Pediatr Catalana 1996; 56

Genètica molecular i pediatria (I): Conceptes bàsics i aplicacions diagnòstiques

Jaume Antich i José Miguel Carballo

Secció de Genètica. Hospital Universitari Sant Joan de Déu. Barcelona

Objectius formatius

Quin és l'origen molecular de les malalties genètiques?

Quines tècniques són aplicables al diagnòstic genètic molecular?

Quines aplicacions té el diagnòstic molecular en pediatria?

Quins altres mecanismes no mendelians hi ha d'herència?

Introducció

És important remarcar la creixent importància que té la genètica humana dins de les diverses disciplines mèdiques, que constitueixen la genètica mèdica. Si bé està relacionada amb la majoria de les especialitats mèdiques, és en la pediatria on es focalitza, o s'associa més íntimament. És suficient tenir en compte que les malalties genètiques constitueixen la tercera part dels ingressos hospitalaris en l'edat infantil i un 10% en l'edat adulta:

- els nounats vius presenten algun tipus de malformació genètica (un 0.5% per alteració cromosòmica; un 1.5% per malaltia hereditària)
- d'un 50% a un 60% dels avortaments són deguts a alteracions cromosòmiques.

El ràpid avanç de la genètica molecular en els darrers anys està contribuint a establir l'origen molecular de moltes malalties. Aquest origen es troba fonamentalment en el material genètic.

L'aplicació de noves metodologies a l'estudi de les malalties genètiques ha comportat la possibilitat d'analitzar els gens i les seves alteracions de manera que s'ha generat una «Revolució Genètica» o una «Nova Genètica».

Una aplicació immediata d'aquest coneixement és la possibilitat de fer un diagnòstic geneticomolecular, que no solament detecti els efectes sinó que permeti diferenciar els portadors heterozigots. Una de les metodologies que ha propiciat aquests avenços en l'àrea de la identificació de les malalties genètiques és la tècnica anomenada reacció en cadena de la polimerasa o PCR. L'estudi de l'origen molecular de les malalties genètiques està proporcionant, a més a més, el coneixement dels mecanismes moleculars que operen en el desenvolupament de la malaltia. Aquest coneixement serà fonamental en el de la investigació i desenvolupament de nous fàrmacs i teràpies.

Per tot això és important que el metge, i en especial el pediatre, disposi no solament d'uns coneixements bàsics que l'ajudin a comprendre, orientar, diagnosticar i prevenir una malaltia genètica, sinó també tenir un coneixement dels nous conceptes derivats dels avenços moleculars i de la seva repercussió en la patologia pediàtrica.

De cara a facilitar la seva comprensió, i per tant aconseguir els objectius formatius proposats, l'article es divideix en dues parts. En aquesta part seran tractats els aspectes relatius a l'origen molecular de les malalties genètiques i a les possibilitats actuals del diagnòstic genètic molecular en pediatria. En una segona part es farà un repàs als mecanismes coneguts responsables de patrons d'herència diferents del mendelià clàssic.

La informació genètica: estructura dels àcids nucleics

La informació genètica en els éssers vius es troba emmagatzemada en els àcids nucleics ADN i ARN. L'ordenament de les bases constitueix la seva seqüència i és el que determina l'especificitat de la informació genètica.

La naturalesa química de l'ADN és la d'un polímer format per monòmers que es diferencien entre ells per quatre bases nitrogenades: **adenina** (A), **citosina** (C) **guanina** (G) i **timina** (T). L'ordenament d'aquestes bases en la molècula de l'ADN constitueixen la seva seqüència, que determina l'especificitat de la

Correspondència:

Jaume Antich
Seeció de Genètica. Hospital Universitari Sant Joan de Déu
Carretera d'Esplugues, s/n. 08034 Barcelona

Treball rebut: 13.06.1996. Treball acceptat: 10.07.1996.

Antich J, Carballo JM.
Genètica molecular i pediatria (I): Conceptes bàsics i aplicacions diagnòstiques.
Pediatr Catalana 1996; 56: 215-223.

informació genètica. Les bases es troben a l'interior de l'esquelet sucre (desoxiribosa)-fosfat i s'uneixen, formant una doble hèlice amb les bases complementàries de la cadena oposada mitjançant interaccions químiques dèbils, com ponts d'hidrogen, forces de Van der Wals, interaccions hidrofòbiques. El caràcter d'aquestes unions és reversible, la qual cosa determina, juntament amb la complementarietat de bases, les propietats singulars del material genètic (Fig. 1).

