

Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias.

En memoria del académico doctor Eduardo Aguirre Pequeño

HUGO A. BARRERA SALDAÑA
AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
JAIME A. RIVERA PEREZ
ROSA M. VAZQUEZ ALEMAN
MANUEL L. GONZALEZ GARAY

Partiendo de nuestro interés por promover en nuestro país la Medicina molecular de las enfermedades hereditarias, misma que se ocupa del desarrollo y refinamiento de estrategias para su diagnóstico, prevención y terapia, hemos implementado el diagnóstico a nivel molecular y emprendido estudios de genética y epidemiología moleculares de varias enfermedades hereditarias. Nuestro esfuerzo lo hemos iniciado con fibrosis quística, distrofia muscular y hemofilia clásica, utilizando las técnicas de Southern y la reacción en cadena de la polimerasa, recurriendo a estrategias de detección de mutaciones que permiten detectar directamente la mutación involucrada, o identificar a través de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción al alelo afectado, para luego seguir su herencia en el árbol genealógico familiar. Con los estudios realizados a la fecha hemos apoyado no sólo a los médicos y los pacientes que nos solicitan el diagnóstico, sino que también hemos ganado valiosa información sobre la frecuencia y tipo de mutaciones que en nuestra población ocasionan estos padecimientos.

CLAVES: Enfermedades genéticas, diagnóstico molecular, reacción en cadena de la polimerasa, asesoramiento genético.

SUMMARY

Accordingly, we have established in our unit a DNA diagnosis laboratory and have started molecular genetics and epidemiological studies of several inherited diseases. We have started with cystic fibrosis, muscular dystrophy and haemophilia A. We practice the molecular diagnosis with both, Southern transfer and the polymerase chain reaction, using either direct (detection of mutations) or indirect (restriction fragment length polymorphisms) approaches. With the studies we have so far carried out, we have been able to provide genetic counseling and gained valuable information on the type and frequency of mutation associated to these diseases in our region.

KEY WORDS: Genetic diseases, molecular diagnosis, polymerase chain reaction, genetic counseling

Introducción

Genes, mutaciones y enfermedad

Se estima que la especie humana tiene entre 50,000 y 100,000 genes diferentes. El sitio ocupado por un gen dentro del cromosoma se llama *locus* y las dos versiones o alternativas, aportadas una por la madre y otra por el padre, se llaman alelos.

Aquellos genes que tienen su *locus* en los cromosomas sexuales se denominan genes ligados al cromosoma X o al cromosoma Y, según sea el caso. El resto de los genes se denominan genes autosómicos.^{1,2}

Las alteraciones heredables en la información contenida en un gen se denominan mutaciones y éstas son la causa de las enfermedades mendelianas. Existen tres mecanismos para la transmisión hereditaria de una mutación: En las enfermedades

Trabajo de ingreso del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, leído en sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina, el día 21 de agosto de 1991.

Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N. L.

autosómicas dominantes, como el enanismo acondroplásico, basta que uno solo de los dos alelos esté mutado para que el cuadro se manifieste. En las enfermedades autosómicas recesivas, como la fibrosis quística o el albinismo, se requiere de la presencia de ambos alelos mutados para la manifestación del cuadro clínico y los pacientes se denominan homocigotos afectados, mientras que los padres presentan un alelo sano y otro mutado y se les denomina portadores o heterocigotos. Los individuos que tienen sus dos alelos inalterados se denominan homocigotos sanos. Por último, en las enfermedades ligadas al cromosoma X, como la hemofilia clásica y la distrofia muscular de Duchenne, los varones afectados heredan el alelo mutado en su único cromosoma X materno, mientras que los varones sanos heredan el cromosoma materno normal; las hijas heredan o no el cromosoma X materno con la mutación, siendo las primeras portadoras. Una portadora, al igual que su madre, no manifiesta la enfermedad pero puede tener hijos varones afectados.²

Biotecnología para Estudios de Medicina Molecular.

Con el advenimiento en la década de los 70's de la tecnología de recombinación del ADN y de los métodos para la determinación de su secuencia nucleotídica, se ha podido aislar y conocer la estructura primaria de un buen número de genes asociados a enfermedades hereditarias que afectan al hombre. Así mismo, numerosos estudios realizados por laboratorios en diferentes países han permitido identificar las principales mutaciones que afectan el funcionamiento de tales genes y de sus productos de expresión, derivándose de este conocimiento nuevas herramientas para el diagnóstico, que ahora se practica a nivel molecular y que además es más preciso y confiable.¹

El progreso reciente en el número de enfermedades mendelianas accesibles al diagnóstico molecular es impresionante. Además, esta tecnología ha demostrado ser útil y certera en la identificación de individuos, lo cual ha enriquecido enormemente a la medicina legal. Por otro lado, estas mismas herramientas han demostrado ser muy sensibles y específicas en la detección del material genético de microorganismos patógenos como los virus de la inmunodeficiencia adquirida humana, entre otros muchos.

