

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Métodos moleculares de detección de mutaciones en dermatología

Pablo de Unamuno^a, R. González Sarmiento^b y S. Mallo^a

^aServicio de Dermatología. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca.

^bUnidad de Medicina Molecular. Departamento de Medicina. Universidad de Salamanca. Salamanca. España.

La secuenciación del genoma humano conseguida en los últimos años y el desarrollo de técnicas de biología molecular de alta sensibilidad nos permiten conocer las alteraciones moleculares no solamente de las enfermedades hereditarias sino también de las alteraciones que subyacen en el cáncer, las enfermedades autoinmunitarias, etc.

Se sabe que el genoma humano es una secuencia de 3.000 millones de nucleótidos (adenina, citosina, guanina y timina) que contiene alrededor de 40.000 genes. Las variaciones en esta secuencia pueden ser de dos tipos: *a)* mutación, la mayoría de ellas responsables de algún tipo de enfermedad, y *b)* polimorfismo, que también es el resultado de una mutación pero representa las diferencias genotípicas de unos individuos a otros.

Los avances de la medicina, la biología y la tecnología han puesto en nuestras manos una serie de métodos diagnósticos muy importantes para el clínico, como son las técnicas de genética molecular.

Las técnicas de genética molecular que se aplican para el diagnóstico dermatológico son las mismas que para cualquier otro campo de la medicina y se dividen en 2 grupos: *a)* las que se utilizan para la identificación de mutaciones ya conocidas, como en el estudio de familiares de un paciente del que conocemos la mutación y su localización; el estudio de mutaciones muy frecuentes y que se encuentran en un porcentaje elevado de pacientes con el proceso problema, o el análisis de polimorfismos en la población, y *b)* un segundo grupo de técnicas que se utilizan para el estudio de mutaciones desconocidas, es decir, cuando no se conoce cuál es la alteración molecular y en qué parte del gen se encuentra.

Antes de pasar a describir las diferentes técnicas describiremos 3 básicas en biología molecular, como son la digestión del ADN mediante enzimas de restricción, que sirve para fragmentar el ADN y facilitar su estudio; la téc-

Correspondencia: Dr. P. de Unamuno.
Servicio de Dermatología. Hospital Universitario de Salamanca.
P.º de San Vicente, 58-132. 37007 Salamanca. España.

nica de Southern blot, que sirve para analizar fragmentos grandes de ADN que contiene un gen o parte de él y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación de secuencias de ADN.

DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas de restricción (o enzimas de restricción) son enzimas obtenidas de diversas bacterias (el nombre alude a su origen, HpaI de *Haemophilus parainfluenzae*; EcoRI, de *Escherichia coli*; HindIII, de *Haemophilus influenzae*; PstI, de *Providencia stuartii*, etc.), que cortan las cadenas biconexas complementarias cuando encuentran una secuencia concreta. Las secuencias que cortan son palindrómicas, es decir, que se leen de forma idéntica de izquierda a derecha (3'...5') como de derecha a izquierda (5'...3'). La enzima de restricción corta la cadena de ADN al encontrar la secuencia específica y así se originan fragmentos de diferentes tamaños en función de la separación de las secuencias reconocidas por la endonucleasa. Los fragmentos de diferentes tamaños se someten a la electroforesis y emigran en el gel de agarosa en función del tamaño. Comparando los carriles de los casos problema y del control sabremos si las enzimas de restricción han cortado el ADN por el lugar esperado.

SOUTHERN BLOT

Sirve para analizar fragmentos grandes de ADN que contienen un gen o parte de él. El ADN germinal que se quiere estudiar es sometido a la digestión por enzimas de restricción que cortan la cadena de ADN cuando encuentran secuencias conocidas de nucleótidos. Una vez fragmentado, el ADN es separado mediante electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de menor tamaño emigran más deprisa en el gel y los de mayor tamaño lo hacen más lentamente. Así se produce la separación de los diferentes fragmentos obtenidos después de la digestión de las enzimas de restricción. Dado que el resultado de la electroforesis no es visible, se somete a la hibridación con una sonda marcada y conocida, complementaria a la secuencia que se quiere analizar, y la sonda se pega donde encuentra ADN complementario. En el caso de una pérdida completa de ADN, no se producirá la hibridación en la zona de agarosa donde debería estar el fragmento y, en el caso de pérdidas parciales, aparecerá por encima o por debajo de la zona en función del tamaño del fragmento que haya quedado (fig. 1).

Esta técnica es útil para detectar pérdidas o inserciones moderadas, aunque también para mutaciones ocasionales, siempre y cuando éstas se localicen en la zona de corte de las enzimas de restricción.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR sirve para amplificar secuencias pequeñas de ADN, lo que facilita su estudio posterior. Para la realización de la técnica de PCR es necesario disponer de los cebadores o *primers* (secuencias de 20-30 nucleótidos) que reconocen cada uno de los extremos de la cadena biconexa que se pretende amplificar.