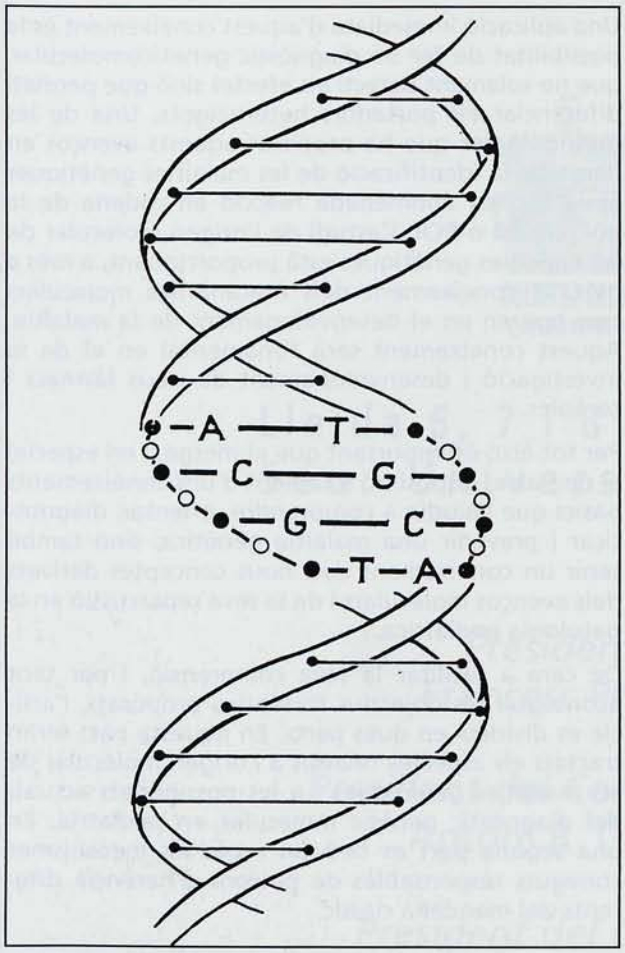

Fig. 1. Estructura en doble hèlice de l'ADN

L'**ARN** és també un polímer, format per monòmers de sucre (ribosa)-fosfat als quals s'uneixen tres bases nitrogenades idèntiques que en l'ADN (A, C i G) i una de diferent: **uracil** (U). La seva estructura és de cadena senzilla, a diferència de la doble fibra de l'ADN.

Organització de l'ADN cel·lular

L'ADN cel·lular s'organitza en els nuclis de les cèl·lules eucariotes en unes estructures anomenades cromosomes.

La major part de l'ADN cel·lular en els organismes eucariotes es troba en el nucli cel·lular (ADNn), en unes estructures anomenades **cromosomes**. En l'home, el nombre total de cromosomes és de 46. Dos d'ells, X i Y, s'anomenen **sexuals**; la resta està formada per 22 parells de cromosomes anomenats **autosomes**. La meitat de la dotació cromosòmica d'un individu és d'origen patern, mentre que l'altra meitat és d'origen matern.

Una petita fracció de l'ADN és l'**ADN mitocondrial** (ADNmt). Les mitocòndries posseeixen un genoma diferent del nucli de les cèl·lules. L'ADNmt és constituït per ADN circular de doble cadena, que conté més de 16.000 parells de bases, extremadament compacte, on figuren 37 gens desproveïts d'introns.

En l'home, el material genètic contingut a l'ADN s'estima que està format per $3x10^9$ parells de bases. Solament el 5% de l'ADN total conté informació relativa a la síntesi de proteïnes.

Estructura dels gens

Les unitat bàsiques de la informació genètica són els gens, que consisteixen en una seqüència de bases de l'ADN necessària per codificar l'estructura d'una proteïna determinada.

Els gens contenen unes regions, **exons**, que són transcrites en ARN missatger (ARNm) i traduïdes a proteïnes en els ribosomes. Entre els exons existeixen unes regions no codificants anomenades **introns**. En els extrems 5' i 3' dels gens hi ha uns triplets específics que determinen la **iniciació** (ATG) i la **terminació** (TAA, TAG, TGA) de la síntesi de la proteïna sobre l'ARNm. La regulació de l'expressió dels gens es localitza en seqüències específiques d'ADN. Així, la **regió promotora** regula la transcripció basal del gen, mentre que seqüències potenciadores *(enhancers)*, que de vegades poden estar situades a distància del gen, regulen la intensitat i especificitat de la transcripció d'un gen.

El nombre de gens estimats en l'home oscil·la entre 50.000 i 100.000. S'han descrit més de 5.000 malalties d'origen genètic citades el 1994 per McKusick en el seu llibre *Mendelian Inheritance in Man*, i solament se n'han localitzat gens responsables en el 10 per cent.

Codificació de la informació: codi genètic

Els aminoàcids es codifiquen a l'ADN per mitjà d'un triplet de nucleòtids.

Com que a l'ADN hi ha solament quatre tipus de bases i els aminoàcids que componen les proteïnes són en nombre de 20, fa falta una disposició ordenada de tres bases o **triplet** (4^3 = 64 triplets diferents

possibles) per definir un codi d'un aminoàcid. Cadascun d'aquests triplets s'anomena **codó**. Les relacions que hi ha entre els diferents tipus de triplets i els aminoàcids és el que constitueix el **codi genètic**. Existeixen uns codons ***stop***: UAA, UAG, UGA, que indiquen on s'ha d'acabar la traducció (Taula I). Alguns aminoàcids són codificats per més d'un triplet.

TAULA I
Codi genètic. Codons

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Sense sentit	UGA	Sense sentit
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Sense sentit	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

Transcripció-traducció de l'ADN

La informació genètica continguda a l'ADN es processa a la cèl·lula mitjançant els mecanismes de transcripció-traducció.