La medicina molecular ha sido definida como aquella área de la biología molecular relevante a enfermedades hereditarias, que persigue el desarrollo y refinamiento de estrategias para su diagnóstico, prevención y terapia.³ Con la idea de impulsar esta área y contribuir así a ampliar y completar la tradición y experiencia que en nuestro país ya se ha cultivado en el campo de la genética humana, varios grupos de investigación estamos realizando estudios con el ADN obtenido de las células sanguíneas de pacientes y de sus familias, para determinar el diagnóstico molecular y la presencia de portado-

res en familias afectadas por enfermedades mendelianas, en donde miembros de las mismas desean asesoramiento genético para planear mejor su futuro reproductivo.

En nuestro laboratorio hemos implantado el diagnóstico molecular de enfermedades mendelianas. La breve experiencia que hemos alcanzado la comunicamos a continuación.

Metodología

Para practicar el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias se requiere del ADN Genómico del paciente y de las herramientas o técnicas de Biología Molecular y Recombinación del ADN que a continuación describimos:

1. *ADN Genómico.* Se puede obtener de cualquier tejido, siendo muy conveniente recuperarlo a partir de leucocitos que se someten a un tratamiento que elimina progresivamente los restos celulares y las proteínas asociadas al ADN.⁴ Una vez concluido esto, se determina la cantidad y la integridad del ADN obtenido y se almacena hasta su estudio.

2. *Técnicas y diagnóstico.* Con éstas rastreamos y analizamos los alelos sanos y mutados que deseamos estudiar. En el laboratorio contamos con dos técnicas: El Análisis tipo Southern y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP).

2A. *Análisis tipo Southern:* Esta técnica, diseñada por E. Southern en 1977,⁵ utiliza dos herramientas que son pilares de la tecnología de recombinación de ADN: Las endonucleasas de restricción y las sondas o rastreadores moleculares. Las enzimas de restricción son endonucleasas que cortan la doble cadena del ADN en sitios con secuencia de bases específicas o sitios de restricción y generan fragmentos de diversos tamaños denominados fragmentos de restricción. Existen muchas enzimas de restricción y cada una reconoce una secuencia diferente, de tal modo que con cada enzima se obtienen distintos tipos de fragmentos.

Las sondas son fragmentos de ADN de localización cromosómica generalmente conocida.⁶ Se obtienen de tres fuentes: Las sondas genómicas se aíslan a partir de genotecas o colecciones de ADN cromosómico, las sondas de ADN complementario (ADNc) se sintetizan por transcripción inversa del ARNm del gen de interés; por último, algunos tipos de sondas como los oligonucleos específicos o sondas OAE que rastreadan directamente a los alelos mutados, se sintetizan químicamente.

Para que emitan una señal identificable, las sondas se someten al proceso de marcaje,⁴ consistente en una síntesis *in vitro* en la que uno de los cuatro nucleótidos utilizados, el cual es incorporado en la sonda producida, porta un átomo que emite generalmente radiación (Fig. 1).

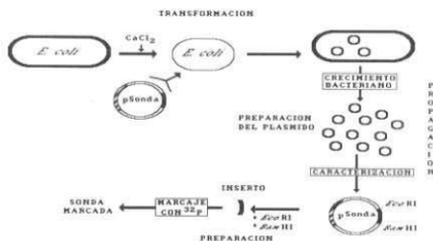


Figura 1. Preparación de la sonda. Se esquematizan los pasos a seguir en la preparación, preparación y marcaje de sondas. *E. coli*, *Escherichia coli*; pSonda, plásmido recombinante que porta el fragmento de ADN que va a usarse para generar la sonda o rastreador molecular; EcoRI y BamHI son los nombres de dos endonucleasas de restricción; ³²P, radioisótopo del fósforo.

La técnica de Southern se inicia con el procesamiento del ADN genómico, para después continuar con los pasos descritos en la Figura 2. Finalmente se concluye con el análisis de las bandas en la autorradiografía, lo que nos brinda valiosa información sobre el gen en cuestión y sus mutaciones. Dependiendo de la sonda utilizada y del tipo de gen y mutación que lo afecta, mediante el Análisis tipo Southern se practican dos tipos de diagnóstico:

- Diagnóstico directo:** Este se alcanza cuando la sonda híbrida con el gen que deseamos estudiar, de tal modo que una mutación que elimine el gen (delección) o partes del mismo, no mostrará alguna o todas las bandas observadas en la autorradiografía de los individuos normales (Fig. 3).
- Diagnóstico indirecto:** Este se practica cuando la mutación analizada no es rastreadable con una sonda, debido a que aún se desconoce el gen, o debido a que la mutación es difícil de detectar, ya sea porque es puntual o porque hay una amplia variedad de mutaciones involucradas. Para realizarlo se utiliza una sonda que hibride con el gen de interés o incluso con una región vecina. Además se requiere que el fragmento que va a ser detectado por hibridación sea polimórfico; es decir, que varíe en tamaño entre los individuos, de tal manera que sea capaz de diferenciarse el alelo materno del paterno. Esta condición nos permite conocer en cuál cromosoma se encuentra el alelo mutado y descubrir qué individuos de la familia lo portan. (Fig. 3) Esto se logra con el sistema de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR)⁶ (Fig. 4).