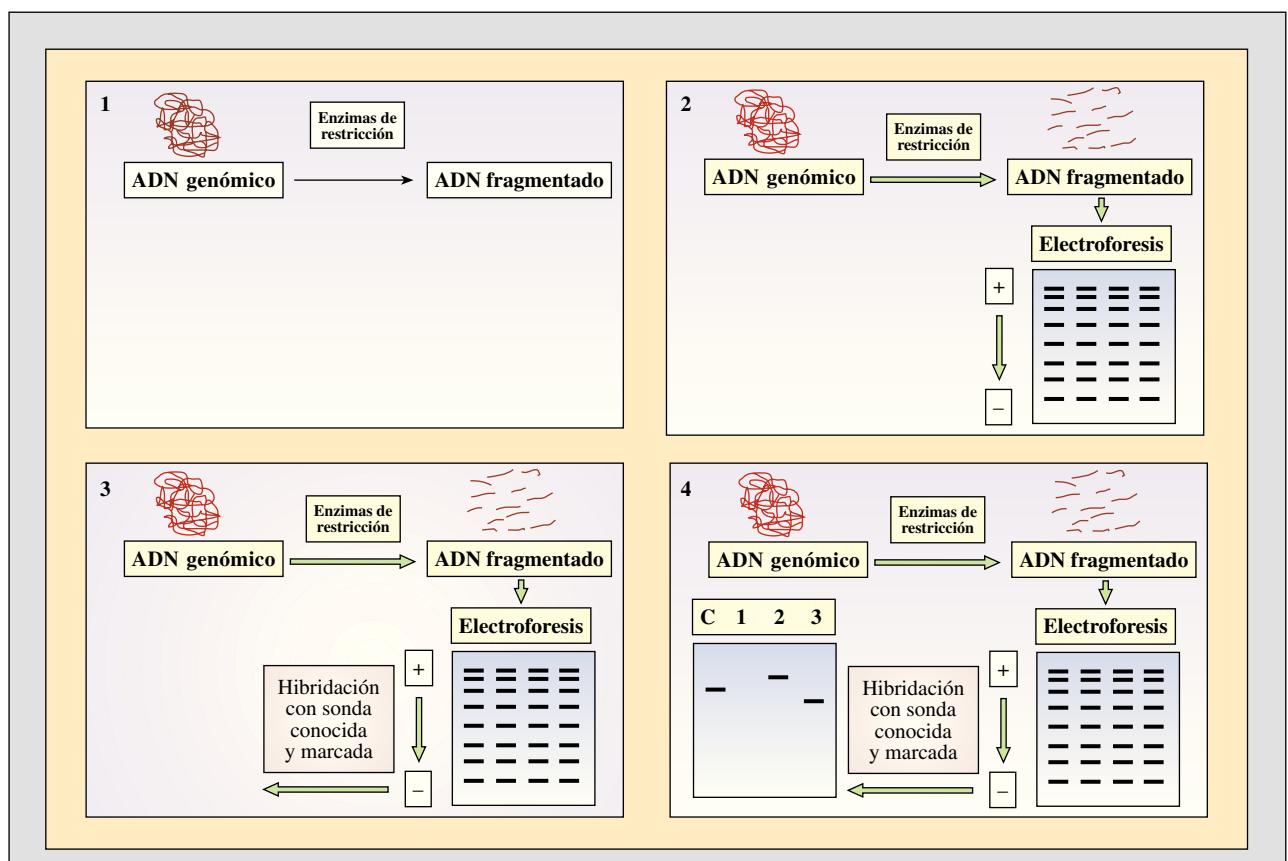


Figura 1. Southern blot. 1. El ADN es fragmentado con las endonucleasas de restricción. 2. Los fragmentos de ADN se desplazan en el gel de agarosa en función de su tamaño. 3. El gel de agarosa con los fragmentos dispersos es incubado con la sonda conocida. 4. Solamente en los fragmentos que hay hibridación se verá la sombra en la autorradiografía.

108

La PCR consta de las siguientes etapas: *a*) desnaturación de una cadena bicatenaria de ADN separando las 2 hebras complementarias; *b*) las cadenas separadas se unen a los cebadores, que en presencia de ADN-polimerasa hace que se unan nuevos nucléótidos, que se facilitan en el proceso hasta constituir la cadena completa de ADN (elongación), con lo que se obtienen 2 cadenas bicatenarias al finalizar el primer ciclo; *c*) repetición de este proceso hasta 20 o 30 veces, con lo que se consiguen millones de copias de ADN por multiplicación geométrica (20 ciclos, $2^{20} = 1.048.576$, y 30 ciclos, $2^{30} = 1.073.741.824$) (fig. 2).

Evidentemente, si hay una pérdida amplia en el ADN en estudio, éste no se amplifica, pero sí ocurrirá ante pequeñas pérdidas, mutaciones o inserciones del ADN. Los fragmentos de ADN amplificados han de estudiarse mediante alguna de las técnicas que se describen a continuación.

TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE MUTACIONES CONOCIDAS

Digestión con endonucleasas de restricción tras PCR

Ya se ha explicado anteriormente la acción de las endonucleasas de restricción y a continuación se presenta su aplicación para la búsqueda de mutaciones conocidas.

La pérdida de un fragmento de ADN que contenga la secuencia específica que reconoce la enzima de restricción o la modificación de dicha secuencia, por pérdida o mutación de alguna base, impide el corte del ADN por parte de la endonucleasa, lo que originará un fragmento de ADN de distinto tamaño al esperado. Por el contrario, la mutación de un nucleótido puede dar lugar a una nueva secuencia, que es reconocida por una endonucleasa de restricción, por lo que se cortaría la cadena, lo que no ocurriría en la situación normal. Esta posibilidad también hay que valorarla ante unos resultados discordantes.

En la figura 3 se esquematiza este método, tomando como ejemplo la digestión mediante la enzima EcoRI, que reconoce la secuencia GAATTC.

Dot blot

La técnica Dot blot se basa en que un oligonucleótido (cadena corta de nucleótidos), que sirve de sonda, hibrida con una cadena problema siempre que todas sus bases sean complementarias. El ADN de los individuos problema y de los controles se deposita, por separado, en una membrana y se somete, cada uno de ellos, a la hibridación con 2 sondas: una con la secuencia normal y otra con la mutada. Los individuos homocigotos normales hibridan con la sonda que contiene el alelo normal. Los homocigotos enfermos o mutantes hibridan con la