L'estructura de l'ADN en doble fibra permet l'emmagatzemament i la transmissió de la informació genètica d'una cèl·lula a una altra mitjançant el procés anomenat **replicació**. Tanmateix, el processament funcional de la informació genètica no es pot fer directament per la molècula d'ADN. Aquest processament requereix un procés anomenat transcripció i una altre anomenat traducció.

Mitjançant el procés de **transcripció** en el nucli cel·lular s'origina una cadena senzilla d'àcid nuclèic complementària, l'**ARN missatger** (ARNm) a partir d'una de les dues cadenes d'ADN de doble hèlice. Primer es forma l'ARNm precursor que conté la seqüència completa d'exons i introns del gen. A continuació tenen lloc una sèrie de processos pels quals els introns són eliminats i els exons es relliguen de forma precisa per formar l'**ARN madur**. Aquest procés s'anomena *splicing* o **escissió**. L'ARNm deixa el nucli i s'associa als ribosomes en el citoplasma, on es tradueix en proteïna. L'**ARN de transferència** s'alinia amb els aminoàcids al llarg de l'ARNm utilitzant tres bases del codi genètic per transformar la seqüència d'àcid nuclèic en proteïna (Fig. 2).

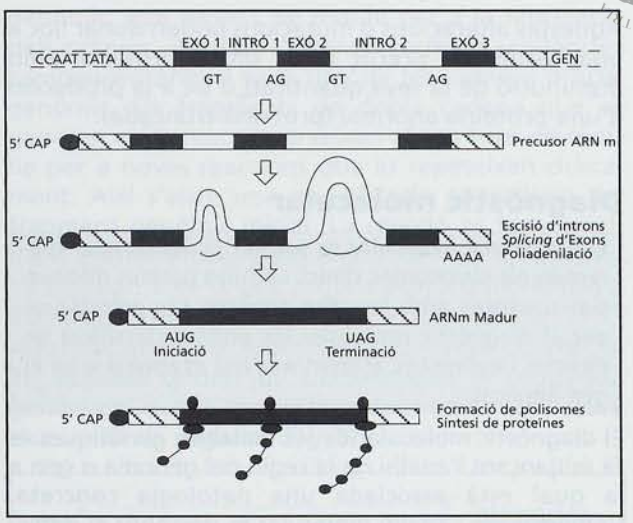

Fig. 2. Estructura del gen i síntesi de proteïnes

Mutacions

Les alteracions dels gens com a conseqüència de canvis o mutacions serien les responsables de moltes malalties genètiques. S'entén per mutació qualsevol canvi en la seqüència de l'ADN.

S'han descrit diversos tipus de mutacions. Els principals tipus de mutacions són els següents:

a) deleció d'una regió cromosòmica que contingui un o més gens

b) deleció d'un o més exons

c) duplicació d'una part d'un gen

d) inserció d'ADN d'un altre punt del genoma humà

e) mutació puntual que afecta una sola base o bé delecions o insercions molt petites. Dins de les mutacions puntuals, cal distingir al seu torn:

- mutacions sense sentit (*missense mutations*) que substitueixen un aminoàcid per un altre en el producte gènic
- mutacions falses (*nonsense mutations*) que canvien el significat d'un codó. Reemplacen l'aminoàcid d'un codó per un codó stop.
- mutacions del *splicing* (de l'escissió), que es refereixen als canvis dels punts d'escissió d'exons-introns.

f) canvis del marc de lectura (*frameshift mutations*) que es poden produir per deleccions, insercions o errors en el splicing

g) mutacions expansives que corresponen a canvis en el nombre de repeticions de triplets (seqüències curtes d'ADN repetitives i polimòrfiques) de tal manera que se supera el polimorfisme i afecta l'expressió normal d'un gen bo i donant lloc a manifestacions clíniques.

Aquestes alteracions o mutacions poden donar lloc a una terminació precoç de la síntesi proteica (amb disminució de la seva quantitat) o bé a la producció d'una proteïna anormal (proteïna truncada).

Diagnòstic molecular

El diagnòstic molecular es pot fer ja abans que apareguin els símptomes clínics i alhora permet diferenciar trastorns amb fenotips similars. Les estratègies per al diagnòstic molecular les podem classificar en directes i indirectes, atenint-nos a si es coneix o no el gen implicat.

El diagnòstic molecular de les malalties genètiques es fa mitjançant l'anàlisi de la regió del genoma o gen a la qual està associada una patologia concreta. L'objectiu de l'anàlisi molecular és descobrir el defecte genètic que indueix la malaltia. Aquest defecte es pot presentar en alguns casos com una deleció d'una regió de l'ADN, una duplicació o una inserció de material genètic, que pot afectar un o més gens. Depenent de la mida, aquestes anomalies genètiques es diagnostiquen també mitjançant tècniques citogenètiques convencionals, d'alta resolució, o bé per tècniques citogenèticomoleculars (*hibridació in situ*).

Hi ha dos mètodes d'anàlisi genotípica: mètodes indirectes i mètodes directes. L'estratègia a seguir per fer el diagnòstic d'una malaltia genètica dependrà del grau de coneixement del gen implicat en ella. En alguns casos, sigui per la mida del gen implicat o perquè el gen responsable de la malaltia encara no està ben caracteritzat, s'ha de procedir a l'anàlisi molecular indirecta, per mitjà de marcadors indirectes, o polimorfismes. En els casos en què el coneixement i la mida del gen ho permetin es farà l'anàlisi directa de mutacions, que posen de manifest la mateixa mutació.