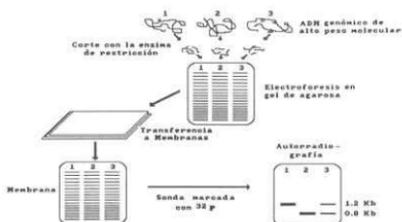


Figura 2. Análisis tipo Southern. Se esquematiza el diagrama de flujo de los pasos a seguir para el rastreo de una secuencia genética. 1) Acción de las enzimas de restricción sobre el ADN genómico y separación de los fragmentos de restricción de acuerdo al tamaño en un gel por efecto de un campo eléctrico. 2) Desnaturalización química (a pH alcalino) del ADN y su transferencia por capilaridad a una membrana. 3) Hibridación mediante incubación de la membrana con la solución que contiene el ADN de la sonda marcada y también previamente desnaturalizada. 4) Lavado de la membrana para eliminar el exceso de sonda que no hibridó, su secado y exposición a una película radiográfica que capta la radiactividad (autorradiografía). Kb, kilopares de bases.

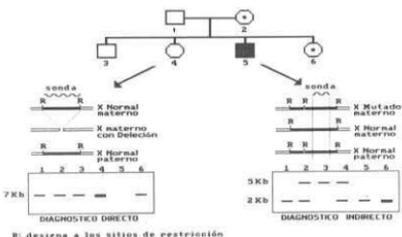


Figura 3. Alternativas para el análisis molecular. En el caso de una enfermedad ligada al cromosoma X, la sonda marcada híbrida con el fragmento de restricción de interés (en barras negras). Izq. La sonda no hibrida con el cromosoma materno mutado; la desaparición de la banda en el afectado y la disminución del grosor en las bandas de la madre y la hija menor, evidencian directamente la delección. Der. La sonda híbrida con dos fragmentos de restricción maternos de diferente tamaño (PLFR). La hija afectada y el hijo menor han heredado el fragmento de 2 Kb que se está segregando con la enfermedad.

POLIMORFISMO EN LA LONGUITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICIÓN

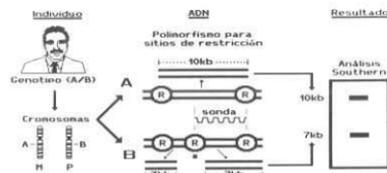


Figura 4. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PLFR). La persona de la ilustración presenta un genotipo compuesto por los alelos A y B en un mismo locus (es decir, es heterocigoto para dicho alelo). La letra M designa al cromosoma materno y la P al paterno. A nivel del ADN se observa que el alelo materno presenta dos sitios de restricción (R) que generan un fragmento largo (de 10 Kb), mientras que el alelo paterno presenta un sitio adicional (señalado con un asterisco) que divide el fragmento en dos (3 y 7 Kb). La sonda híbrida con los fragmentos de 10 y 7 Kb y produce el patrón demostrativo de PLFR que se observa en la autorradiografía del análisis tipo Southern. Si en los individuos afectados se observa homocigocidad para el fragmento 7 Kb, entonces la presencia de este alelo en los otros miembros de la familia revela ya sea la naturaleza portadora (heterocigoto con una banda de 10 Kb y otra de 7 Kb) o de afectado (homocigoto para la banda de 7 Kb). El diagnóstico de afectado puede alcanzarse oportunamente, es decir, aún y cuando todavía no se haya manifestado síntoma del padecimiento en estudio.

2B Reacción en cadena de la polimerasa.

Esta nueva herramienta permite generar grandes cantidades de un segmento del gen que se desea analizar y que está presente en muy bajas cantidades en el material clínico a investigar. No requiere del uso de radioisótopos por su riesgo y alto costo y además es practicable aún con tejidos embebidos en parafina, e incluso con muestras de tejidos procedentes de especímenes de museos o estudios arqueológicos (por ejemplo de momias).

Esta RCP, descrita por primera vez por investigadores de la *Compañía Cetus*,⁷ se realiza en ciclos cuyos pasos se esquematizan en la Figura 5. Al finalizar la reacción se logra amplificar de 10^6 a 10^7 veces el gen de interés. Posteriormente basta con un análisis directo por cortes con enzimas de restricción y/o hibridaciones con sondas no radiactivas para comprobar la identidad del gen amplificado. La técnica permite además la amplificación y el análisis simultáneo de dos o más secuencias.



Figura 5. Amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Se realiza en ciclos y cada ciclo tiene tres pasos: 1) Desnaturalización del ADN por calentamiento hasta que se separe en cadenas simples. 2) Apareamiento de las cadenas con un par de oligonucleótidos sintéticos específicos (barras negras), de los cuales uno es complementario al extremo 5' del gen o fragmento de ADN que se desea amplificar, y el otro se aparea con el extremo 3' del mismo, pero en la cadena opuesta. 3) Extensión de los oligonucleótidos que actúan como iniciadores por la ADN polimerasa, lográndose sintetizar dos nuevas cadenas de ADN complementarias a las cadenas originales. Este ciclo se repite de 20 a 30 veces y cada ciclo duplica la cantidad del ADN blanco, resultando en 10^6 a 10^7 copias de la molécula inicial.

