estructura normal). Finalmente, hay otro tipo de mutaciones cuyo efecto se traduce en un incorrecto procesamiento del RNA mensajero, de forma que la reacción de splicing no sucede tal cual debería, pudiendo tener efectos drásticos en la proteína resultante. Estas mutaciones pueden conllevar la pérdida completa de secuencias exónicas en el RNA mensajero o pueden eliminar indirectamente uno o más exones de la molécula resultante.

Por último, apuntar que la Genética Médica tiene implicaciones tanto para el paciente como para sus familiares ya que nos puede ayudar a confirmar un diagnóstico clínico, en otras ocasiones nos facilitará la elección del tratamiento adecuado y además, podremos realizar un consejo genético en base a los resultados.