TAULA II
Procedència dels àcids nucleics

Postnatal
Sang perifèrica (leucòcits)
Fibroblasts
Línies trofoblàstiques
Teixit tumoral
Cèl·lules mucosa bucal
Taques de sang (test de Guthrie)
Arrel cabell
Peça fixa per a examen anatomopatològic
Mòmies
Prenatal
Trofoblast (8a-10a setmanes)
Amniòcits
En directe (15a-17a setmanes)
Cultivats (20 setmanes)

Anàlisi de l'ADN genòmic humà

Es pot obtenir ADN genòmic a partir de qualsevol teixit. A la Taula II s'exposa l'origen divers dels àcids nucleics per a l'anàlisi genotípica.

Anàlisi indirecta de mutacions

Aquesta consisteix en la utilització de marcadors d'ADN com els fragments de restricció polimòrfica (RFLP) o l'ús de microsatèl·lits, per poder identificar l'al·lel portador de la mutació i estudiar la seva segregació en la família. El diagnòstic no pot ser en aquest cas directe i la seva exactitud dependrà de com es trobin de lligats els marcadors utilitzats i la seva mutació causant de la malaltia.

Per poder fer un estudi genètic molecular indirecte d'una determinada malaltia cal disposar d'una sonda adequada, que permeti detectar el gen responsable, o bé d'uns marcadors genotípics pròxims al gen.

Les sondes genètiques consisteixen en seqüències d'àcid nuclèic, ADN o ARN d'almenys 20 nucleòtids, homòlogues a una seqüència cel·lular d'ADN o ARN que s'hibrida amb ella mateixa, bo i tenint lloc un aparellament entre bases complementàries. Hi ha dos tipus de sondes: a) sondes directes (sondes d'ANDc, fragments d'ADN genòmic, ribosondes, oligosondes de síntesi i seqüències d'AND estrany; b) sondes indirectes, que consisteixen en fragments d'ADN procedents dels bancs d'ADN genòmic. S'utilitzen quan el gen que es vol explorar encara no s'ha clonat o bé quan es desconeix. Es coneixen els polimorfismes de restricció o RFLP (*Restriction Length Polymorphism*) i els polimorfismes de repetició deguts a diferències en el nombre de còpies de seqüències repetides en tàndem: aquests són els minisatèl·lits o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats* i els microsatèl·lits o STR (*Short Tandem Repeats*).

Anàlisi de l'ADN genòmic pel mètode Southern

Aquest mètode es fa servir quan no es pot fer una anàlisi directa de mutacions o per caracteritzar grans delecions o insercions genòmiques.

Els passos de què consta són:

- en primer lloc l'ADN genòmic és fragmentat per mitjà dels enzims de restricció apropiats
- a continuació els fragments són separats per electroforesi en un gel d'agarosa (els gels d'agarosa són útils per separar fragments de 100 i 25.000 pb)
- desnaturalització in situ
- transferència de l'ADN separat per electroforesi a una membrana de niló o de nitrocel·lulosa

- hibridació amb una sonda marcada i d'una sola cadena

La hibridació consisteix en la recerca de la seqüència per complementarietat i cal fer-ho en material resistent; per això cal transferir-ho.

El o els fragments reconeguts per la sonda formen amb aquests un dúplex i mostren un senyal persistent a nivell del filtre, visible per autoradiografia.

El mètode Southern permet detectar:

- deleccions completes
- deleccions parcials
- polimorfismes de restricció

El mètode Southern té els inconvenients de tractar-se d'un mètode llarg, complex, costós en reactius, i requereix personal especialitzat, i especialment és poc susceptible a l'automatització. Igualment són nombroses les dificultats d'interpretació, i també la presència d'artefactes. Així s'explica que hagi perdut el seu paper important amb l'aparició del mètode de la PCR.

Reacció en cadena de la polimerasa o PCR

El diagnòstic directe de les mutacions ha estat revolucionat pel mètode de la PCR. Les mutacions que afecten una sola base d'un gen o mutacions puntuals poden induir el canvi d'un aminoàcid en la cadena peptídica de la proteïna per a la qual codifiquen. Aquest canvi pot ser suficient per modificar la funció fisiològica de la proteïna i menar al desenvolupament d'una malaltia. Sembla evident que l'anàlisi del canvi específic d'una base en un genoma de $3x10^9$ bases no es pot fer de manera directa. Tanmateix, mitjançant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa o PCR, es pot amplificar un fragment discret específic d'ADN de més de 10^6 vegades i analitzar-se la presència d'un canvi de base.

La PCR és una tècnica potent, que permet amplificar qualsevol segment d'ADN, seleccionat a base de dirigir-li dos oligonucleòtids, d'unes 20 bases cadascun, complementaris als extrems en cada una de les cadenes i orientats de forma que els seus extrems 3' es dirigeixin l'un vers l'altre.