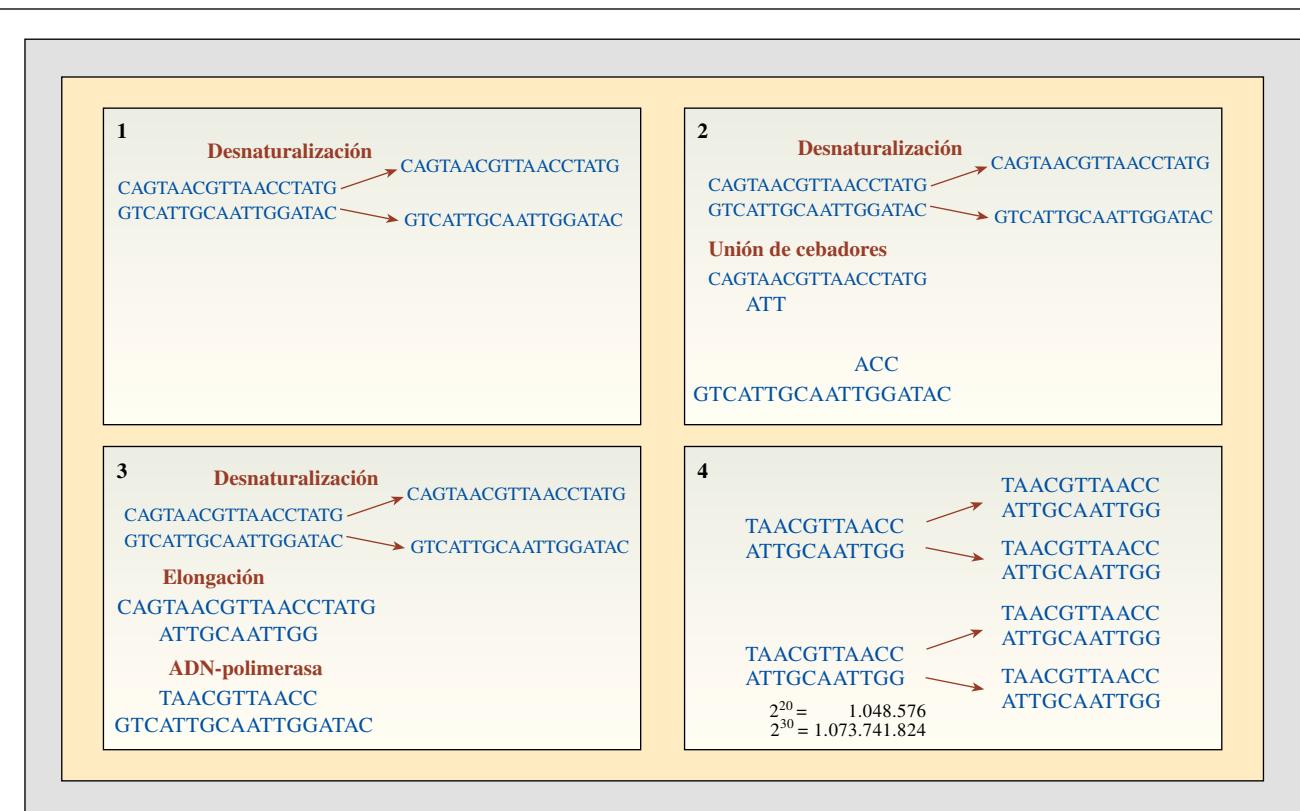


Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 1. Desnaturalización de las cadenas de ADN mediante calor. 2. Unión de los cebadores a la cadena que se quiere amplificar. 3. Elongación de la cadena de ADN-polimerasa. 4. Repetición de los ciclos para obtener millones de copias.