Modelos de Estudios, resultados y discusión.

En nuestro laboratorio hemos implementado el diagnóstico genético a nivel molecular de enfermedades hereditarias, empleando las técnicas de Biología Molecular Recombinación de ADN arriba descritas. Actualmente trabajamos en las siguientes:

De diagnóstico directo:

1. Fibrosis quística, trastorno hereditario autosómico recesivo.
2. Distrofia muscular ligada al cromosoma X

De diagnóstico indirecto:

3. Hemofilia A, enfermedad también ligada al cromosoma X.

A continuación se describen la genética y fisiología de las enfermedades seleccionadas y los avances logrados al estudiar en nuestro laboratorio su medicina molecular.

1. Fibrosis quística.

Es la enfermedad mendeliana autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica, con una incidencia de un bebé afectado por cada 2,000 recién nacidos vivos. Es un padecimiento generalizado de las glándulas exócrinas que afecta a los sistemas respiratorio, digestivo y tegumentario y produce la muerte temprana por insuficiencia respiratoria crónica o infección respiratoria severa. Los individuos heterocigotos son normales y no hay métodos clínicos para identificarlos.⁸

Anteriormente el diagnóstico de esta enfermedad se hacía solamente por los datos clínicos. Recientemente se logró implementar en México la detección de portadores de la enfermedad usando PLFR's para el análisis indirecto.⁹

Gracias al aislamiento y secuenciación del gen FQ por los grupos encabezados por L.C. Tsai y F. Collins,¹⁰ es posible realizar el diagnóstico directo de este padecimiento. El gen está localizado en la banda 31 del brazo largo del cromosoma 7, consta de 250,000 pares de bases y produce una proteína de la membrana celular constituida por 1,480 aminoácidos que intervienen en el transporte activo del cloro. La mutación encontrada en la mayoría de los cromosomas afectados en la población caucásica, es una deleción (pérdida) de tres pares de bases (codón) que determina la ausencia de un residuo de fenilalanina en la posición 508 de la proteína (alelo 508) y que afecta severamente su funcionamiento.

A partir del conocimiento de la secuencia del gen afectado fue posible sintetizar iniciadores complementarios a secuencias de aproximadamente 20 bases que flanquean el sitio de la mutación. Mediante la amplificación por la RCP de la región en ambos alelos comprendida entre los iniciadores, y la resolución en un gel de poliacrilamida al 8% de los productos amplificados, se pueden distinguir las bandas de ADN amplificado provenientes del alelo normal y del alelo mutado (F508) mismos que difieren en tan sólo tres nucleótidos.

En la figura 6 se muestra la fotografía del gel de poliacrilamida donde se resolvieron los productos de la RCP para fibrosis quística, practicada al ADN leucocitario de los miembros de una familia representativa de nuestros estudios. La familia consta de los padres y dos hijos: uno afectado para el que se pretendía confirmar el diagnóstico clínico, y el otro aparentemente sano, pero que requería diagnóstico de portador. Como puede observarse en los carriles del gel ubicados debajo del árbol genealógico, los padres son heterocigotos para el alelo F508, el hijo afectado es homocigoto para éste, mientras que el hermano es homocigoto para el alelo normal, excluyéndose la probabilidad de portador.

A la fecha hemos analizado los ADNs de diez familias provenientes del norte y occidente del país, que han aportado once pacientes: cinco homocigotos F508 (F508/F508), tres heterocigotos compuestos (F508/alelo no determinado) y tres

con genotipo mutante no determinado. Nuestros estudios han permitido un análisis de 22 cromosomas FQ, de los cuales trece muestran el alelo F508 y nueve presentan otro tipo de mutación, lo cual determina una frecuencia del alelo en cuestión (59.1%), que no difiere estadísticamente de las frecuencias globales europea y española. En siete familias se han obtenido conclusiones para un asesoramiento genético confiable, detectándose hasta el momento doce heterocigotos o portadores del alelo F508. Es de interés hacer notar que incluso se pudo establecer el diagnóstico molecular en una niña asintomática que manifiesta niveles altos de cloro en el sudor en pruebas repetidas.

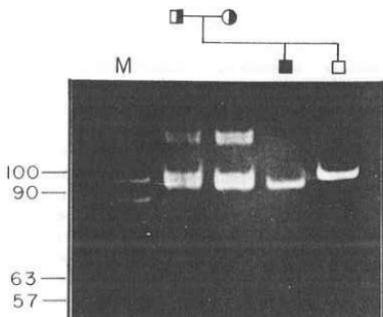


Figura 6. Diagnóstico molecular en una familia con fibrosis quística. Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, se amplificó un microgramo de los ADNs de cada uno de los miembros de la familia ilustrada, empleando de cada uno de los oligonucleótidos. El éxito de la reacción se verificó primero en un gel de agarosa al 1.5% (no se muestra) para luego proceder al análisis en el gel de poliacrilamida. M, carril con los marcadores de ADN de peso molecular conocido, indicada su longitud en nucleótidos con los números a la izquierda. Las bandas de interés son los fragmentos amplificados de 97 a 94 nucleótidos. Las otras bandas de mayor tamaño que se observan por encima de éstas en los carriles de las muestras de los padres, corresponden a la apareamiento ilegítimo entre una cadena del alelo sano y otra del normal (es decir, son heteroduplex). La interpretación del experimento se da en el texto.