Aquests oligonucleòtids s'anomenen *primers* en la terminologia anglosaxona i *amorces* en la francesa. En la nostra llengua se'ls coneix com a encebadors, si bé el terme de *primers* s'ha generalitzat a tots els laboratoris de genètica molecular.

Es basa en la utilització d'un enzim l'ADN polimerasa específica obtinguda de termòfils (Taq polimerasa). La polimerasa copia l'ADN i estén els *primers* complementaris a una part del gen.

El primer pas del procés de PCR consisteix en desnaturalització o obertura de la doble cadena de l'ADN genòmic, que serveix de motlle per a la hibridació dels *primers*. Aquests s'estenen formant seqüències complementàries a cada una de les cadenes d'ADN genòmic. Els fragments de doble cadena que es generen en la reacció serveixen al seu torn de motlle per a noves reaccions que es repeteixen cíclicament. Així s'obté una amplificació en cadena del fragment genòmic inicial. La reacció es fa normalment en tres etapes que consisteixen en una desnaturalització a 95°C, una segona etapa d'hibridació a 40-70°C i una tercera etapa d'extensió a 72°C. Aquestes etapes es repeteixen cíclicament entre 20-40 vegades (cicles) de manera que la seqüència genòmica inicial resultarà amplificada de l'ordre d'un milió de vegades (Fig. 3).

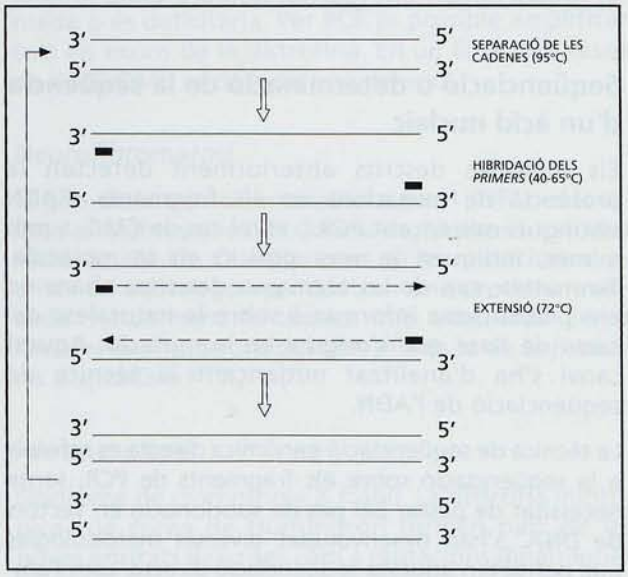

Fig. 3. Esquema de la PCR. La seqüència es dobla a cada cicle

El mètode, batejat per l'abreviatura PCR (de *Polymerase Chain Reaction*), fou ideat per K. Mullis el 1985 (dels Laboratoris Cetus). És simple de portar a terme, ja que no necessita cap altra manipulació que les variacions tèrmiques, bo i fent totes les reaccions en un mateix tub. La simplicitat d'aquesta tècnica ha permès la seva automatització. Tots els cicles es poden fer amb el mateix tub, en presència dels oligonucleòtids o *primers*, dels nucleòtids precursors i de l'enzim. És suficient aplicar d'una manera programada una sèrie d'oscil·lacions tèrmiques, desnaturalització, hibridació i extensió o polimeralització. Gràcies a la seva simplicitat i també a la seva universalitat ha aconseguit un lloc preponderant dins de la biologia molecular. Permet no solament amplificar a voluntat una zona diana sinó també una sonda, per la qual cosa el mètode de la PCR constitueix el mètode d'elecció per a l'anàlisi genotípica, bo i desplaçant la clàssica Southern-blot. Les àrees d'aplicació de la PCR són innombrables i concernents en particular en tots els aspectes de la biologia molecular aplicada a la medicina.

Anàlisi de deleccions genòmiques

L'anàlisi electroforètica directa dels fragments de PCR permet visualitzar de vegades deleccions o inserccions que es produeixen en el gen que s'analitza.

Anàlisi de mutacions puntuals

La tècnica de PCR és la base per a la detecció de mutacions puntuals en un gen. A partir dels fragments d'ADN, obtinguts per PCR, s'utilitzen diferents tècniques d'anàlisi directa de mutacions: 1) Anàlisi conformacional de cadena senzilla, SSCP; 2) Anàlisi mitjançant electroforesi amb gradients desnaturalitzants, DGGE; 3) Anàlisi d'heterodúplex, HA; 4) Anàlisi mitjançant reactius químics, CMC.

Seqüenciació o determinació de la seqüència d'un àcid nucleic

Els mètodes descrits anteriorment detecten la presència de mutacions en els fragments d'ADN obtinguts mitjançant PCR i, en el cas de CMC, a més a més, indiquen la seva posició en la molècula. Tanmateix, cap de les tècniques descrites abans no ens proporciona informació sobre la naturalesa del canvi de base que s'origina en la mutació. Aquest canvi s'ha d'analitzar mitjançant la tècnica de seqüenciació de l'ADN.

