

N.º 131
2 E.J.



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

DIAGNOSTICO PRENATAL DE ALGUNAS ALTERACIONES
GENETICAS HUMANAS



EXAMEN DE PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Trabajo Monográfico de Actualización
Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a
GILBERTO REYES LEAL



1 9 9 2

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DIAGNOSTICO PRENATAL DE ALGUNAS ALTERACIONES
GENETICAS HUMANAS**

CONTENIDO

ABREVIATURAS	iii
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES METODOLOGICOS PARA EL DIAGNOSTICO PRENATAL.	6
RADIODIAGNOSTICO	6
ULTRASONOGRAFIA	8
FETOSCOPIA.	11
AMNIOCENTESIS.	15
MUESTREO DE VELLOSIDADES CORIONICAS.	18
AVANCES METODOLOGICOS EN EL DIAGNOSTICO PRENATAL.	22
TECNOLOGIA DE ADN RECOMBINANTE..	22
ENZIMAS DE RESTRICCION.	23
ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA..	25
TRANSFERENCIA DE SOUTHERN.	27
SONDAS MOLECULARES	30
MARCADO DE SONDAS MOLECULARES.	32
HIBRIDACION MOLECULAR.	34
AUTORADIOGRAFIA.	35
POLIMORFISMOS DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCION.	37

METODOS	41
OBTENCION DE VELLOSIDADES CORIONICAS.. . . .	41
OBTENCION DE ADN..	46
ELECTROFORESIS..	49
MARCADO RADIOACTIVO DE SONDAS MOLECULARES "TECNICA DE RANDOM PRIMER EXTENSION"	51
HIBRIDACION Y LAVADO.	54
AUTORADIOGRAFIA.	56
EJEMPLOS DE ALGUNOS DESORDENES GENETICOS DIAGNOSTICADOS CON TECNOLOGIA DE ADN RECOMBINANTE.	57
DIAGNOSTICO PRENATAL DE FENILCETONURIA CLASICA..	57
DIAGNOSTICO PRENATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS. . .	65
DIAGNOSTICO PRENATAL DE ANEMIA DE CELULAS FALCIFORMES	71
DIAGNOSTICO DE LA DEFICIENCIA DE ORNITIN TRANSCARBAMILASA..	76
DIAGNOSTICO PRENATAL DE LA COREA DE HUNTINGTON	84
DIAGNOSTICO PRENATAL DE LA DEFICIENCIA DE LA α -1-ANTITRIPSINA..	90
CONCLUSIONES.	95
COMENTARIOS	98
REFERENCIAS	100

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Acido desoxirribonucléico
ADNc	Acido desoxirribonucléico complementario
ARN	Acido ribonucléico
ARNm	Acido ribonucléico mensajero
cM	Centimorgans
dCTP	Desoxicitidín 5-trifosfato
EDTA	Acido etilén diaminotetra acético
FCU	Fenilcetonúrico
Hb	Hemoglobina
OTC	Ornitín transcarbamilasa
RFLP	Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción

DIAGNOSTICO PRENATAL DE ALGUNAS ALTERACIONES GENETICAS HUMANAS.**INTRODUCCION.**

Indiscutiblemente, el diagnóstico prenatal es un aspecto importante de la práctica de la genética humana. A principios de los años sesentas las únicas técnicas posibles para el diagnóstico prenatal de algunas alteraciones fueron la exploración física y la radiología. En los años setentas, el ultrasonido y la amniocentesis durante el segundo trimestre del embarazo hacen su aparición y con la aplicación de técnicas citogenéticas es posible detectar anomalías cromosómicas en el feto. Además, con el uso de una amplia variedad de técnicas bioquímicas sobre el líquido amniótico, es posible detectar defectos metabólicos hereditarios. En los años ochentas entra en uso la biopsia coriónica como una fuente más de material diagnóstico. Dicho material se obtiene durante el primer trimestre del embarazo, constituyendo así un progreso considerable en cuanto a tomas de muestras para estudios clínicos (Evans, 1986).

En la última parte de este siglo se han desarrollado grandes avances en el área de la biología celular, biología molecular, bioquímica, citogenética e inmunología,

lo cual ha abierto nuevas vías de análisis para el diagnóstico prenatal. Una buena cantidad de las enfermedades humanas son atribuidas directa o indirectamente a nuestra herencia y gracias a los avances modernos, es ahora posible detectar una gran variedad de enfermedades durante el desarrollo fetal (Evans, 1986).

En el pasado eran tan desconocidos los aspectos prenatales que no se podía preveer el nacimiento de un niño portador de una malformación o de una enfermedad hereditaria. El nacimiento de un niño anormal se consideraba como una fatalidad y así se desarrollaba un sentimiento de culpabilidad, ya que se descubría en las familias una tara que por desgracia se transmitía con cierta frecuencia a la descendencia; la medicina no podía predecir prácticamente nada en torno a este tipo de problemas y el aborto, aún el terapéutico, no podía siquiera contemplarse. Las parejas renunciaban a procrear o, confiando en el destino, vivían con la esperanza de que el siguiente producto sería normal (Odile, 1985).

Las enfermedades genéticas frecuentemente tienen su origen en la transmisión de un material hereditario defectuoso en el momento de la concepción, por ingesta de fármacos citotóxicos o mutagénicos o por infecciones virales durante la gestación (Thompson y Thompson, 1973).

Desde que la patología infecciosa y las alteraciones

de la desnutrición han sido erradicadas de los países industrializados, las malformaciones congénitas y las enfermedades genéticas han acentuado su presencia, tanto en cifras de mortalidad como de morbilidad, especialmente durante el primer año de vida (Galjaard, 1986).

Se ha observado que después de realizados los estudios genéticos, gran proporción de parejas a las cuales se les informa acerca del alto riesgo genético, abandonan la idea del embarazo y optan por una adopción. Aún más, para muchas parejas, la posibilidad de un diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas es muy importante puesto que abre la posibilidad del aborto terapéutico en caso de que se demuestre que el feto está afectado (Odile, 1985; Turnbull y MacKenzie, 1983).

Hasta la fecha, las aberraciones cromosómicas, el sexo fetal y unos ochenta errores del metabolismo pueden ser diagnosticados por análisis de células fetales durante el segundo trimestre del embarazo (Galjaard, 1986).

Recientemente, se ha dado un paso muy importante con la introducción del muestreo de vellosidades del corion y su análisis bioquímico y citogenético directo. Alrededor de la octava semana de embarazo se puede obtener una muestra de 5 a 15 mg de tejido coriónico, lo cual permite un diagnóstico prenatal del sexo embrionario y aberraciones cromosómicas; si se encuentra una anomalía, el em-

barazo puede llegar a término pocos días después del muestreo, cuando el embrión tiene de uno a tres centímetros (novena semana de desarrollo embrionario). Por lo temprano del diagnóstico y tratamiento, el impacto psicológico para los padres es mucho menor que cuando se analizan las células del líquido amniótico, en cuyo caso los resultados se obtienen entre la décimoquinta y vigésima semanas de embarazo por lo que además el riesgo del posible aborto es mayor (Odile, 1985; Galjaard, 1986).

La combinación del muestreo de vellosidades del corion y el análisis por técnicas usadas en ingeniería genética permiten un diagnóstico prenatal rápido de enfermedades genéticas tales como hemoglobinopatías fetales (Goossens et al., 1983), distrofia muscular de Duchenne (Ionasescu et al., 1986), enfermedades lisosomales (Poenaru et al., 1984a), mucopolipidosis II (Poenaru et al., 1984b), enfermedad de Tay-Sachs (Besancon et al., 1984), etc.

Este trabajo tiene como objetivo presentar y analizar los métodos de diagnóstico prenatal de algunas enfermedades genéticas, con metodologías a nivel molecular (no citogenéticas).

Con la aplicación clínica de la tecnología de ADN recombinante, se han logrado grandes avances en el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas, haciendo posi

ble detectar alteraciones directamente en la estructura del gene usando ADN de células de líquido amniótico o de trofoblastos aún cuando los productos del gene mutado no sean expresados en estas células. Más aún, con la utilización de sondas de ADN que detectan el polimorfismo de un sitio de restricción, aumenta la posibilidad de un diagnóstico prenatal para cualquier desorden genético unido al polimorfismo, independientemente de si se conoce o no el defecto genético primario (Epstein et al., 1983).