2. Distrofia muscular ligada al cromosoma X.

La distrofia muscular ligada al cromosoma X (DMLX) es una de las enfermedades mendelianas más frecuentes en el hombre, afectando a uno de cada 3,500 varones nacidos vivos.¹¹ Se caracteriza por un deterioro progresivo de las fibras musculares y presenta dos formas o tipos clínicos: La Duchenne y la Becker. La primera tiene un comienzo temprano de pérdida de la fuerza muscular que inhabilita al paciente aproximadamente a los 10 años de edad y ocasiona la muerte en la segunda o tercera década de la vida. La distrofia muscular tipo Becker

se caracteriza por un cuadro clínico más benigno. Ambas generan por mutaciones (principalmente deleciones) en el mismo gen, pero con diferente severidad en el daño ocasionado por éstas en la función del gen y de su producto de expresión.

El gen localizado en la banda 21 del brazo corto del cromosoma X, produce una proteína denominada distrofina con funciones aún no bien definidas, que forma parte de la membrana de la célula muscular y que también se encuentra en las neuronas.¹² Este gen es el más grande hasta ahora descrito en la especie humana (2,5 millones de pares de bases), lo que explica la alta frecuencia de sus mutaciones.

En el 70% de los pacientes con DMLX se pueden detectar las deleciones que ocasiona la enfermedad utilizando sondas derivadas del ADNc de distrofina. Se ha descrito un patrón no polimórfico de bandas o fragmentos generados por la enzima *HindIII*, detectables con estas sondas en la autoradiografía del Análisis tipo Southern de individuos normales; la ausencia de una o más de estas bandas en un afectado permite el diagnóstico molecular del defecto.¹³

Después de un extenso análisis de las deleciones encontradas en el gen en varios pacientes, se determinaron nueve regiones génicas particulares que son proclives a la ruptura con mayor frecuencia. Gracias al conocimiento de la secuencia de estas regiones, se han sintetizado iniciadores que permiten la amplificación simultánea por RCP de dichos segmentos.¹⁴ Esta técnica, conocida como *multiplex*, permite establecer en uno o dos días la deleción que presenta un individuo afectado y determinar a los portadores en su familia. Este análisis es útil en el 65% de los casos y elimina la necesidad del análisis por la técnica de Southern. Además, para aquellos casos en los que no es posible detectar la deleción, se han descrito regiones polimórficas que pueden amplificarse para hacer un diagnóstico indirecto, similar en principio al que se describirá a continuación para hemofilia A.

Con la colaboración de varios laboratorios de Genética Humana en el país, hemos podido reunir un total de 24 familias con antecedentes de distrofia muscular. Hemos iniciado el análisis por RCP, empleando estuches *multiplex* para nueve regiones o *9-plex*, de cada uno de los miembros varones afectados de estas familias. Este proceder forma parte de nuestra estrategia para optimizar esfuerzos y recursos, dado que el diagnóstico con dichos estuches sólo podrá practicarse en la familia en cuestión, si la amplificación del ADN del varón afectado muestra ausencia de una o más de las nueve bandas generadas por la RCP. Cuando éste es el caso, entonces procederemos a estudiar a la madre (el padre no proporciona información de valor pues es sano) y demás miembros de la familia, buscando principalmente determinar si las hermanas del afectado son o no portadoras de tales deleciones, información en la que basaremos el asesoramiento genético. En la Figura 7 se aprecian los resultados que obtuvimos con una

familia cuyo miembro afectado resultó positivo para deleción en la amplificación con el estuche *9-plex*. Como puede apreciarse, el testigo femenino muestra un patrón normal de nueve bandas, el afectado muestra la pérdida de la banda correspondiente al *exón 44* de la distrofina que determina con toda certeza el diagnóstico molecular del padecimiento mientras que la madre, que presenta también nueve bandas, muestra claramente en la banda correspondiente a la mutación del propósito una concentración equivalente a la mitad en proporción a las otras, delatándola como portadora de la deleción en uno de sus cromosomas.



Figura 7. Detección de deleciones en distrofia muscular ligada al cromosoma X por múltiples reacciones en cadena de la polimerasa. En el carril de la N se observa el patrón normal en bandas y concentración de un testigo femenino. En el carril del propósito se observa la ausencia de la banda de 388 pb correspondiente al *exón 44*, la que muestra en el carril materno una disminución en su concentración con respecto al testigo, y ocasiona que la madre sea portadora de la enfermedad.