109

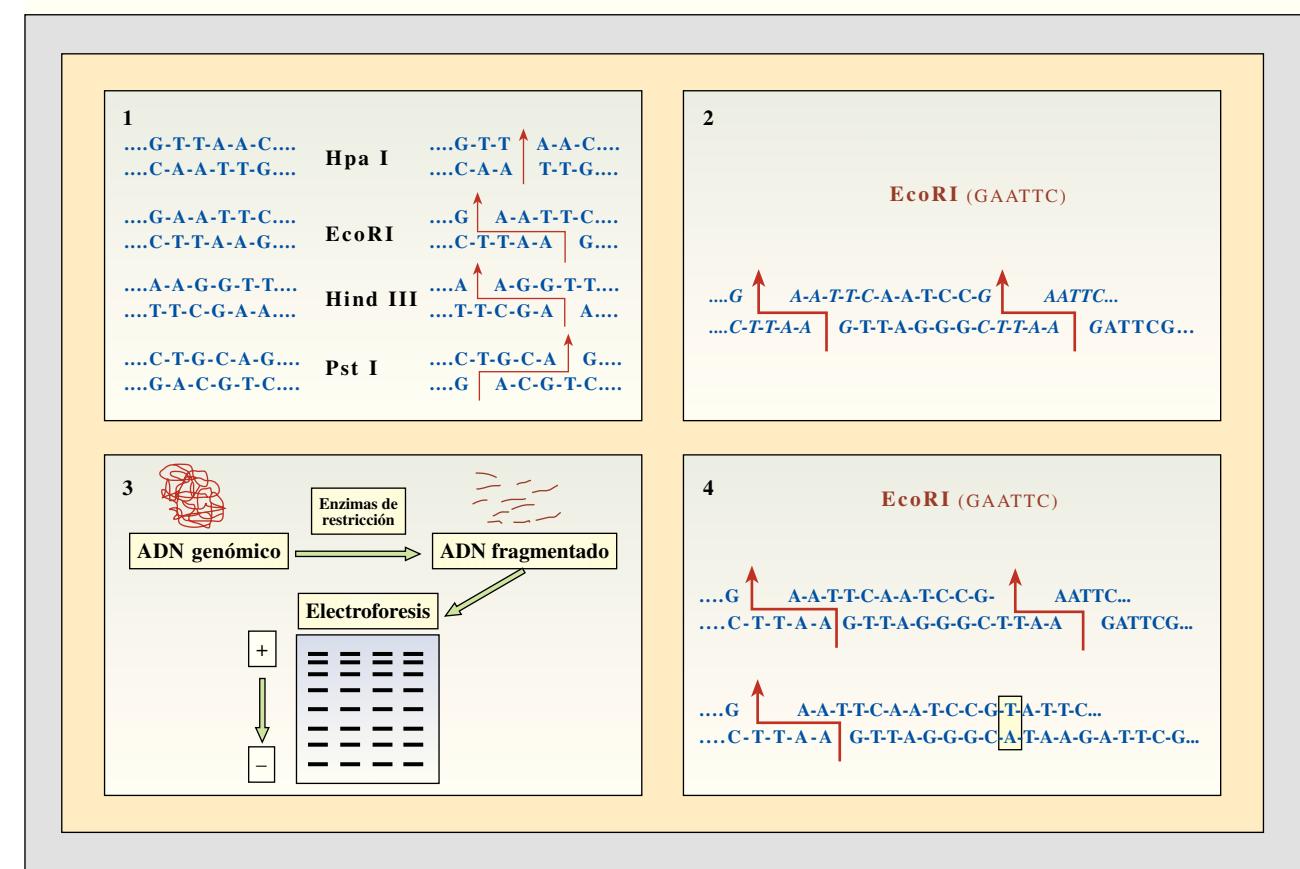


Figura 3. Endonucleasa de restricción. 1. Secuencias de corte de diferentes endonucleasas de restricción. 2. Fragmentación del ADN mediante EcoRI. 3. Separación de fragmentos en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. 4. Imposibilidad de corte con EcoRI por mutación. Obtención de fragmento de ADN de mayor tamaño.

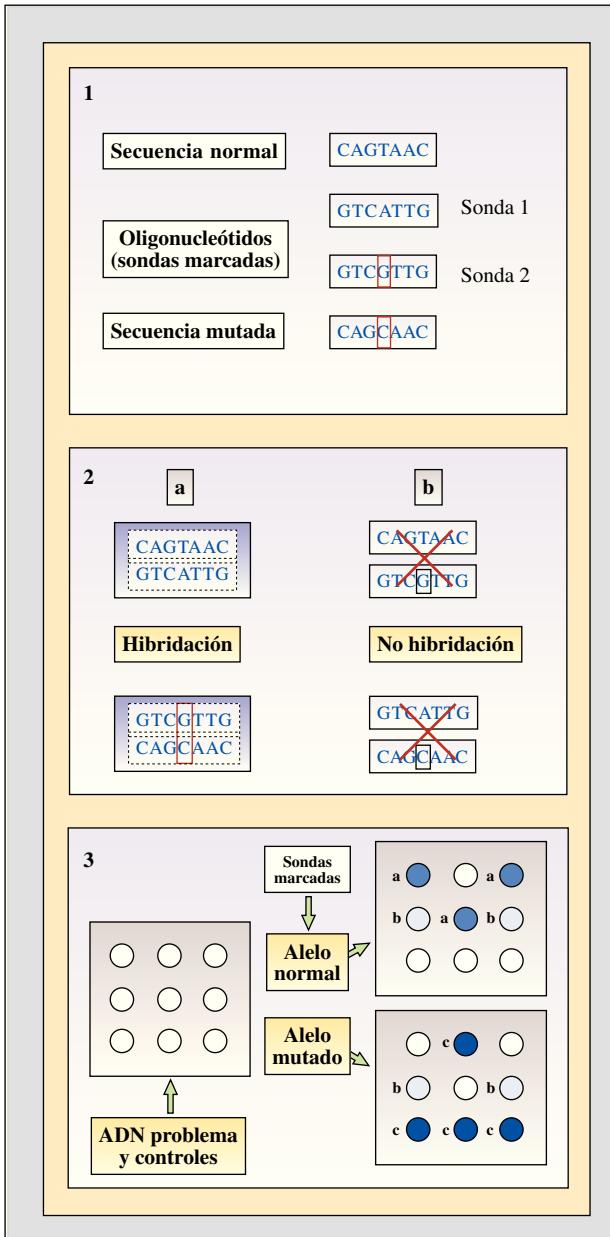


Figura 4. Dot blot. 1. Un oligonucleótido hibrida con un fragmento de ADN problema si sus secuencias son totalmente complementarias. 2. a) Hibridación con fragmentos complementarios, uno con mutación; b) no hibridación. 3. En la membrana de la izquierda se dispone el ADN de cada uno de los casos problema y de los controles. En la membrana superior derecha ha hibridado el ADN de los casos normales homocigotos (a) y de los mutantes heterocigotos (b). En la inferior ha hibridado el ADN de los mutados homocigotos (c) y de los mutados heterocigotos.

sonda con el alelo mutado. Y los heterocigotos, es decir, con un alelo normal y el otro mutado, hibridan con las 2 sondas (fig. 4).

PCR específica de alelo

En esta técnica se parte de una cadena normal y de otra en la que se quiere saber si existe una mutación concreta. Esta técnica consiste en realizar la técnica de PCR utilizando cebadores u oligonucleótidos: unos para

la extensión de la cadena normal y otros para la extensión de la cadena mutada. La extensión ha de realizarse a partir de la zona donde se encuentra la mutación, ya que los cebadores (*primers*) se diseñan para esa zona con y sin la mutación.

La extensión se realizará si los cebadores son complementarios con la cadena que se quiere ampliar. La cadena normal no se amplificará con los cebadores que tienen la mutación y la cadena mutada no lo hará con los cebadores normales (fig. 5).

TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE MUTACIONES DESCONOCIDAS

DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*)

En la electroforesis con gel de gradiente desnaturizante, la cadena bicatenaria se somete a las electroforesis en un gel desnaturizante en la que la concentración del gel es mayor en la parte final que en la inicial. La separación y emigración en el gel se hace en función de la secuencia de nucleótidos. Las cadenas complementarias no tienen la misma secuencia, por lo que la emigración es diferente en el gel. De igual manera, 2 cadenas en las que únicamente difiera un nucleótido tendrán una emigración diferente en la placa de electroforesis (fig. 6). Esta técnica tiene la ventaja de tener una fiabilidad cercana al 100%, pero se precisa un equipamiento muy caro.

SSCP (*single-stranded conformation polymorphism*)

El polimorfismo de conformación de cadena simple se basa en la diferente forma de las cadenas monocatenaria, en función de las secuencias de nucleótidos. Dos cadenas complementarias tienen distinta secuencia de nucleótidos y, por tanto, formas diferentes. El cambio de un solo nucleótido, como puede ocurrir en una mutación, hace que la cadena tenga una forma distinta. El desplazamiento en el gel de agarosa está en función de la forma, de tal manera que será diferente con el cambio de un solo nucleótido (fig. 7). Esta técnica es de fácil realización y de coste no muy elevado; no obstante, no tiene una fiabilidad del 100%.