**ANTECEDENTES METODOLOGICOS PARA EL DIAGNOSTICO
PRENATAL.****RADIODIAGNOSTICO.**

Hasta principios de los años sesentas los exámenes radiológicos eran los únicos métodos de exploración del feto. Sin embargo, con estos estudios muy limitadamente se puede preveer el nacimiento de un niño portador de alguna enfermedad hereditaria. Este método de diagnóstico fue descubierto por Guillermo C. Roentgen quien estableció algunas de sus propiedades como son:

- a) La impresión de placas fotográficas,
 - b) Producción de fluorescencia en ciertas sustancias
- y
- c) La ionización del aire.

También estableció que los organismos eran atravezados por los rayos X y que los tejidos blandos absorbían menos a estas radiaciones que los huesos. Este sistema, como método de diagnóstico prenatal, ha caído en desuso por el temor de que las radiaciones pueden ejercer un efecto teratógeno en el feto al ocasionar un aumento en la frecuencia de disyunción cromosómica durante el primer trimestre del embarazo. Sólo durante el último trimestre del embarazo son posiblemente inocuos para el

R

feto. Su utilización es para diagnosticar algunas malformaciones congénitas de tipo esqueléticas y neuronales (Cuadro No. 1) (Turnbull y MacKenzie, 1983).

CUADRO No. 1.- Ejemplos de algunos desórdenes estructurales diagnosticados por radiografía.

ANOMALIAS CRANEALES

Espina bífida
Osteoporosis
Pie equino varo
Polidactilia de pie
Hipoplasia de fémur
Agenesia de dedos

ANOMALIAS NEURONALES

Anencefalia
Hidrocefalia
Microcefalia

ANOMALIAS GASTROINTESTINALES

Megacolon congénito
Ano imperforado

OTROS

Hidrops fetalis

ULTRASONOGRAFIA.

Se basa en el fenómeno piezoeléctrico de algunos cristales, como el titanato de bario que transforma una corriente eléctrica en energía mecánica (ondas sonoras) y viceversa. Cuando la corriente mecánica choca con el cristal, genera un haz ultrasónico pulsátil con una duración de microsegundos, unidireccional y con mínima divergencia, lo que permite ubicar con precisión las superficies reflejantes a través de la captación de los ecos producidos (Pilu, 1986). Los pulsos ultrasónicos son dirigidos contra el abdomen materno y las densidades acústicas de los tejidos subyacentes (útero, placenta, líquido amniótico, feto y partes fetales) producen ecos diferenciales, los cuales son captados sobre un tubo de rayos catódicos (Sybert y Holbrook, 1987).

Este tipo de examen carece de los peligros que entrañan los métodos radiológicos (Schmid, 1986).

Con el reciente avance en los instrumentos ultrasónicos, hoy es posible obtener un alto grado de exactitud diagnóstica. La importancia para el genetista radica en la habilidad de este método para revisar en forma secuencial y rápida los diferentes órganos y tejidos (Epstein et al., 1983).

La principal aplicación de la ultrasonografía en el

diagnóstico prenatal es en cuanto a malformaciones de la estructura fetal, particularmente del esqueleto, así como también para diagnóstico de defectos del tubo neural, anencefalia, espina bífida, etc. (Schmid, 1986).

Las anomalías estructurales pueden ser diagnosticadas con gran certeza (Cuadro No. 2) (Campbell y Pearce, 1983). Es de especial mención su uso en el diagnóstico de arritmias cardíacas congénitas (Cuadro No. 2) (Epstein et al., 1983; Chervenak et al., 1986).

El ultrasonido es una técnica no invasiva, utilizada también como una guía para visualizar las maniobras de punción para la amniocentesis, fetoscopia, muestreo de sangre fetal y muestreo de vellosidades del corion (Sybert y Holbrook, 1987).

A la fecha, los exámenes ultrasonográficos son parte rutinaria de la práctica obstétrica. En el diagnóstico prenatal es una técnica que requiere una considerable experiencia y la interpretación de los modelos anormales puede ser difícil.

Finalmente, su carácter indoloro, no agresivo y seguro, su aparente simplicidad y los buenos resultados obtenidos, explican el éxito de esta tecnología y su aceptación dentro del cuerpo médico y entre el público en general (Bakketeig et al., 1984).

CUADRO No. 2.- Anomalías estructurales diagnosticadas por ultrasonido antes de la vigésimosexta semana de gestación.

ANOMALIAS NEURONALES Y CRANEALES.

Anencefalia
Encefalocele
Hidrocefalia

TUMORES FETALES

Teratoma
Neuroblastoma

ANOMALIAS GASTROINTESTINALES

Hernia umbilical
Hernia diafragmática
Atresia duodenal
Atresia yeyunal

ANOMALIAS DEL TRACTO URINARIO

Uropatía obstructiva
Displasia renal

ANOMALIAS CARDIACAS

Atresia mitral
Cardiomiopatía hipertrófica

FETOSCOPIA.

La fetoscopia es la visualización intrauterina directa. Se puede obtener fotografía del feto y nos permite el acceso a la sangre fetal y otros tejidos. Los primeros intentos fueron realizados a mediados de los años cincuentas por vía transcervical. El avance en el desarrollo de pequeños endoscopios a principios de los setentas ha permitido utilizar por vía transabdominal un endoscopio de fibras ópticas de 2.2 mm de diámetro con un relativo bajo riesgo de pérdida fetal; esta técnica permite una visión de 2 a 4 cm cuadrados, con una ampli-ficación de 2 - 5x. (Epstein et al., 1983).

La visualización fetal se realiza entre la décimo-quinta y décimo-octava semanas de gestación, dado que a esta edad el líquido amniótico es transparente y el feto es pequeño, con lo que se facilita el manejo de orientación del endoscopio. La obtención de sangre fetal en este método generalmente se realiza entre la décimo-octava y vigésimo primera semanas de gestación, ya que tanto el calibre de los vasos umbilicales como el volumen sanguíneo es mayor (Rodeck y Nicolaidis, 1983 y Alter, 1984).

Algunos de los principales usos de la fetoscopia al obtener la sangre fetal son para el análisis de hemoglobinopatías y detección prenatal de talasemias, defectos

de coagulación, desórdenes citogenéticos y metabólicos, inmunodeficiencias e infecciones (Cuadro No. 3)
 (Chervenak et al., 1986; Sybert y Holbrook, 1987;
 Rodeck y Nicolaides, 1983; Linch y Levisnky, 1983;
 Forestier et al., 1986; Mibashan y Millar, 1983).

CUADRO NO. 3.- Desórdenes hereditarios donde está indicado el muestreo de sangre fetal.

HEMOGLOBINOPATIAS

β -talasemia
 Anemia de células falciformes

DESORDENES DE COAGULACION

Hemofilia A y B
 Trombocitopenia

DESORDENES METABOLICOS

Deficiencia de α -1-antitripsina
 Galactosemia
 Homocistinuria
 Mucopolisacaridosis

INFECCIONES FETALES

Rubeola
 Toxoplasmosis
 Citomegalovirus

OTRAS

Cariotipo
 Distrofia muscular de Duchenne
 Grupo fetal (isoimmunización Rh)

Otro uso más limitado de la fetoscopia es la obtención de biopsias de piel para el diagnóstico prenatal de algunas enfermedades hereditarias de la piel; sobre todo aquellas en que existen cambios histopatológicos y que

pueden ser dilucidadas por microscopia electrónica o de luz y están presentes en el estado fetal (Cuadro No. 4) (Sybert y Holbrook, 1987 y Rodeck y Nicolaidis, 1983).

La biopsia de hígado fetal también puede ser realizada por fetoscopia, sobre todo en aquellas enfermedades en que el defecto es expresado exclusivamente en hepatocitos, por ejemplo, fenilcetonuria y deficiencia de ornitintrascarbamilasa (Rodeck y Nicolaidis, 1983).

La visualización fetal es usada en el diagnóstico cuando el ultrasonido no da una resolución adecuada o existe un diagnóstico dudoso, por ejemplo, en pequeñas anomalías como: labio leporino, polidactilia, etc. (Cuadro No. 5) (Epstein et al., 1983).