3. Hemofilia A.

La hemofilia A es una enfermedad caracterizada por períodos hemorrágicos prolongados que generalmente se presentan posteriores a un traumatismo. Es ocasionada por la ausencia o presencia defectuosa del gen que codifica para el factor VIII, una de las proteínas que intervienen en la vía intrínseca de la coagulación.¹⁵

El gen que codifica para el factor VIII está localizado en el cromosoma X y ya se conoce su estructura y secuencia. Gracias al desarrollo de concentrados del factor VIII se ha alcanzado un gran avance en el tratamiento de esta enfermedad, aumentando considerablemente las expectativas de vida de los hemofílicos, quienes ahora logran tener una vida casi normal. Con estos avances solamente los hemofílicos recibían el beneficio, mientras que el resto de los familiares no tenían acceso a una información confiable que les permitiera planear su reproducción.

El diagnóstico molecular de la hemofilia A se puede realizar de manera directa, aunque con ciertas dificultades dada la heterogeneidad de las mutaciones del gen del factor VIII. Alternativamente, el uso de PLFR's en el gen del factor VIII permite rastrear el gen defectuoso a través del árbol genealógico familiar; es decir, permite practicar un diagnóstico indirecto.

En nuestro laboratorio logramos implementar el diagnóstico indirecto y hacer un análisis de la utilidad del polimorfismo para la enzima BcII en el intrón 18 del gen del factor VIII, en la detección de portadores de hemofilia A en familias afectadas en el noreste del País. La detección de portadoras se hizo por *Análisis tipo Southern*, haciendo uso de la sonda p114.12 que contiene los exones 17 y 18 del gen que codifica para el factor VIII. Al hibridar nuestras muestras de ADN con esta sonda, se obtuvieron dos tipos de bandas: una de 1.2 Kb y la otra de 0.9 Kb.

La figura 8 corresponde a la autorradiografía de una de las familias donde el polimorfismo resultó útil. En este caso la madre (2) resultó heterocigota (informativa) para el polimorfismo BcII, pues presenta las bandas (dos) para los fragmentos de 1.2 Kb y de 0.9 Kb. Esto nos permite rastrear la herencia de cada uno de sus alelos en sus hijos, observándose que el afectado heredó el alelo de 0.9 Kb y que éste se cosegrega con el alelo mutado. El padre (1) presenta un alelo no mutado de 1.2 Kb, correspondiente a su único cromosoma X. Dos de las hijas (4 y 6) son heterocigotas para estos alelos, presentan la banda de 1.2 Kb proveniente del padre y la banda de 0.9 Kb correspondiente al cromosoma mutado de la madre, por lo cual son portadoras del gen defectuoso. La otra hija (5) ha heredado el cromosoma X sano del padre de 1.2 Kb y también ha heredado el fragmento de 1.2 Kb de la madre, identificado como el alelo normal por su ausencia en el hijo afectado, el cual determina que ella no es portadora del defecto genético causante de la enfermedad.

En nuestro estudio hemos analizado 94 cromosomas X provenientes de 58 muestras recolectadas de diez familias con antecedentes de la enfermedad. De un total de 36 mujeres, 17 resultaron informativas (47%), lo que permitió establecer en seis familias la segregación de los cromosomas mutados. De 22 mujeres que requieran diagnóstico de portadoras, cinco resultaron positivas, siete se excluyeron de serlo y en diez no fue posible llegar a una conclusión.

Conclusiones y perspectivas

Los esfuerzos que estamos realizando varios laboratorios en nuestro país por avanzar en la medicina molecular, complementan y enriquecen la vasta experiencia que en Genética humana se ha alcanzado en México. La tecnología introducida se constituye en un nuevo instrumento que permite coadyu-

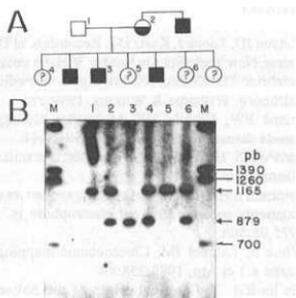


Figura 8. Diagnóstico de hemofilia A por PLFR para BcII. Se analizaron por la técnica de Southern 10 μ g de ADN's de los miembros de la familia indicados (ver explicación e interpretación en el texto).

var, a través del asesoramiento genético, a la prevención de enfermedades hereditarias que afligen a nuestra comunidad, y que en la mayoría de los casos además de tener un curso grave y ser letales, causan gran impacto psicológico y social en la familia, generan demandas de servicios que no pueden ser brindados por el Estado y ocasionan gran incertidumbre en las decisiones de reproducción de los miembros no afectados de las familias donde esta clase de padecimientos se presentan.

Nuestro objetivo es fundamental y ampliar la prestación del servicio de diagnóstico molecular, iniciar el estudio de otras patologías mendelianas e infecciones y realizar estudios epidemiológicos a nivel molecular. Este esfuerzo lo hemos enmarcado como una contribución de nuestro grupo al propósito, ya internacional, de desarrollar intensa y sistemáticamente los diferentes aspectos de la biología del genoma humano para conocer entre otras cosas, la localización de todos los genes involucrados en enfermedades mendelianas, así como la frecuencia y tipo de mutaciones que los producen.