Análisis de heterodúplex

Las cadenas bicatenarias con todas sus bases complementarias se denominan homodúplex. Una cadena bicatenaria con bases no complementarias se denomina heterodúplex, y justamente en la zona donde no hay complementación la cadena no está unida, lo que hace que en la electroforesis la emigración sea diferente que en otra cadena bicatenaria prácticamente idéntica pero homodúplex.

Este método sirve para detectar mutaciones en ADN de enfermos o portadores heterocigotos en los que hay una cadena bicatenaria normal y otra cadena homóloga, también bicatenaria con la mutación. Las 2 cadenas bi-

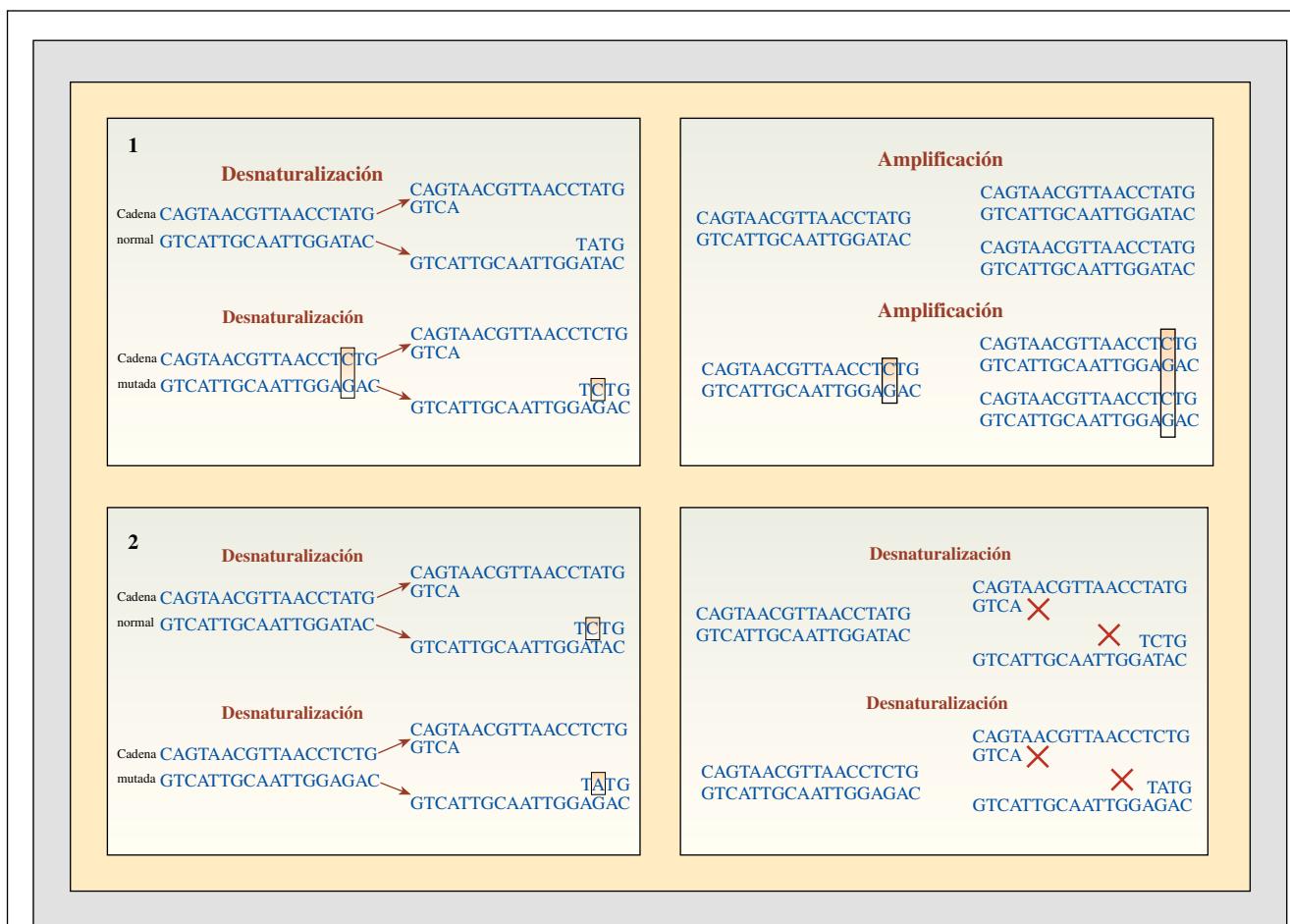


Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de alelo. 1. Amplificación de la cadena utilizando oligonucleótidos (cebadores) sin y con la mutación. 2. No se origina amplificación porque los cebadores no son complementarios.