La fetoscopia, cuando es realizada por personal experimentado, para la obtención de muestra sanguínea fetal o biopsias tiene un riesgo de 5% de pérdida fetal; cuando es usada únicamente para visualización, el porcentaje es mucho menor.

Dentro de las complicaciones podrán mencionarse: sangrado materno, infección, daño al intestino o vejiga de la madre. La fetoscopia está limitada a pocos centros de estudio y con el rápido progreso en el campo de la ultrasonografía, raramente es indicada (Epstein et al., 1983; Sybert y Holbrook, 1987; Rodeck y Nicolaidis, 1983).

CUADRO No. 4.- Enfermedades donde está indicada la fetoscopia para obtención de biopsia de piel.

Epidermolisis bulosa letal
Epidermolisis bulosa distrófica
Albinismo oculocutáneo
Hiperqueratosis epidermolítica
Síndrome de Sjögren-Larson

CUADRO No. 5.- Desórdenes diagnosticados o excluidos por visualización fetal con fetoscopia.

Microftalmia
Síndrome de fenitoína fetal
Paladar hendido
Labio leporino
Feminización testicular
Onfalocele
Polidactilia
Ectodactilia
Microsomía hemifacial
Pterigia múltiple

AMNIOCENTESIS.

A principios de los años setentas se introduce la amniocentesis como una técnica de diagnóstico prenatal de uso rutinario. Se refiere a la obtención de líquido amniótico a través de una punción transabdominal dirigida al saco amniótico y realizada entre la décimoquinta y vigésima semanas de gestación, puesto que es a esta edad cuando ya se puede obtener un volumen adecuado para el análisis. La ultrasonografía se utiliza como guía para visualizar la posición del feto y la placenta y precisar el sitio de punción (Turnbull y MacKenzie, 1983).

Con el líquido amniótico se ofrece un gran potencial para propósitos de diagnóstico prenatal, sobre todo en la determinación del sexo fetal, anormalidades cromosómicas, defectos del tubo neural y defectos metabólicos en que la proteína defectuosa es expresada en estas células (Sybert y Holbrook, 1987; Patrick, 1983; Gosden, 1983; Brock, 1983; Ferguson-Smith 1983b) (Cuadro No. 6).

La amniocentesis es una prueba rutinaria para estudios cromosómicos en mujeres de 35 años o más para descartar aberraciones cromosómicas ya que estudios realizados por Ferguson-Smith en 1983 mostraron un incremento exponencial en la incidencia de trisomía 21 y otras trisomías directamente relacionadas con la edad materna

(Figura No. 1) (Ferguson-Smith, 1983a).

También se pueden diagnosticar algunas genodermatosis (Cuadro No. 7) (Sybert y Holbrook, 1987).

Las desventajas del método incluyen el avanzado tiempo de gestación necesario para la amniocentesis, la tardanza entre el muestreo y la obtención de resultados, sobre todo si es necesario un cultivo celular, lo cual requiere de 2 - 4 semanas. Todo este tiempo de espera causa una gran tensión mental a la pareja. Además, si el resultado indica un feto afectado y se lleva a término el embarazo, generalmente se utiliza la inducción con prostanglandinas o solución salina, lo cual tiene una mayor morbilidad y mortalidad materna además del choque psicológico (Turnbull y MacKenzie, 1983; Sybert y Holbrook, 1987).

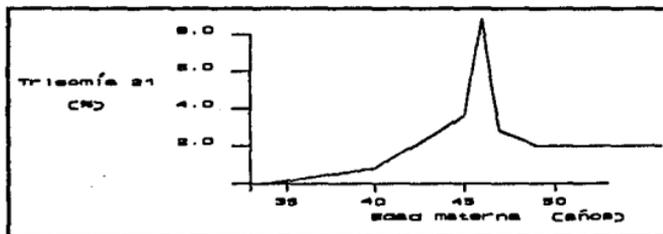


Figura No. 1.- Relación de edad materna y porcentaje de trisomía 21. Estudios realizados por amniocentesis.

CUADRO No. 6.-Desórdenes metabólicos diagnosticados por amniocentesis.

DESORDEN METABOLICO	DEFICIENCIA
Enfermedad de Fabry	α -Galactosidasa A
Enfermedad de Farber	Ceramidasa
Enfermedad de Gaucher	β -Glucosidasa
Enfermedad de Tay-Sachs	Hexosaminidasa A
Galactosemia	Galactosa-1-fosfato- uridil-transferasa
Aciduria arginosuccínica	Arginosuccinato liasa
Homocistinuria	Cistationina β -sintasa
Citrulinemia	Arginosuccinato sintetasa
Hiperamonemia II	Ornitín-transcarbamilasa
Aciduria ramificada	α -cetoácido-descarboxilasa
Síndrome de Lesch Nyhan	Hipoxantín-fosforribosil- transferasa

CUADRO No. 7.- Genodermatosis diagnosticadas por estudio de células de líquido amniótico.

Ataxia-Telangiectasia
 Anemia de Fanconi
 Xeroderma pigmentoso
 Porfiria hematopoyética

MUESTREO DE VELLOSIDADES CORIONICAS.

Este método de muestreo fue desarrollado a finales de los años sesentas, pero debido a la alta incidencia de pérdida del producto el método fue abandonado. No fue hasta mediados de los setentas cuando volvió a practicar se exclusivamente para determinación del sexo fetal (Epstein et al., 1983; Sybert y Holbrook, 1987; Simoni y Rosella, 1986).

El corion es el tejido fetal más accesible en el primer trimestre del embarazo. Las vellosidades coriónicas son obtenidas desde su sitio de implantación o del corion extraplacentario, entre la octava y doceava semanas de gestación (Figura No. 2).

El equipo usado es un endoscopio de 1.7 mm de diámetro, sostenido en una cánula de dos vías, una para la instilación de solución salina (dilatación) y la otra para la introducción de las pinzas de biopsia. La toma de muestra es por vía transvaginal. Con el uso de un buen equipo de ultrasonido como guía, la técnica está relativamente libre de complicaciones y es posible hacerla sin anestesia general (Rodeck y Morsman, 1983; Gustavii, 1984). También se han tenido buenos resultados muestreando las vellosidades del corion por vía transabdominal (Maxwell et al., 1986).

La técnica ha tenido grandes problemas éticos y morales debido a que, comparándola con la amniocentesis tiene un mayor riesgo de pérdida del producto ya sea por trauma, infección o sangrado. Debe tomarse en cuenta que conforme aumenta la experiencia en la toma de muestra, disminuye el riesgo (Roy, 1986).

El material obtenido en la biopsia de vellosidades coriónicas puede ser utilizado para la determinación del sexo fetal, cariotipo fetal (Simoni y Rosella, 1986; Ferguson-Smith, 1983), detección de anemia de células falciformes (Goossens et al., 1983), talasemias (Cao et al., 1986), ciertas deficiencias enzimáticas como la enfermedad de Pompe, Tay-Sachs (Poenaru et al., 1984a; Besancon et al., 1984) de hemofilias A y B (Delpuch et al., 1986; Mulcahy et al., 1984; Tonnesen et al., 1984) y de varias genodermatosis (Sybert y Holbrook, 1987) (Cuadro No. 8).

Las ventajas que presenta el muestreo de vellosidades coriónicas son:

- A) El diagnóstico se realiza durante el primer trimestre del embarazo de manera que si el embrión se encuentra afectado, se puede realizar la terminación del embarazo sin grandes efectos psíquicos en la pareja.
- B) El tiempo entre el muestreo y los resultados es mu-

cho más corto que el requerido para el cultivo de células del líquido amniótico.

La desventaja es la alta proporción de pérdida del producto (3 - 5 %) cuando es comparada con la amniocentesis (< 0.5 %) (Sybert y Hollbrook, 1987; Old et al., 1986).

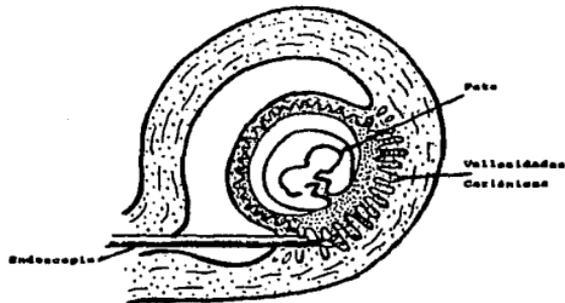


Figura No. 2.- Muestreo de vellosidades coriónicas por técnica de visión directa.