Agradecimientos

Expresamos nuestra gratitud al CONACYT, a la Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica de la SEP, al Centro Internacional de Biología Molecular y Celular, A. C., a la Fundación Mexicana para la Salud, y a I.B.M. de México, S.A., por los apoyos brindados que hicieron posible el presente trabajo. Agradecemos la colaboración de los doctores Rosa Isela Ortiz de Luna, Fernando Charles García, José M. Cantú Garza, Adrián Murillo Almada e Irma Villarreal, en la obtención de las muestras de los pacientes, así como la de Gladys García, Luis Sandoval y Francisco Martínez, por su asistencia en los experimentos. Agradecemos también a los doctores Stefano Gustinich y Thomas White por sus generosos donativos de reactivos, Antonio Luna por su ayuda con las fotografías y a M. Páez por la preparación del manuscrito.

Referencias

1. Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. Recombinant DNA, A short course. New York: Sci Am Books, W.H. Freeman, 1983;211.
2. Gelhrter TD, Collins FS. Principles of medical genetics. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990;27.
3. Dunne PW, Epstein HF. Molecular biology of human muscle disease. Biotechnology, 1991;9:41.
4. Davies KE. Human genetic diseases: a practical approach. Washington: IRL, 1986.
5. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol, 1975;98:503.
6. White R, Lalouel JM. Chromosome mapping with DNA markers. Sci Am, 1988;258:40.
7. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction, Sci Am, 1990;262:56.
8. Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. Cystic Fibrosis. En: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle B (eds). The metabolic bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 1989; 2649.
9. Fernández M, Hernández D, Menéndez E, Calva E. Detección molecular de Fibrosis Quística en una familia mexicana. De la Biología Molecular a la Medicina. Gac Méd Méx, 1989; 125:45.
10. Rommens JM, Iannuzzi MC, Karem BZ y col. Identification of the cystic fibrosis gene. Chromosome walking and jumping. Science, 1989;245:1059.
11. Moser H. Duchenne Muscular Dystrophy. Pathogenetic aspects and Genetic Prevention. Hum Genet, 1984;66:17.
12. Hoffman E, Kunkel LM. Dystrophin Abnormalities in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. Neuron, 1989;2: 1019.
13. Darras B, Francke U. Normal human restriction fragment patterns and polymorphism revealed by hybridization with the entire dystrophin cDNA. Am J Med Genet, 1988; 289: 713.
14. Chamberlain JS, Gibbs Ra, Ranier JE, Caskey CT. Multiplex PCR for the Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (eds). PCR Protocols. A guide to Methods and applications Academic, San Diego, 1990;272.
15. Lawn RM, Vohar GA. The molecular genetics of hemophilia. Sci Am, 1986;254:48.

COMENTARIO

SALVADOR ARMENDARES*

En la genética humana, como en muchas otras ramas de las ciencias médicas, el progreso académico y científico va de la mano y a veces precedido del desarrollo tecnológico.

* Académico titular

El trabajo de ingreso del doctor Hugo A. Barrera Saldaña a la Academia Nacional de Medicina es un excelente ejemplo del aserto anterior.

La habilidad de manipular el ADN *in vitro* tiene una espectacular aunque breve historia. En 1972 se generaron las primeras moléculas de ADN recombinante; en 1977 se clonó el primer gen en el hombre, el lactógeno placentario humano, y en 1978 se utilizó el análisis del ADN para hacer el primer diagnóstico clínico prenatal de la anemia de células en hoz. Para fines de 1987 se había desarrollado un mapa de enlace completo de los cromosomas humanos, y el diagnóstico a través del análisis del ADN se convirtió en el pilar para el consejo genético en más de veinte enfermedades monogénicas, entre las que se incluyen la enfermedad fibroquística y la distrofia muscular de Duchenne.

Todos estos avances se han apoyado en la especificidad del apareamiento de las bases del ADN y el descubrimiento de enzimas en bacterias (enzimas de restricción) las cuales cortan las moléculas de ADN de manera predecible. Esto, a su vez, ha permitido clonar fragmentos de ADN humano insertados en plásmidos bacterianos (o en bacteriófagos), los cuales después se hacen crecer en cultivos bacterianos para producir un alto número de copias de fragmentos específicos.

El que podríamos denominar "mapa genético humano" puede llegar a establecerse a través de varios procedimientos que se complementan unos a otros.

El análisis de los pedigríes puede establecer que un determinado trastorno se hereda como un rasgo autosómico o ligado al sexo. El siguiente paso es intentar identificar el *locus* o posición que ocupa en un cromosoma el gen mutante, ya que éste es un requisito para el mejoramiento del diagnóstico prenatal y la detección de los portadores del trastorno. Más aún, la localización o mapeo de una enfermedad monogénica en una región determinada de un cromosoma puede ser el primer paso hacia la clonación del gen y el descubrimiento de su función.

Con esas técnicas o procedimientos ha sido posible aumentar considerablemente el número de asignaciones en los diferentes cromosomas de los genes humanos. Hasta este momento se ha asignado con toda seguridad la localización cromosómica de más de 1500 genes autosómicos y 170 genes ligados al sexo. Esto representa alrededor de 37 por ciento de las características genéticas conocidas en el hombre.