111

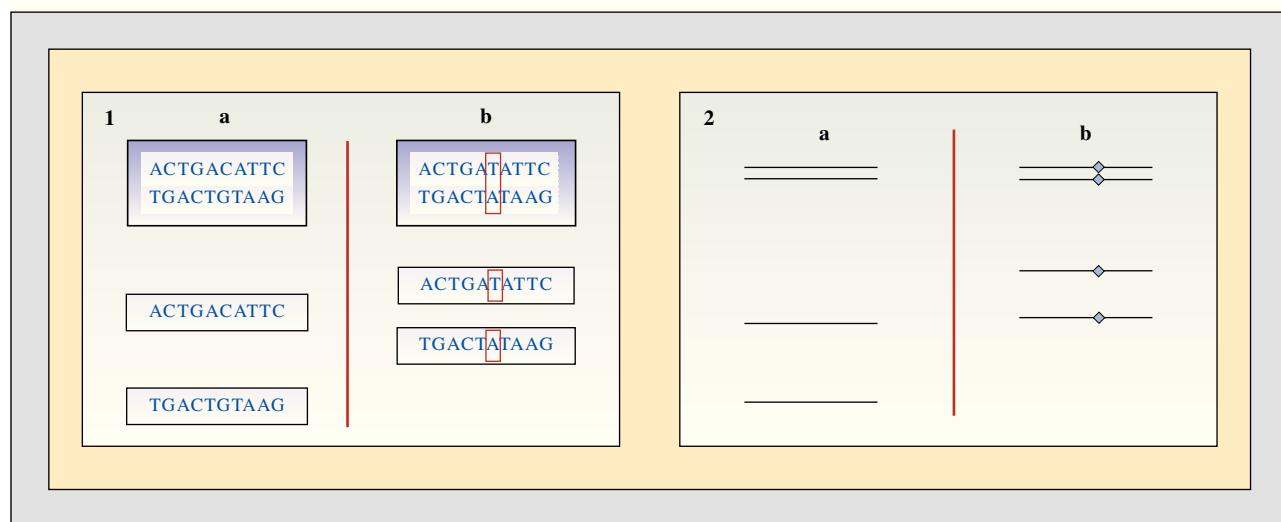


Figura 6. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). 1. El gel para la desnaturalización de la cadena bicatenaria no tiene la misma concentración de desnaturalizante a lo largo de la placa, de manera que la separación de las 2 cadenas se efectúa en función de la secuencia de nucleótidos. a) Secuencia normal; b) secuencia con mutación. 2. a) Secuencia normal; b) secuencia con mutación.

catenarias sometidas al calor o a una sustancia desnaturalizante se separan en cuatro cadenas simples. Renaturalizando de nuevo se pueden dar cuatro posibles combinaciones de cadenas complementarias. Una homodúplex normal, otra homodúplex con la mutación y 2 heterodú-

plex que, como se ha afirmado, tiene una migración diferente en la electroforesis (fig. 8). La sensibilidad se aleja del 100% pero es de fácil realización. Se detectan mejor las mutaciones que se localizan en la parte media de la cadena.

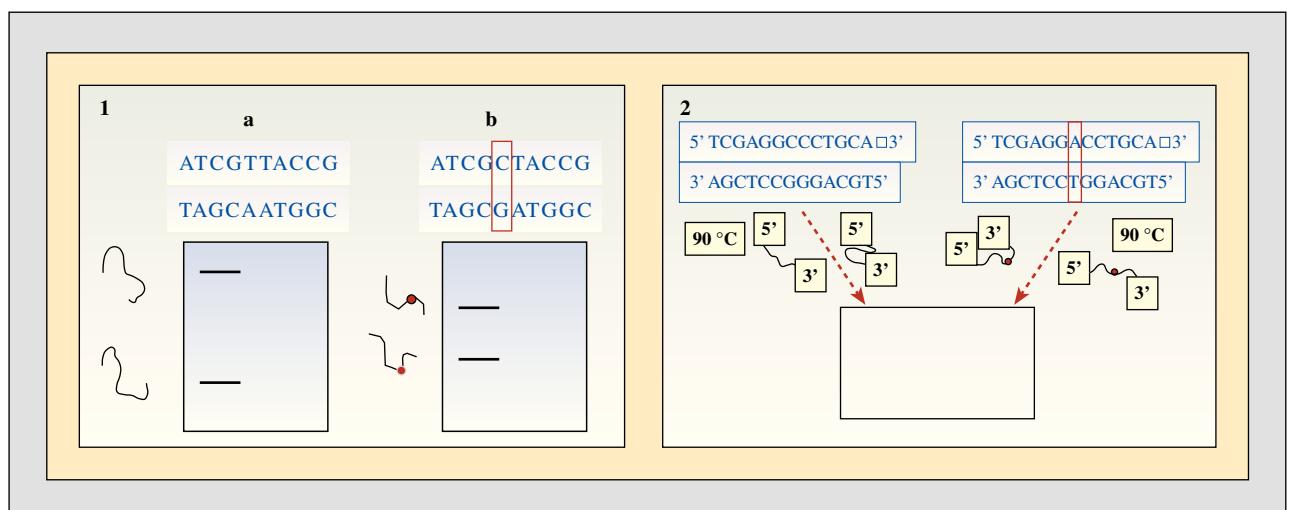


Figura 7. Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP). 1. La cadena monocatenaria tiene diferente forma y desplazamiento en el gel en función de la secuencia de nucleótidos. a) Cadena complementarias normales; b) cadenas complementarias con una mutación. 2. Ejemplo de SSCP.