Cuadro No. 8.- Desórdenes diagnosticados por muestreo de vellosidades coriónicas.

Deficiencia de α -1-antitripsina
 α -Talasemia
 β -Talasemia
Síndrome de Lesch-Nyhan
Fenilcetonuria
Hemofilia A y B
Deficiencia de ornitín transcarbamilasa
Enfermedad de Farber
Anemia de Fanconi
Enfermedad de Fabry
Citrulinemia
Cistinosis
Anemia de células falciformes
Cetonuria ramificada
Homocistinuria
Aciduria metilmalónica
Hiperoxaluria
Xeroderma pigmentoso
Albinismo
Ataxia-Telangiectasia

AVANCES METODOLOGICOS EN EL DIAGNOSTICO PRENATAL.

Los grandes adelantos realizados en el campo de la biología molecular y el surgimiento de la ingeniería genética han tenido profundas implicaciones dentro de los métodos de diagnóstico prenatal a través de la tecnología del ADN recombinante.

Estas metodologías nos permiten aislar con relativa facilidad genes para su análisis en cantidad suficiente y en forma completamente pura. Así, se puede analizar la disfunción de un gene a nivel de ADN. Hoy se sabe que el ADN de cada célula somática del cuerpo es idéntico al ADN de otras células, de tal manera que un defecto específico de un gene puede ser detectado aún en una muestra de tejido donde el gene en cuestión no es expresado (Humphries y Williamson, 1983).

TECNOLOGIA DEL ADN RECOMBINANTE.

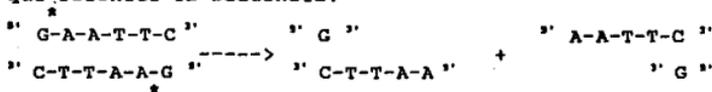
- A) Enzimas de restricción.
- B) Electroforesis en gel de agarosa.
- C) Transferencia de Southern.
- D) Sondas moleculares.
- E) Marcado de sondas moleculares.
- F) Hibridación moleculares.
- G) Autoradiografía.
- H) Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

A) Enzimas de restricción.

Son un grupo de enzimas de origen fundamentalmente bacteriano. Algunos autores piensan que en el organismo portador actúan como un mecanismo de defensa contra la invasión de ADN extraño, como virus, ya que son capaces de reconocer y romper secuencias específicas de ADN de doble hilo. Así, para el diagnóstico prenatal de algunas enfermedades humanas, estas enzimas son utilizadas para romper el ADN humano obteniéndose fragmentos específicos para una posterior manipulación y análisis.

Una característica importante acerca del reconocimiento de secuencias por parte de estas enzimas es la de que generalmente actúan sobre formas palindrómicas, esto es, la secuencia de bases en una banda del ADN es repetida en orden inverso en la otra banda.

Un ejemplo de enzima de restricción es la Eco RI, que reconoce la secuencia:

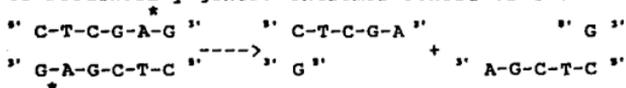


y el rompimiento genera extremos cohesivos 5'.

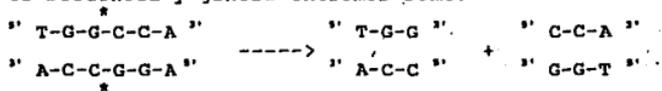
Muchas enzimas de restricción semejantes a Eco RI, generan fragmentos de ADN con extremos cohesivos 5'; otros como Pst I generan fragmentos con extremos cohesivos 3'; mientras que otras enzimas de restricción como

Bal I, generan fragmentos con extremos como (Maniatis et al., 1982) (* indica los sitios de corte).

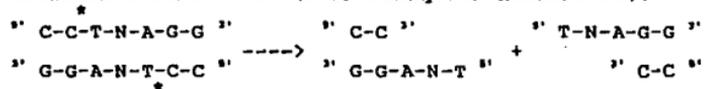
La enzima de restricción Pst I reconoce la siguiente secuencia y genera extremos cohesivos 3':



La enzima de restricción Bal I reconoce la siguiente secuencia y genera extremos como:



En forma general, las diferentes enzimas de restricción reconocen diferentes secuencias, sin embargo, hay enzimas aisladas de diferentes fuentes que rompen la misma secuencia blanco y a estas enzimas se les conoce como isosquizómeros; por ejemplo, Mst II obtenida de Microcoleus sp. y la Cvn I de Chromatium vinosum, ambas reconocen la siguiente secuencia y el rompimiento genera extremos cohesivos 5' (N es cualquier nucleótido):



B) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

El método más común para separar, identificar e incluso purificar fragmentos de ADN, es la electroforesis en geles de agarosa. Es una técnica sencilla y rápida capaz de separar fragmentos de ADN a partir de una mezcla de la que no pueden ser separados por otros métodos (por ejemplo, centrifugación por gradiente de densidad).

La velocidad de migración electroforética del ADN a través del gel de agarosa depende del tamaño molecular, concentración de agarosa, conformación del ADN y corriente eléctrica aplicada. La velocidad es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular (Sharp et al., 1973; Johnson y Grosman, 1977).

Existe una relación lineal entre la movilidad electroforética del ADN y la concentración del gel, de manera que, dentro de ciertos límites, a mayor concentración de agarosa, mayor eficiencia de separación para fragmentos de ADN de menor peso molecular. Generalmente se usa una concentración de 0.8 a 2.5 %.

Dependiendo de la conformación del ADN, este presentará diferentes velocidades de migración, por ejemplo, el ADN de los plásmidos puede tener las siguientes conformaciones:

a) La forma I se refiere al ADN circular cerrado super-

enrollado.

b) La forma II se refiere al ADN circular abierto, donde se presentan cortes sobre uno de los hilos del ADN.

c) La forma III se refiere al ADN lineal.

Así, las movibilidades relativas de las tres formas son dependientes principalmente de la concentración de agarosa en el gel, de la corriente aplicada, de la fuerza iónica del amortiguador y de la densidad de superenrollamiento de la forma I de ADN (Johnson y Grossman, 1977). Bajo algunas condiciones la forma I de ADN migra más rápido que la forma III y viceversa.

El rango efectivo de separación en geles de agarosa, disminuye conforme aumenta el voltaje. Para obtener una máxima resolución, los geles son corridos a no más de 5 v/cm (Maniatis, et al., 1982).

C) TRANSFERENCIA DE SOUTHERN.

Esta técnica fue desarrollada por Edwin Southern en 1975. Es un producto de la tecnología de ADN recombinante utilizada ampliamente para la detección directa de genes específicos en el ADN humano.

Puede ser utilizada no sólo para localizar secuencias específicas de ADN clonado, sino también para identificar secuencias en un ADN total digerido (Maniatis et al., 1982).

El objetivo de la técnica es transferir los fragmentos de ADN separados por electroforesis en un gel, a un soporte sólido como puede ser el filtro de nitrocelulosa, de tal manera que queden inmovilizados. Así se preservan las posiciones relativas de los fragmentos de ADN que tenían en el gel de agarosa, de manera que con técnicas subsecuentes se pueda realizar la localización de las bandas de algunas secuencias particulares de ADN.

Los fragmentos de ADN separados por electroforesis en gel son desnaturalizados colocando al gel en una solución alcalina. Hecho esto, se coloca al gel en una solución amortiguadora neutralizante. Posteriormente, en un recipiente que contiene una solución salina concentrada se coloca una tira de papel filtro y sobre éste el gel de agarosa. Después, sobre el gel se aplica una hoja de

nitrocelulosa (u otro soporte sólido como por ejemplo, filtros de nylon, papel diazo, etc.) y sobre ésta, papel absorbente. Así, la solución salina, al moverse por capilaridad, arrastrará los fragmentos de ADN hacia el filtro de nitrocelulosa obteniéndose una réplica del gel de agarosa (Figura No. 3) (Southern, 1975; Gussella, 1986).