La tècnica de seqüenciació genòmica directa es refereix a la seqüenciació sobre els fragments de PCR, sense necessitat de passar pel pas de subclonació en vectors de DNA. S'han desenvolupat diverses metodologies que permeten aquesta seqüenciació directa, com l'amplificació PCR asimètrica, en la qual una de les cadenes s'obté en excés i, després de la posterior separació, serveix de motlle per a la seqüenciació. D'altres mètodes empren com a motlle la doble cadena del fragment de PCR i mitjançant l'ús d'un matiex encebador utilitzat en l'amplificació s'obtenen les seqüències per mitjà de la tècnica de terminació amb dideòxids de Sanger. L'ús d'encebadors marcats en 5' amb derivats nucleòtids com ara biotina o digoxigenina, permeten realitzar el procés de seqüenciació sense fer servir mètodes isotòpics. A més, la introducció de polimerases termoestables en els mètodes de seqüenciació permet obtenir seqüències de petites quantitats d'ADN.

S'han desenvolupat equips que analitzen automàticament la seqüenciació de l'ADN amb una gran precisió. A més, la introducció de derivats nucleòsids amb diferents grups fluorescents, permet realitzar simultàniament les quatre reaccions de seqüenciació (A, C, T i G) en un mateix tub, i carregar-se en un mateix carril d'un gel. Els detectors automàtics són capaços d'identificar i d'interpretar les seqüències.

El mètode de seqüenciació és el més fiable i exacte per detectar mutacions. Tanmateix, la complexitat manual i d'execució, i també el limitat nombre de nucleòtids 250-300 que es poden llegir amb garanties en una seqüenciació manual, impedeixen que aquesta tècnica s'usi com a rutina en la detecció de mutacions i es reservi com a pas final per a la caracterització de mutacions detectades per les altres tècniques descrites abans. Els mètodes automàtics de seqüenciació faciliten aquestes operacions, però tenen un elevat cost econòmic.

Aplicacions de la PCR en el diagnòstic genètic

Amb el coneixement i la tecnologia de què es disposa actual es poden analitzar diversos gens que estan relacionats amb patologies diverses. L'amplificació específica de seqüències genòmiques per mitjà de la PCR és aplicable al diagnòstic d'una àmplia varietat de malalties genètiques.

Pel seu interès i la seva importància hem de destacar algunes de les aplicacions de la PCR en el diagnòstic genètic.

Detecció d'heterozigots

La detecció d'heterozigots consisteix a determinar la constitució genètica per mitjà de l'anàlisi de l'ADN dels individus ja nascuts. Les indicacions del diagnòstic genotípic de l'heterozigòtic està especialment indicada en: portadors sans però susceptibles de transmetre la malaltia, en especial per als trastorns recessius lligats al cromosoma X, i detectar possibles portadors, com per exemple en l'hemofília, distròfia muscular de Duchenne/Becker. També en els casos de malalties autosomicodominants; per exemple, l'hipercolesterinèmia familiar, la distròfia miotònica de Steinert, la corea de Huntington, la poliquistosi renal autosòmica dominant, el retinoblastoma, i també en les malalties autosòmicorecessives, com en la fibrosi quística.

Diagnòstic prenatal

Per dur a terme el diagnòstic prenatal, l'ADN fetal es pot obtenir a partir de les vellositats corials (trofoblast) o de les cèl·lules amniòtiques (amniòcits). Així, es pot arribar al diagnòstic de trastorns com ara: fibrosi quística (anàlisi de les mutacions específiques del gen CFTR); hemofília A; alfa-talassèmia (delecions gèniques); beta talassèmia (mutacions del gen de la betaglobina); anèmia drepanocítica; dèficit de l'alfa-antitripsina; distròfia muscular de Duchenne.

Diagnòstic postnatal

Les malalties genètiques analitzades fins a la data per mitjà de la PCR són molt nombroses, i van augmentant contínuament (Taula III). Comentarem breument algunes d'aquestes aplicacions:

TAULA III
Malalties hereditàries diagnosticables per PCR

Dèficit d'alfa-1-antitripsina
Fibrosi quística (gen CFTR)

Trastorns hematològics
- dèficit d'antitrombina
- malalties dels gens de l'hemoglobina (Hb) (hemofília A i B, drepanocitosi, talassèmies)
- dèficit cofactor heparina
- persistència Hb fetal
- malaltia de von Willebrand
- disfibrinogenèmia
- eliptocitosi

Metabolopaties
- fenilcetonúria
- malaltia de Gaucher
- malaltia de Tay-Sachs
- malaltia de Sandhoff
- síndrome de Lesch-Nyham
- malaltia del xarop d'erau
- dèficit d'ornitina transcarbamilasa
- hipercolesterinèmia familiar

Trastorns dels gens del col·lagen
- osteogènesi imperfecta
- síndrome d'Ehler-Danlos
- síndrome d'Alport

Trastorns oftalmològics
- retinosi pigmentària
- degeneració macular

Trastorns neurològics
- distròfia muscular de Duchenne/Becker

Dèficit sever de l'alfa-1-antitripsina

En general és degut a la mutació GAG---AAG a l'estat homozigot en el codó 342 del gen alfa-1-AT.

Beta-talassèmies

El gen de la betaglobina està localitzat en el cromosoma 11 i s'han descrit més de 60 mutacions en el gen de les globines. Hi ha mutacions dels exons i dels introns que poden alterar el «splicing» o alterar el marc de lectura i en conseqüència s'altera la transcripció.