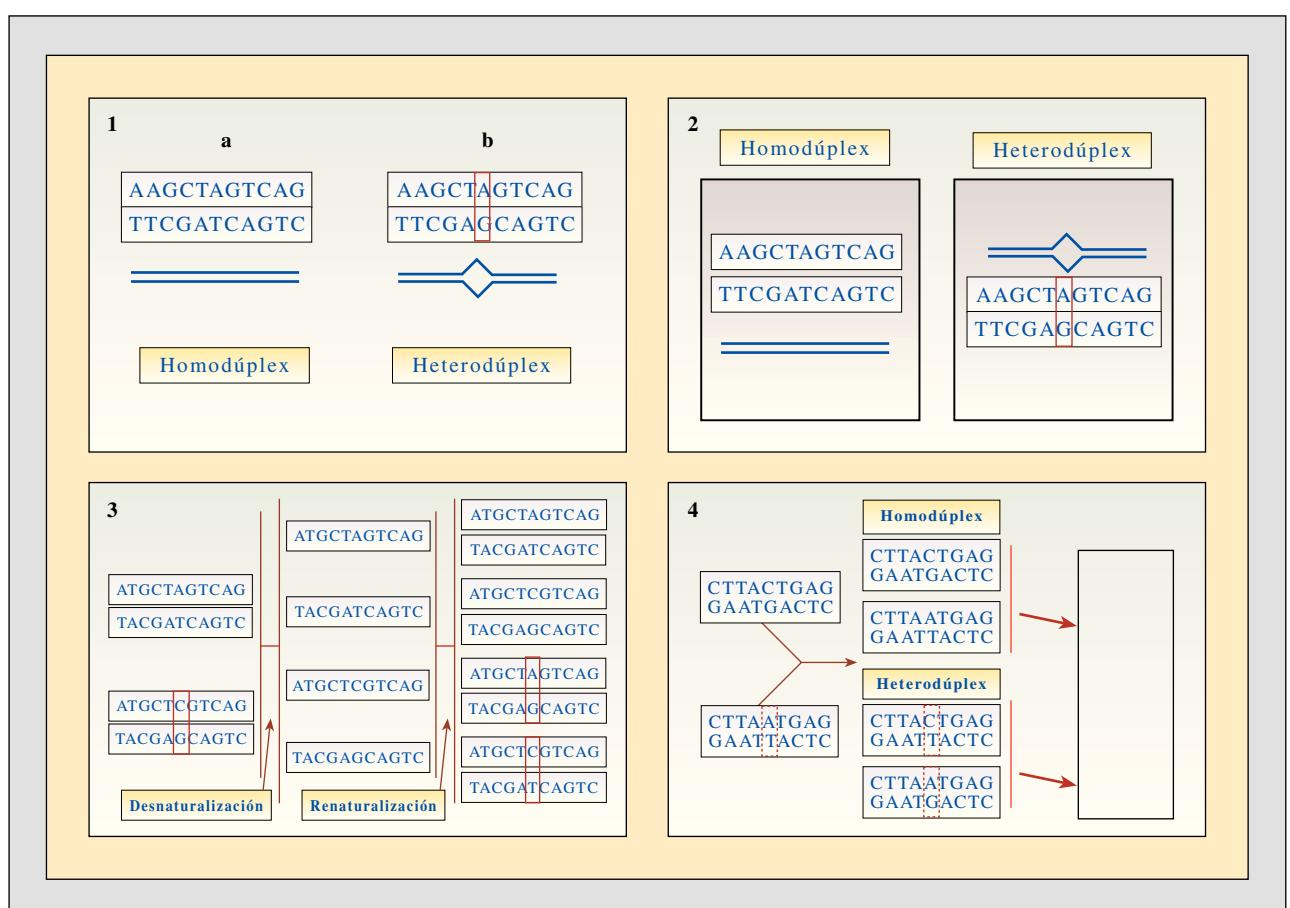


Figura 8. Análisis de heterodúplex. 1. a) Cadena de homodúplex: todas las bases complementarias; b) cadena heterodúplex: 2 bases no son complementarias. 2. El desplazamiento del gel de electroforesis es diferente en las cadenas homodúplex y heterodúplex. 3. Posibilidades de combinación de 2 cadenas homodúplex, una con mutación. 4. Ejemplo de análisis de heterodúplex.

Secuenciación

Esta técnica sirve para conocer la secuencia de nucleótidos de una cadena de ADN y su aplicación práctica, para el estudio de delecciones, mutaciones o inserciones puntuales. Para esto es necesario conseguir la replicación

de una secuencia de ADN. Como en la PCR, a partir de un cebador se consigue la replicación de la cadena. Se realizan cuatro reacciones una por cada nucleótido. La replicación de la cadena es controlada, puesto que se añade un didesoxirribonucléotido específico para cada nucleótido.

do que bloquea la replicación, consigiéndose cadenas de diferentes tamaños. Para la electroforesis, las reacciones de amplificación se disponen en calles (carriles) independientes para cada nucleótido. Como se han obtenido fragmentos de distintos tamaños, la emigración será diferente en la placa de agarosa. La posición del nucleótido en la cadena está determinada por la posición del fragmento en el carril de la electroforesis (fig. 9).

Micromatrices (microarrays)

Las micromatrices o plantillas de ADN rastrean cientos de miles de hibridaciones en paralelo en una rejilla similar a un portaobjetos de microscopio. Las micromatrices pueden diseñarse para detectar mutaciones en genes específicos o para medir la actividad génica en muestras de tejidos. La matriz se genera depositando en la rejilla millones de copias de ADN monocatenario representativo de miles de genes diferentes. Se extrae ARN de los tejidos que se desean estudiar, se transforma en ADN (cADN) y el procedente de tejido normal y el derivado de tejido enfermo se marcan con fluorocromos diferentes. Los cADN marcados se someten a la hibridación con el ADN de la matriz y se analiza. Donde hay fluorescencia se deduce que ha habido hibridación y, por tanto, hay un gen que se expresa en el tejido estudiado. Ésta es la técnica más moderna, y hoy día al alcance de pocos laboratorios de biología molecular, pero en poco tiempo será una técnica de rutina para el estudio del genoma humano.

GLOSARIO TERMINOLÓGICO DE CONCEPTOS

Alelo. Las diferentes variantes que se encuentran para un determinado gen o *locus* génico en un cromosoma. Determina el fenotipo de un individuo, que presenta 2 alelos, que provienen uno de la madre y otro del padre.

Base. Cada uno de los nucleótidos que constituyen el ADN.

Cadena monocatenaria. Una sola hebra de ADN.

Cadena bicatenaria. Dos hebras de ADN unidas por sus bases complementarias: A-T y C-G.

Cebador (primer). Fragmento de ADN, generalmente de pocos nucleótidos, que es utilizado como iniciador de la elongación del ADN por las ADN-polimerasas.

ADNc. También denominado ADN complementario. ADN sintetizado mediante transcriptasas inversas a partir de ARN mensajero.

Codón. Unidad básica codificante de ADN compuesta por 3 nucleótidos, que codifican para un determinado aminoácido siguiendo el código genético.

Desnaturalización. Proceso de separación de 2 cadenas complementarias de ADN. Es el paso previo a la replicación. En el ciclo celular la desnaturalización se realiza espontáneamente; en el laboratorio, mediante calor o agentes químicos.