Los fragmentos de ADN en el rango de 0.5 - 50 kilobases pueden ser transferidos por este método. Fragmentos más grandes se transfieren ineficientemente mientras que los más pequeños no se unen bien al filtro de nitrocelulosa (Humphries y Williamson, 1983).

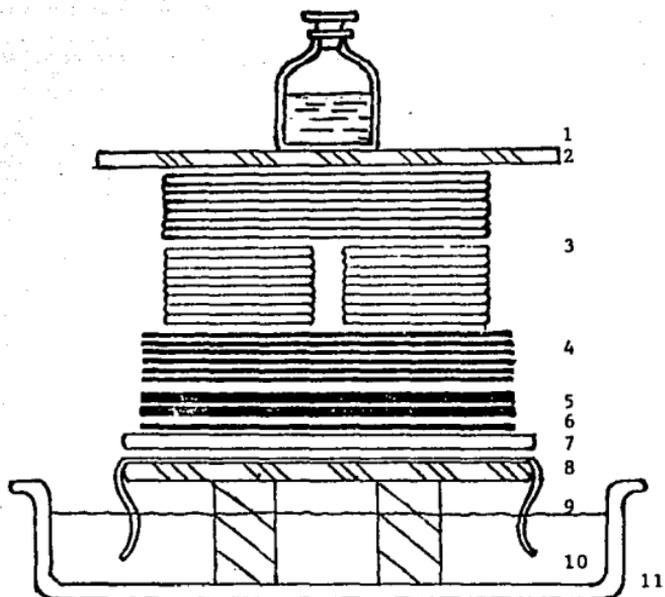


Figura No. 3.- Diagrama de organización de materiales para la transferencia de Southern. Los componentes son: (1) peso, (2) placa de vidrio, (3) y (4) sanitas (elemento absorbente), (5) papel Whatman 3MM, (6) filtro de nitrocelulosa, (7) gel de agarosa (8) placa de vidrio, (9) amortiguador, (10) soportes (11) recipiente.

D) SONDAS MOLECULARES.

La detección de secuencias particulares dentro de una muestra de ADN digerida con una o más enzimas de restricción depende de muchos factores siendo uno la sonda utilizada.

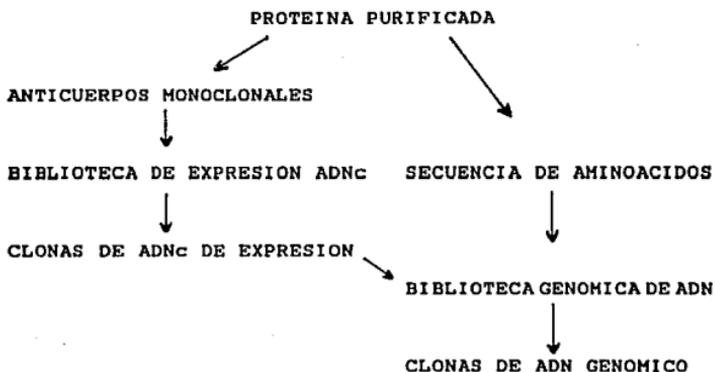
Las sondas pueden ser obtenidas de bibliotecas de ADN genómico o de bibliotecas de expresión de ADN complementario.

El punto de partida generalmente es la purificación de la proteína de la cual se puede obtener datos sobre la secuencia de aminoácidos y con esta información generar oligonucleótidos (de 14 a 20 nucleótidos) que correspondan a regiones particulares de la secuencia de aminoácidos de la proteína en cuestión. Una o más de estas sondas se pueden utilizar para sondear bibliotecas de ADN genómico o complementarios para así aislar el gene particular (Cuadro No. 9) (Montgomery et al., 1978; Goeddel et al., 1980; Suggs et al., 1981).

Otra forma es la de obtener anticuerpos (monoclonales) específicos contra la proteína, de manera que los anticuerpos pueden ser utilizados para sondear bibliotecas de expresión, en virtud de la reacción entre los anticuerpos y las cadenas polipeptídicas en síntesis. Así se han obtenido ARNms muy puros que pueden ser usados para

preparar una sonda de ADN complementario (Manitis et al., 1982).

Las bibliotecas genómicas contienen una colección de fragmentos que comprenden el genoma completo de un organismo dado. Por el contrario, las bibliotecas de ADN complementario contienen moléculas de ADN complementario producidos por una preparación heterogénea de ARN poli A*



Cuadro No. 9.- Diagrama de flujo para la obtención de clones de ADN genómico o de ADN complementario.

E) MARCADO DE SONDAS MOLECULARES.

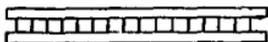
Son reacciones que sirven para marcar radiactivamente un ADN que va a ser utilizado como sonda para detectar o cuantificar secuencias específicas de ADN o ARN.

El método de " nick translation ", uno de los más usados en la actualidad, utiliza dos enzimas, la DNAasa I que realiza cortes en una sola tira de un ADN y la ADN polimerasa I que repara dichos cortes. Además, utiliza como sustrato desoxinucleótidos trifosfatados marcados radiactivamente con ³²P en posición alfa. De esta manera, una vez que se tienen los cortes realizados por la DNAasa I, la ADN polimerasa I incorpora los desoxinucleótidos marcados en el extremo 3'-hidroxilo y como esta enzima también presenta una actividad exonucleolítica en ambas direcciones (5'y 3'), elimina los residuos de nucleótidos no marcados del extremo 5'-fosforilo (Figura No. 4) (Rigby et al., 1977).

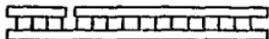
La eventual observación de las secuencias específicas de ADN o ARN depende en gran parte de la actividad específica de la sonda.

Como las secuencias a estudiarse en el diagnóstico prenatal provienen de células eucarióticas superiores y la cantidad de ADN o ARN disponibles es baja, generalmente se utilizan sondas con una actividad específica por

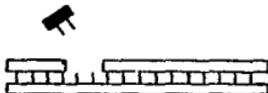
arriba de 10^6 desintegraciones por minuto por microgramo de ADN (Montiel, 1987 ;Humphries y Williamson, 1983).



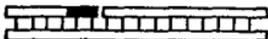
ADN de doble hilo.



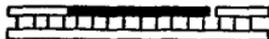
ADN con una muesca en 3'OH creado por la ADNasa.



Uno de los varios nucleótidos removidos del lado 5' de la muesca, por la actividad de la polimerasa I de E. coli.



Nucleótido radiactivo incorporado.



Repetición de los pasos 3 y 4.

Figura No. 4.- Actividad de la ADN polimerasa I de E. coli en la técnica de "nick translation".

F) HIBRIDACION MOLECULAR.

En este proceso, la sonda de ADN marcada y desnaturada interactúa con el ADN desnaturado que se encuentra inmovilizado en el soporte sólido apareándose a través de puentes de hidrógeno en sitios donde se encuentra complementariedad de secuencias de bases. Este apareamiento depende en gran medida del grado de homología entre la sonda y el fragmento de ADN estudiado, así como también de la temperatura de incubación y la fuerza iónica del sistema (Casey y Davidson, 1977). Para los fragmentos inmovilizados de más de 50 bases de longitud en los que la homología entre las bandas a hibridar es del 100%, la temperatura promedio a la cual el 50 % de la doble hélice se disocia es de 73 °C. Una temperatura por debajo de este valor (50C) es la que se usa experimentalmente para observar hibridación entre moléculas perfectamente complementarias (Meinkoth y Wahl, 1987). Consideraciones teóricas indican que por cada 1% de diferencia en la homología de las bandas a hibridar, la temperatura de incubación debe descender 1°C. De cualquier manera, la temperatura óptima debe determinarse empíricamente, puesto que conforme se disminuye la temperatura se favorece la hibridación inespecífica, con la consecuente disminución de la relación señal/ruido (Montiel, 1987).

G) AUTORADIOGRAFIA.

Los ácidos nucleicos radiactivos pueden ser detectados por autoradiografía, de manera que se puede obtener una buena imagen en una placa fotográfica, determinando así la posición del fragmento en estudio inmovilizado en el filtro (Maniatis et al., 1982; Montiel, 1987).

Esta detección depende de la actividad específica de la sonda usada, del tipo de película y del tiempo de exposición.

Las películas más utilizadas para la autoradiografía son la Kodak X-OMATK, Kodak XAR-5X o la Fuji RX.