Hemofília A

L'hemofília A per anomalies del factor VIII de la coagulació. Trastorn recessiu lligat al X i localitzat en el cromosoma X, en Xq28.

Fibrosi quística

El gen de la fibrosi quística o CFTR es troba localitzat en el cromosoma 7 a nivell de 7q31. S'han descrit més de 200 mutacions, i són les més freqüents en el nostre medi la F508 i la Y542X. La mutació ΔF508 es troba en un 70% de la població espanyola. Aquesta mutació es caracteritza per una deleció de 3 nucleòtids en l'exó 10 i desapareix l'aminoàcid fenilalanina. La seva detecció té l'interès per a un diagnòstic postnatal en els casos de gravetat vital; per exemple, en el cas d'un ili meconial i també quan la taxa de clor sudoral no és contributiva. També mostra el seu interès en el diagnòstic prenatal.

DMD/DMB

El gen de la distròfia muscular és el més gran de tots els gens coneguts. Té una grandària de 2.500 kb i es localitza en els braços curts del cromosoma X, a nivell de Xp21. conté 79 exons i codifica una proteïna anomenada distrofina. En la DMD la distrofina és absent, mentre que en la DMB la distrofina és disminuïda o és deficitària. Per PCR és possible amplificar tots els exons de la distrofina. En un 60% dels casos de DMD/DMB es detecta una deleció.

Neurofibromatosi

El gen de la neurofibromatosi tipus 1 (NF1) es localitza al cromosoma 17. Consta de 59 exons i té una mida de 350 kb. La major part de les mutacions descrites en aquest gen produeixen una proteïna truncada. Actualment la tècnica més adequada per a l'anàlisi de mutacions del gen NF1 és la de la proteïna truncada o PTT.

Altres entitats

Síndrome de cromosoma X fràgil. La distròfia miotònica i la corea de Huntington formen part de les noves entitats descrites com a mutacions dinàmiques i que cursen amb expansió de repeticions de triplets.

Diagnòstic de síndromes malformatives

A les Taules IV, V, VI i VII s'exposen una sèrie de síndromes que cursen amb alteracions facials i en les quals ja s'ha localitzat el gen i en algunes d'elles s'ha clonat el gen.

Diagnòstic preimplantació

El diagnòstic preimplantació de les malalties hereditàries és avui en dia una realitat amb les tècniques de fertilització in vitro. Es fa una biòpsia de blastòmer de l'embrió de 6-8 cèl·lules i l'anàlisi de l'ADN d'una única cèl·lula. Aquests mètodes permeten la transferència selectiva d'embrions no afectes de parelles amb alt risc genètic. La PCR permet l'ampliació de seqüències específiques d'una cèl·lula única per detectar mutacions per mitjà de la digestió amb enzims de restricció, formació d'heterodúplex o hibridació amb al·lels d'oligonucleòtids específics (ASO).

TAULA IV
PCR i diagnòstic genètic en síndromes polimalformatives: craniosinostosi i displàsies òssies

Síndrome	Gen	Locus
Craniosinostosi		
craniosinostosi tipus Adelaide		4p16
craniosinostosi tipus Boston	MSX2	5q34-ter
acrocefalosindactília Saethre-Chotzen		7p21
síndrome de Pfeiffer	FGFR1	8p11
síndrome de Crouzon	FGFR2	10q25-26
sídrome d'Apert	FGFR2	10q25-26
síndrome de Jackson-Weiss	FGFR2	10q25-26
Displàsies òssies		
acondroplàsia (ACH)	FGFR3	4p16
displàsia campomèlica (CMPP)	SOX9	17q24-925
osteocondrodisplàsia (OCD)	COL11A2	6p
displàsia diastròfica (DTP)	DTP	5q33-935
displàsia tenafòrica (TDP)	FGFR3	4p16

TAULA V
PCR i diagnòstic genètic en síndromes polimalformatives: defectes neurològics i malformacions cerebrals

Síndrome	Gen	Locus
holoprosencefàlia tipus 2		2q21
síndrome de Lange		3q26
holoprosencefàlia tipus 3		7q36
síndrome de Prader-Willi		15q11
síndrome Angelman		15q11
lissencephalia tipus Miller-Dieker		17p13
holoprosencefàlia		21q22
síndrome Opitz		22q11
síndrome Opitz		Xp22
alpha talassèmia-retard mental (ATRX)	XNP	Xq12-21
síndrome Borjeson-Forssman-Lehmann		Xq26-27
fràgil X, RM lligat al X	FMR1	Xq27-28
paraplègia espàstica (SPGI) MASA,	L1CAM	Xq28
atròfia muscular espinal (SMA)	SMA	5q13

La identificació de la mutació específica amb la determinació del sexe de l'embrió permet la detecció de trastorns recessius lligats al X

Diagnòstic citogeneticomolecular

Hi ha una sèrie de síndromes degudes a microdelecions de gens contigus en les quals és possible el diagnòstic genotípic per mitjà de marcadors d'ADN. Solament n'enumerarem algunes:

- síndrome de Langer-Giedon
- síndrome WAGR
- síndrome de Miller-Dieker

TAULA VI
PCR i diagnòstic genètic en síndromes polimalformatives: anomalies congènites múltiples