Electroforesis. Separación de moléculas en un campo eléctrico. Normalmente se emplea un gel, bien de aga-

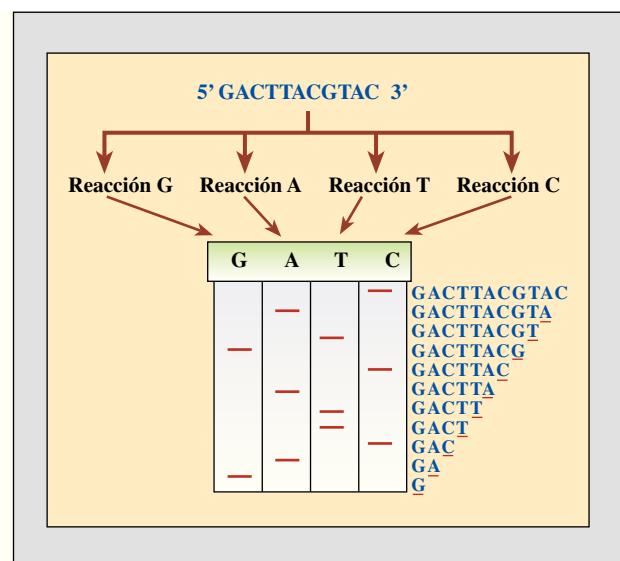


Figura 9. Secuenciación. Reacciones de ADN-polimerasa y electroforesis independientes para cada nucleótido. Se obtienen cadenas de ADN de diferentes tamaños y, por tanto, con diferencia en la emigración en la electroforesis.

rosa o bien de acrilamida, como soporte para ésta. Las moléculas que se disponen en el gel son atraídas hacia el polo positivo o negativo, dependiendo de su carga. Así, por ejemplo, el ADN tiene carga negativa a pH neutro, con lo cual migra hacia el polo positivo. Los fragmentos de menor tamaño migran a mayor velocidad que los más grandes, permitiendo la fácil separación de éstos.

Elongación. Proceso de síntesis de una nueva cadena de ADN por acción de la ADN-polimerasa a partir de un cebador. Es una fase de la PCR.

Enzimas de restricción (endonucleasas de restricción). Son enzimas que reconocen secuencias de ADN y cortan la doble cadena en ese lugar (sitio de restricción). Se denominan con nombres que hacen referencia a la bacteria de la que han sido aisladas.

Exón. Secuencias codificantes de un gen, que están presentes en el mARN maduro.

Gen. La unidad hereditaria que ocupa un locus específico en un cromosoma. Contiene las secuencias codificantes del ADN, los intrones y las secuencias reguladoras, normalmente de un único mARN.

Hibridación (de ácidos nucleicos). Técnica para poner de manifiesto la presencia de determinadas secuencias de ADN o ARN del conjunto del genoma, mediante la unión específica de un fragmento de ADN o ARN marcado que se conoce como sonda.

Intrón. Secuencias no codificantes presentes en el mARN no maduro, que separan los exones, y que son eliminadas en la maduración de éste. Presentan, sin embargo, secuencias importantes para la maduración del ARN.

Locus (pl. loci). Es la región en un cromosoma donde se localiza un gen. Incluye la región promotora y todas las secuencias exónicas e intrónicas de éste.

Mapa de restricción. Sucesión de los sitios de restricción en un segmento de ADN.

Nucleótido. Molécula compuesta de una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina o timina para el ADN y adenina, guanina, citosina o uracilo para el ARN), un azúcar de 5 carbonos (ribosa o desoxiribosa) y un grupo fosfato. Son los precursores de los ácidos nucleicos.

Oligonucleótido. Secuencia de hasta 25 nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster.

Pb (par de bases). Cada uno de los nucleótidos y su complementario que componen el ADN. Bases complementarias: adenina-timina (A-T) y citosina-guanina (C-G).

PCR. Técnica para la amplificación *in vitro* de ADN. Se emplean dos oligonucleótidos complementarios a 2 regiones que flanquean la región que se quiere amplificar (uno para cada cadena), que se añaden al fragmento de ADN que se desea amplificar junto con un exceso de deoxinucleótidos y Taq polimerasa (polimerasa termoestable). En una serie de ciclos (generalmente alrededor de 30) el ADN es repetidamente desnaturalizado, se produce el anillamiento de los oligonucleótidos y cada cadena es extendida a partir de éstos. Las cadenas hijas formadas en cada ciclo sirven de cadenas moldes en el siguiente.

Polimorfismo. Existencia en una población de dos o más alelos de un gen, donde la frecuencia del alelo menos frecuente es mayor (del 1%) de la que se puede explicar por una mutación recurrente.

Replicación. La generación de dos cadenas de ADN a partir de la original.

Secuenciación. Determinación de la secuencia nucleotídica de un ADN o cADN. Puede realizarse de manera manual o automática.

Sitio de restricción. Secuencia de nucleótidos que es reconocida por una determinada enzima de restricción.

Sonda. Fragmento de ADN o ARN con alta homología a un gen o secuencia de interés que, tras su hibridación con éste, permite localizarlo debido a su marcaje radiactivo, fluorescente o por otros agentes químicos.

Southern blot. Técnica que consiste en transferir moléculas de ADN desde un gel de agarosa o acrilamida donde se han separado los fragmentos de material genético a una membrana de nailon o nitrocelulosa manteniendo la conformación espacial. La transferencia se hace por capilaridad o por campo eléctrico. Una vez transferidas, las moléculas son hibridadas con una sonda marcada.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Castaño L, Bilbao JR, Calvo B. Enzimas de restricción. Reacción en cadena de la polimerasa. Formas de estudio de mutaciones. *An Esp Pediatr* 1997;46:87-92.
 Castaño L, Bilbao JR. Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PCR. *An Esp Pediatr* 1997;46:305-10.
 Gómez González O, Armero Martínez P, López Segura V, González Sarmiento R. Métodos de diagnóstico genético. *Medicina* (8.ª Serie) 2002;82:4398-405.
 Sala Serra N, Rodríguez de Córdoba S, Estivill Pallejà X. Principios del análisis genético y mapa del genoma humano.