Generalmente se utilizan intensificadores para aumentar el efecto de la señal radiactiva. Los más usuales son a base de tungstenato de calcio los cuales fluorescen produciendo luz azul-violeta. El funcionamiento de estos intensificadores consiste en producir una doble impresión sobre la placa fotográfica y su utilidad está en función de la señal radiactiva; se usan si la señal es débil (menos de 500 cpm medida en un minimonitor).

Al usar las pantallas intensificadoras se emplean temperaturas de -80 a -70 °C para obtener un rendimiento máximo de los intensificadores. La baja temperatura es únicamente para prolongar el periodo de fluorescencia (Maniatis et al., 1982; Montiel, 1987).

En el caso que la señal sea intensa (más de 1,000 cpm detectado por un minimonitor) no es necesario emplear pantallas intensificadoras y no hay necesidad de usar bajas temperaturas, con lo cual la autoradiografía se realiza a temperatura ambiente.

El tiempo de exposición de la placa de rayos X al filtro depende de la intensidad de la señal, en función inversa, esto es, menos tiempo si la señal es intensa, más tiempo si la señal es débil (Montiel, 1987).

H) POLIMORFISMOS DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN.

Los polimorfismos del ADN se pueden definir como variaciones naturales que ocurren en la secuencia primaria del ADN genómico entre los pares de alelos codificadores de las características genéticas (Gusella, 1986).

Estos polimorfismos se presentan tanto en secuencias de ADN expresado, lo cual guiará a la formación de moléculas protéicas alteradas, como en secuencias de ADN no expresado. Los datos sugieren que aproximadamente uno entre cada 100 a 200 nucleótidos en las regiones de ADN no expresado es polimórfico, de manera que si se extrapola en el ADN humano teóricamente existen 10⁷ polimorfismos (Epstein *et al.*, 1983; Humphries y Williamson, 1983; Feingold *et al.*, 1986).

La utilidad de estos polimorfismos genéticos radica en que nos da pautas para distinguir entre dos copias de un locus particular en el genoma humano, ya que las variaciones o cambios de secuencias en el ADN genómico podrán crear o destruir sitios de restricción específicos, dando como resultado la obtención de fragmentos de ADN de diferente tamaño después de la digestión con diferentes enzimas de restricción y analizados con una variedad de sondas genéticas (Wijsman, 1984; Weatherall, 1984; Newmark, 1984; Grzeschik, 1986). Estos polimorfismos en

la longitud de los fragmentos de restricción han revolucionado el análisis genético y han encontrado un gran uso en el diagnóstico prenatal. Es importante mencionar que los polimorfismos no necesariamente están asociados de manera directa con la lesión que causa la enfermedad, sino simplemente pueden ser una variación pre-existente en una gran población pero deben estar lo suficientemente cercanos al locus cromosómico responsable de la enfermedad, con ello disminuye la probabilidad de que se separen del locus mutado por recombinación durante la segregación genética. De esta manera, pueden ser utilizados como marcadores para el diagnóstico (Newmark, 1984; Jeffreys et al., 1985; Gusella, 1986).

La forma generalmente usada para el estudio de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción es como sigue:

- a) Digestión del ADN genómico por una enzima de restricción (Figura No. 5a).

Se tiene un locus hipotético A donde existe una inserción o delección del ADN entre dos sitios de reconocimiento para una enzima de restricción B. Esto alterará el tamaño del fragmento de restricción producido por la digestión de la enzima.

- b) Separación electroforética de los fragmentos resultantes (Figura No. 5b).

- c) Transferencia del ADN hacia un soporte sólido (Southern blotting) (Figura No. 5b).
- d) Hibridación con una sonda clonada y específica para el locus en cuestión (Figura No. 5b).
- e) Autoradiografía (Figura No. 5b).

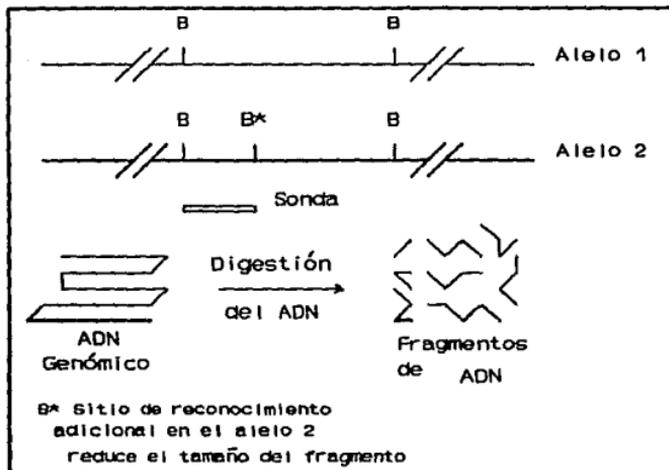


Figura No. 5.- Mapeo de un locus hipotético A. El locus hipotético A presentando sitios de reconocimiento específicos para la endonucleasa B. Los alelos 1 y 2 difieren por la presencia de un sitio de restricción adicional en el alelo 2.

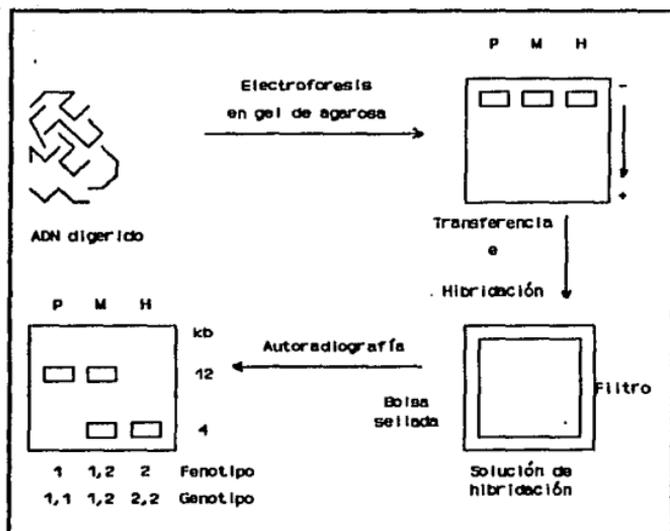


Figura No. 5b.- Detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Detección de RFLP en tres individuos, (P, M, H) usando para la hibridación una sonda clonada específicamente para el locus A. Se presentan los fenotipos y genotipos de cada individuo.

METODOS.

- A) Obtención de vellosidades coriónicas.
- B) Obtención de ADN.
- C) Electroforesis.
- D) Marcaje radiactivo de sondas moleculares.
Técnica de " random primer extension ".
- E) Hbridación y Lavado.
- F) Autoradiografía.

A) Obtención de vellosidades coriónicas.

Como se mencionó anteriormente, la principal ventaja de usar las vellosidades coriónicas como fuente de ADN para su análisis genético en vez de células de líquido amniótico, consiste en que el diagnóstico se puede realizar temprano durante el primer trimestre del embarazo, reduce el período estresante de espera de resultados y si el feto está afectado, la pareja puede optar por la terminación del embarazo cuando los riesgos para la madre son mínimos.

Las vellosidades coriónicas son las unidades funcionales del lado fetal de la placenta. Se desarrollan a partir del trofoblasto el cual proviene del blastocisto implantado y es un tejido que prolifera rápidamente en los primeros estadios del desarrollo embrionario (Rodeck y Morsman, 1983).

En las primeras semanas de desarrollo embrionario las vellosidades cubren toda la superficie del corion al-

canzando un máximo de crecimiento y dilatación en el área del polo embrionario constituyendo el corion frondoso.

Por otra parte en el polo abembrionario (polo opuesto al sitio de implantación) las vellosidades degeneran y esta porción se vuelve lisa y se llama corion leve o calvo.

La diferencia entre los polos embrionario y abembrionario se manifiesta en la decidua: en el polo embrionario sus células son muy voluminosas y se le llama decidua basal, la cual tiene una íntima relación con el corion. En el polo abembrionario, al aumentar de volumen la cavidad coriónica, la decidua sufre un estiramiento y sus células degeneran, a ésta se le llama decidua capsular. Esta capa está posteriormente en contacto con la decidua parietal. En consecuencia, la porción del corion que participa de los procesos de intercambio entre la madre y el producto es el corion frondoso el cual, junto con la decidua basal, constituyen la placenta (Figura No. 6) (Rodeck y Morsman, 1983).