En el trabajo del doctor Barrera se define a la medicina molecular como aquella parte de la biología molecular relacionada con las enfermedades hereditarias y con su diagnóstico, prevención y terapia; en él se describe la experiencia obtenida en ese campo en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

El doctor Barrera describe en forma clara y concreta las diferentes técnicas de la biología molecular y en particular las que se utilizan en su laboratorio para el diagnóstico de algunas enfermedades mendelianas a saber, la enfermedad fibroquística o mucoviscidosis, la cual es autosómica recesiva, así como otras dos ligadas al cromosoma X: la distrofia muscular y la hemofilia A. Las tres son enfermedades relativamente frecuentes.

La fibrosis quística tiene una frecuencia de 1 por cada 2,000 nacidos vivos en las poblaciones caucásicas, y el gen causante de la misma se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma número 7. Hasta el momento de la presentación se habían estudiado diez familias mexicanas afectadas y en siete de ellas se obtuvieron resultados informativos y útiles para el asesoramiento genético confiable.

La distrofia muscular ligada al cromosoma X tiene una frecuencia de 1 en cada 3,500 varones nacidos vivos. El gen responsable se ha localizado en la banda 21 del brazo corto del cromosoma X. En el laboratorio del doctor Barrera se han estudiado 24 familias con individuos afectados de distrofia muscular.

Por último, la hemofilia afecta a 1 de cada 5,000 varones

nacidos vivos y el gen se encuentra en la banda 28 de los brazos largos del cromosoma X. Se han estudiado diez familias con antecedentes de la enfermedad y de un total de 36 mujeres estudiadas 17 fueron informativas, es decir el 47 por ciento, lo que permitió establecer en seis de las familias la segregación de los cromosomas mutados.

Actualmente existen ya varios laboratorios en México que trabajan con las herramientas más modernas y adecuadas para el desarrollo de la medicina molecular. Esos avances permiten el diagnóstico preciso de muchas enfermedades hereditarias, el cual es esencial para el adecuado asesoramiento genético. Asimismo son de enorme utilidad para el diagnóstico prenatal de aquellos trastornos.

Es de desearse, como ya se ha indicado tanto a nivel nacional como internacional, el desarrollo de estudios colaborativos entre los diferentes grupos dedicados a la investigación y aplicación de la medicina molecular, mismos que permitan conocer en un futuro no lejano la localización de todos los genes relacionados con la patología del hombre, y posteriormente llegar a establecer el genoma humano completo, es decir, tener la asignación precisa de los 50,000 a 100,000 genes de la especie humana.

El presente número incluye una serie de ilustraciones aparecidas en algunos ejemplares de la *Gaceta Médica de México*. Fueron seleccionadas por lo interesante de su presentación y contenido, por el Sr. Alejandro Moreno, bibliotecario de la Academia Nacional de Medicina, las fotografías fueron tomadas por el Sr. Gerardo Soria y las notas explicativas elaboradas por el Dr. Emilio García Procel, ayudante del editor.

El interés por realizar estudios sobre las Cantáridas, radica en su capacidad de producir lesiones vesiculares, desconociéndose su forma de acción, su distribución geográfica y por lo tanto su cosecha para el "consumo" de las boticas de México. Interesaba sobremedera saber si alguna de estas Cantáridas podía producir vesiculación rápida sin "obrar" sobre la vejiga y examinar las propiedades terapéuticas de los medicamentos indígenas.

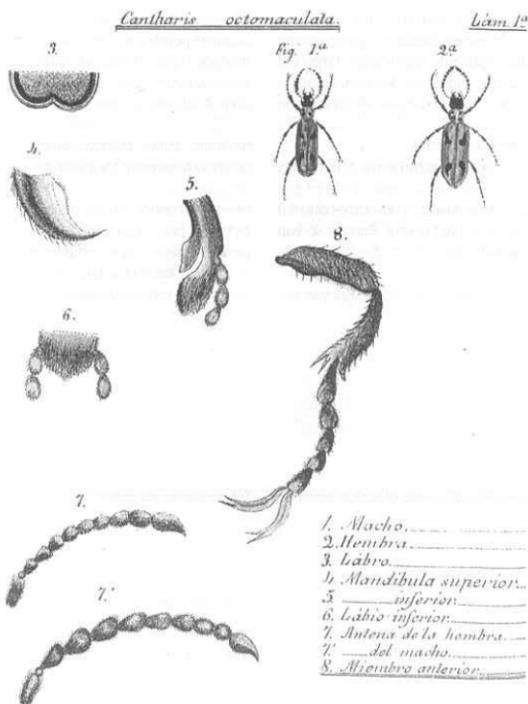


Ilustración del artículo "Estudio de dos especies de Cantáridas mexicanas", de los doctores Peñafiel y Barranco aparecido en *Gaceta Médica de México* el miércoles 1^o de agosto de 1866.

Este insecto se halla en los sembradíos de maíz y se le encontró cerca del Mineral del Chico y Atotonilco el Grande. El macho desarrollado, mide cerca de 22 mm. y la hembra 25 mm. aproximadamente. Puede recolectarse, con cierta facilidad, en el mes de septiembre, debido a su vuelo torpe. Su interés radica en las aplicaciones de emplastos usados en el siglo pasado.