Síndrome	Gen	Locus
Van der Woude		1q32-41
síndrome Waardenburg tipus 1	PAX3	2q37
síndrome Waardenburg tipus 2	MITF	3p12-14
blepharophimosis/ptosis/epicanthus/inversus		3q22-33
síndrome Treacher Collins	Treacle	5q32-23
síndrome Rieger		4q25-27
cephalopolysyndactyly de Greig	GII3	7p32
síndrome Smith-Lemli-Opitz	7-DHC*	7q32
síndrome Cohen		8q22-23
síndrome Langer-Giedion/TRP		8q24
síndrome nevoide carcinoma cel. basals		9q22-31
adenomatosi endocrina múltiple (MEN) 2B	RET	10q11
síndrome Beckwith-Wiedeman (EMG)		11p15
síndrome Rubinstein-Taybi	CBP	16p13
chondrodisplasia punctata	ARSE	Xp22
síndrome Coffin-Lowry		Xp22
síndrome Aarskof (displàsia faciogenital)	FGD1	Xp11
displàsia anhidròtica ectodermàtica		Xq12-13
síndrome Simson-Golabi-Behmel	GPC3	Xq25-27
síndrome oto-palato-digital (Tayby)		Xq28

* 7-DHC = 7-dehidrocolesterol reductasa

TAULA VII
PCR i diagnòstic genètic en síndromes d'envelliment prematur

Síndrome	Gen	Locus cromosòmic
síndrome Cockayne	ERCC3	2q21
síndrome Cockayne tipus I	CKN1	5
síndrome Werner		8p12
síndrome Cokayne tipus II	ERCC6	10q11
síndrome Cockayne	ERCC5	13q32-33
síndrome Bloom	BLM	15q26.1

- síndrome de DiGeorge
- síndrome de Prader-Willi
- síndrome d'Angelman
- síndrome de Williams

Diagnòstic d'anomalies de l'ADN mitocondrial

Es coneixen algunes alteracions de l'ADN mitocondrial, com ara mutacions puntuals i reestructuracions complexes:

- en l'atròfia òptica de Leber (síndrome LHON)
- síndrome MERRF (epilèpsia mioclònica i fibres musculars roges)

- síndrome MELAS (miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidosi làctica i accidents vasculars)
- síndrome Kearn-Sayre
- síndrome Pearson

Diagnòstic molecular de malalties poligèniques

- malalties lligades al sistema HLA: poliartritis reumatoide, lupus eritematós disseminat, diabetis juvenil insulinodependent, etc.
- altres malalties, com ara diabetis tipus I, diabetis tipus II, diabetis *MODY*, hipertensió arterial essencial, al·lèrgia)

Diagnòstic genotípic en oncologia

En una altra àrea en què la Biologia Molecular ha experimentat un enorme desenvolupament ha estat en el camp de la biologia tumoral. El coneixement dels oncogens P53 i dels gens APC i BRCA, són els exemples de més interès en l'actualitat.

El gen P53 es localitza en el cromosoma 17 amb una mida d'unes 20 kb. Consta d'11 exons que codifiquen una proteïna de 393 aminoàcids. El caràcter principal de la proteïna és el d'unir-se a l'ADN bo i exercint una funció supressora.

Múltiples tipus de càncer mostren mutacions en el gen P53, principalment a la regió que s'estén de l'exó 4 al 8.

El gen APC (adenomatosus poliposis colli) és un oncogèn que es localitza en el cromosoma 5q21-q23. És un gen de gran mida, d'unes 300 kb, i posseeix 15 exons. Les mutacions del gen APC són responsables de la forma de poliposi rectocòlica familiar. Probablement hi intervenen d'altres oncogens com ara K-RAs, p%3.

El gen BRCA1 localitzat en el cromosoma 17 a nivell de 17q21 i el gen BRCA2 localitzat a 13q12. El gen BRCA1 és un gen molt gran, mentre que el gen BRCA2 és molt més gran. Les mutacions en el gen BRCA1 són responsables del 50% dels càncers de mama i del 85% dels càncers de mama i ovari. El BRCA2 predisposa al càncer de mama. La possibilitat de desenvolupar un tumor si s'ha heretat la mutació és d'un 87%.

Bibliografia

1 Eisentein B. The polymerase reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 1990; 322: 178-183.

2 Kristjansson K, Chong SS, Vanden Veyver IB, Subramanian S, Snabes MC, Hughes MR. Preimplantation single cell analyses of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. Nature Genet 1994; 6: 19-23.

3 Lacombe D. Clínical dysmorphology beyond developmental genetics: recent advances in some human developmental genes. Ann Genet 1995; 38: 137-144.

4 Lynch JR, Brown JM. The polymerase chain reaction: current and future clinical application. J Med Genet 1990; 27: 2-7.

5 McKusick VA. Catalog of Autosomal Dominant, Recessive and X-linked phenotypes. 11a edició. Baltimore: The John Hopkins University Press 1994.

6 Muenke M. Finding genes involved in human developmental disorders. Curr Opin Genet Dev 1995; 5: 354-361.

7 Mullis K, Faloona T. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. Meth Enzymol 1987; 155: 335-351.

8 Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98 :503-517.