Como se podrá suponer, las vellosidades coriónicas pueden ser obtenidas del sitio de implantación, corion frondoso, o del corion extraplacentario, futuro corion leve o calvo, antes de que este tejido degenera.

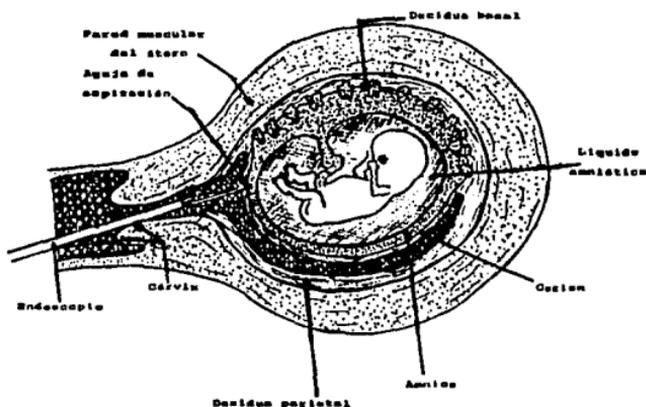


Figura No. 6.- Esquema de un embarazo de 8 semanas mostrando la toma de vellosidades coriónicas.

Las muestras de vellosidades coriónicas pueden ser obtenidas entre la octava y décimo-segunda semanas de gestación. La técnica más utilizada y de mejores resultados es la endoscopia guiada con ultrasonido desarrollada por Gustavil *et al.*, (1984). El equipo usado es un endoscopio de 1.7 mm de diámetro (Dyonics needlescope) y una cánula de 3.0 x 4.7 mm de diámetro externo con dos compartimientos, uno para la instilación de solución salina a temperatura corporal y el otro para la introducción de la pinza de biopsia (forceps) (Figura No. 7).

El endoscopio colocado en la cánula es introducido a través del canal cervical al espacio extra-amniótico y dirigido al sitio donde emerge el saco amniótico de la pared uterina. La pinza de biopsia es insertada y se remueve una pieza de decidua. Se saca la pinza y bajo visión del endoscopio el instrumento se introduce a 2 cm de la placenta.

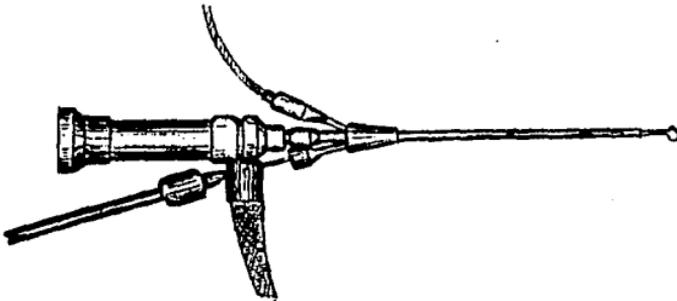


Figura No. 7.- Esquema de un endoscopio de dos vías, usado para el muestreo de las vellosidades coriónicas.

Se introduce otra pinza de biopsia entre la base del saco amniótico y la base de la placenta. Esto es realizado con la guía de ultrasonido. El espécimen de vellosidades coriónicas es tomado bajo visión directa

del endoscopio. Finalmente la pinza de biopsia es removida con cuidado. El volumen de la biopsia varía entre 10 - 100 mg o más.

Si la muestra no será procesada inmediatamente, el espécimen se congela a -40°C a razón de 1°C por minuto en un tubo conteniendo medio de cultivo de tejidos, suplementado al 2 % con suero de ternera fetal y 10 % de dimetil sulfóxido. Las muestras de vellosidades pueden ser transportadas a otros laboratorios en un lapso de hasta 48 hrs. en hielo seco (Old, 1986).

Ventajas de las vellosidades coriónicas:

- a) No se requiere anestesia ni analgesia.
- b) Se realiza en pocos minutos.
- c) No se requiere dilatación cervical aún en mujeres nulíparas.
- d) Con la visión directa se evita la contaminación de la muestra con tejido materno y se puede seleccionar las vellosidades para el crecimiento in vitro (Old, 1986).

B) Obtención de ADN (Old y Higgs, 1983).

1.- Si es necesario, descongelar la muestra de vellosidades coriónicas y transferirla a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Centrifugar a 11,000 g's por 5 minutos y descartar la capa acuosa.

2.- Lavar la muestra con 0.5 ml de una solución conteniendo NaCl 150 mM, EDTA 25 mM y mezclar. Centrifugar y descartar la capa acuosa. En esta fase se puede pesar la muestra.

3.- Agregar 0.5 ml de la solución salina con EDTA más 0.5 μ l de solución de dodecil sulfato de sodio al 10 % más 50 μ g de Proteinasa K y mezclar. Incubar a 37°C por 16 hrs. con agitación ocasional.

4.- Agregar 0.25 ml de una solución de alcohol isoamílico-cloroformo (1:16) más 0.25 ml de fenol. Mezclar y centrifugar por un minuto.

5.- Transferir la capa acuosa superior a un tubo eppendorf limpio. Realizar una segunda extracción, repitiendo el paso anterior.

6.- Añadir 0.5 ml de la solución de alcohol isoamílico-cloroformo (1:16), mezclar y centrifugar por un minuto.

7.- Transferir la capa acuosa superior a un tubo eppendorf limpio. Repetir la extracción del paso ante-

rior.

8.- Precipitar el ADN añadiendo cloruro de sodio a una concentración final de 0.4 M y dos volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente, mezclar y centrifugar 5 segundos.

9.- Remover el etanol y redisolver el botón de ADN en 50 μ l de agua destilada.

10.- Agregar 25 μ l de una solución de acetato de amonio 7.5 M, mezclar y añadir 300 μ l de etanol absoluto a temperatura ambiente, mezclar y centrifugar por 5 segundos. En este paso se redisuelven los polisacáridos que inhiben a las enzimas de restricción.

11.- Remover el etanol y lavar el botón de ADN con etanol al 70 %. Remover el etanol y secar el botón de ADN.

12.- Redisolver el ADN en 50 μ l de agua destilada o en amortiguador de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM.

13.- Tomar una alícuota de 5 μ l y llevarla a 1 ml con agua destilada, medir la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de ultravioleta.

Generalmente por cada mg de muestra seca se obtiene 1 μ g de ADN (Old, 1986) (Figura No.8). Según Old, se utilizan 5 μ g de ADN para cada análisis.

R

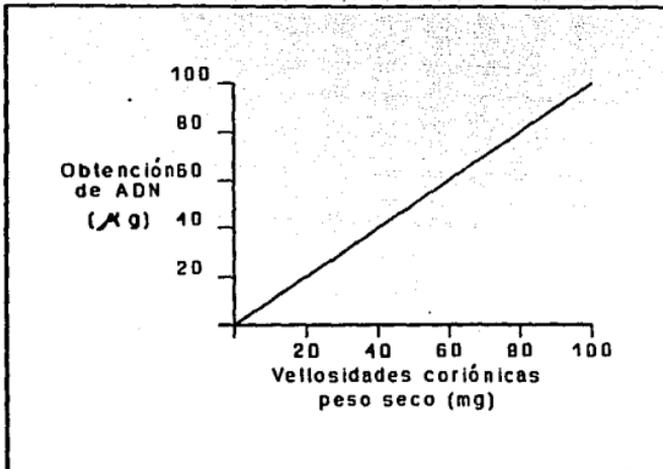


Figura No. 8.- La gráfica muestra la relación entre el tamaño de la muestra de vellosidades coriónica y el rendimiento en la obtención de ADN.

C) Electroforesis. (Montiel, 1987).

Este método es usado para separar fragmentos de ADN en base a su peso molecular de manera que pequeños fragmentos migran más rápido que los grandes y la distancia de migración sobre el gel varía en forma inversa con el logaritmo del peso molecular (Johnson y Grossman 1977). El tamaño de los fragmentos puede ser determinado calibrando el gel con el uso de estándares conocidos y comparando las distancias de migración de los fragmentos desconocidos.

1.- Preparar el gel de agarosa en placas de 20x14 x0.5 cm a una concentración entre 0.8 - 2.5 % en amortiguador para electroforesis, generalmente de Tris-borato pH 8.0 (la concentración del gel de agarosa dependerá del tamaño de los fragmentos de ADN a separar, por ejemplo, a mayor contenido de bases menor concentración del gel y viceversa) (Maniatis, 1982).

2.- Cargar los pocillos con la muestra de ADN digerido.

3.- Colocar la placa de agarosa en la cámara de electroforesis teniendo cuidado que los pocillos queden cerca del electrodo negativo (cátodo). El gel debe quedar comunicado con el amortiguador de electroforesis a través de puentes de papel filtro.

4.- Se realiza la corrida aplicando una diferencia de potencial de 1.5 v/cm durante 14-18 hrs.

5.- Al terminar la corrida se retira la placa de agarosa y se sumerge en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 5 - 10 min. Lavar después con agua destilada.

6.- El gel tejido se coloca en un transiluminador de luz ultravioleta (290 nm) para visualizar las bandas de los fragmentos de ADN.

**D) MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS MOLECULARES.
TECNICA DEL " RANDOM PRIMER EXTENSION ".**

Esta técnica, descrita por Feinberg y Vogelstein (1983 y 1984) recupera fragmentos de ADN del gel de agarosa y las marca a una alta actividad específica ($10^6 - 10^8$ cpm/ μ g ADN).

La técnica tiene las siguientes ventajas:

- a) No requiere purificación del ADN de la agarosa, por lo tanto, elimina la pérdida de ADN en las fases de recuperación desde agarosa.
- b) Evita pérdida de tiempo en las fases de recuperación de ADN.
- c) Se puede utilizar aún con muy pequeñas cantidades de ADN como molde.
- d) El producto marcado es muy estable.
- e) La actividad específica puede llegar a ser mayor de 10^8 cpm/ μ g de ADN.
- f) La utilización del fragmento Klenow aumenta el porcentaje de incorporación porque no contiene la actividad exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ evitando así pérdida de marca incorporada.
- g) El pH de la reacción (6.6) también disminuye en gran medida la actividad de exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ previniendo la pérdida de marca incorporada.

TECNICA DEL "RANDOM PRIMER EXTENSION".

1.- El ADN es digerido con una enzima de restricción y los fragmentos son separados electroforéticamente.

2.- La banda deseada es cortada limpiamente y colocada en un tubo de microcentrifuga previamente pesado. Añadir agua en proporción de 3 ml/g de gel y colocar en un baño en ebullición por 7 minutos para disolver el gel y desnaturalizar el ADN.

3.- En un tubo nuevo, añadir los siguientes reactivos en el orden indicado:

- a) Agua destilada a un volumen total de 50 μ l.
- b) Amortiguador (10 μ l) con hexámeros de desoxirribonucleótidos (a una concentración de 90 unidades de DO/ml).
- c) Albúmina sérica bovina 2 μ l (10 mg/ml).
- d) ADN en agarosa hasta 32.5 μ l (del paso 2).
- e) dCTP marcado con 32 P, 5 μ l (con actividad específica de 3,000 - 6,000 Ci/mmol).
- f) Mezcla de desoxinucleósidos trifosfatados (no radiactivos) 10 μ l (dATP, dGTP y TTP a una concentración 100 μ M de cada uno).
- g) Fragmento Klenow, 2 unidades.
- h) Incubar 3 horas a temperatura ambiente.

1) Parar la reacción con la adición de 200 μ l de una solución que contiene NaCl 20 mM, Tris-HCl (pH 7.5) 20 mM, EDTA 2 mM, dodecilsulfato de sodio 0.25 % y dCTP 1 μ M.

4.- Purificación del fragmento marcado. Para separar el fragmento de ADN marcado de los nucleótidos radiactivos no incorporados, la muestra se hace pasar a través de una columna de Sephadex G-50 quedando atrapada en la columna la radiactividad no incorporada y en el eluido la sonda radiactiva.

E) Hibridación y Lavado.

En esta fase del proceso es cuando la sonda radiactiva empleada para muestrear la población de moléculas de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido interactúa con moléculas de secuencia complementaria apareándose con ellas.

La hibridación está basada en dos principios:

- a) La formación de puentes de hidrógeno entre la complementariedad de la sonda radiactiva y las moléculas de ácidos nucleicos a muestrear dando origen a un comportamiento de hibridación altamente específico.
- b) La formación de la estructura del tipo doble hélice lo cual es reversible.

La estabilidad de la formación de la doble hélice depende de varios factores en los que se incluyen: temperatura de incubación del sistema, fuerza iónica, composición de bases entre la sonda y el fragmento estudiado (grado de homología), composición del amortiguador y la presencia de agentes desestabilizantes (Montiel, 1987; Thein y Wallace, 1986).

Una temperatura de 68 °C es la que se utiliza experimentalmente para observar hibridación entre moléculas perfectamente complementarias (Montiel, 1987). Sin embargo, la temperatura óptima deberá determinarse empíricament

te ya que conforme se disminuye la temperatura aumenta la hibridación inespecífica.

A continuación se detalla un protocolo de hibridación y lavado:

1.- Colocar el filtro en una bolsa gruesa de polietileno.
2.- Hibridar el gel un mínimo de 2 horas a la temperatura apropiada con la sonda marcada (10^7 dpm/ μ g de sonda) en una solución: SSPE 5x (a), SDS 0.1% (b) 250 a 500 μ g de ADN heterólogo (c) y reactivo de Denhardt 5x. Sellar la bolsa de plástico teniendo cuidado de no atrapar burbujas de aire.

3.- Al término del período de hibridación retirar el filtro de la bolsa de plástico y colocarlo en un recipiente con la solución de SSC 5x (d) a temperatura ambiente. Repetir el lavado.

4.- Lavar por 1 - 2 minutos en SSC 6x (d) a la temperatura de hibridación. Repetir el lavado por 1-2 hrs. a temperatura ambiente.

5.- Secar el gel entre dos hojas de papel Whatman.

(a) SSPE 1x: NaCl 180 mM, NaH_2PO_4 10 mM, EDTA (pH 8) 1mM.

(b) SDS es: dodecil sulfato de sodio.

(c) ADN heterólogo puede ser ADN de esperma de salmón.

(d) SSC 1x: NaCl 0.15 M, citrato de sodio 0.015 M (pH 7).
reactivo de Denhardt 5x: polivinilpirrolidona 40-T, albúmina bovina y Ficoll 400, todos al 0.1%

F) Autoradiografía.

Esta es la etapa final de la técnica de Southern, tiene como objetivo obtener una buena imagen en una placa fotográfica que permite el estudio de una determinada secuencia de ADN.

El procedimiento es el siguiente:

1.- Colocar el filtro radiactivo, seco y montado sobre una hoja de papel filtro, en un estuche para película de rayos X (Kodak X-AR5).

2.- Si la señal radiactiva es débil (< de 500 cpm medida en un minimonitor) colocar las pantallas intensificadoras y colocar el sistema para autoradiografía en un congelador a -70°C toda la noche. Si la señal es intensa el sistema de autoradiografía se coloca a temperatura ambiente durante 6 horas.

3.- Revelar y lavar.

4.- Secar la película a temperatura ambiente, suspendida en un soporte que no la toque extensamente para evitar que se manche.

EJEMPLOS DE ALGUNOS DESORDENES GENETICOS
DIAGNOSTICADOS CON TECNOLOGIA DE ADN RECOMBINANTE.

DIAGNOSTICO PRENATAL DE FENILCETONURIA CLASICA.

El metabolismo es la suma de todos los procesos físicos y químicos involucrados en el crecimiento, mantenimiento y transformación de sustancias en los sistemas vivos.

Todos los procesos bioquímicos están bajo control genético y consisten de una secuencia compleja de reacciones químicas en que cada paso de una vía metabólica está catalizada por una enzima de manera que, cuando tenemos un gene defectuoso, la actividad enzimática específica requerida está ausente o deficiente y el proceso normal es bloqueado, resultando en efectos fenotípicos de mayor o menor consecuencia.

Los genetistas Beadle y Tatum en 1941 establecieron el concepto de un gene - una enzima, de manera que la mutación de un simple gene puede producir una alteración solamente en la proteína específica para la cual es responsable. Sin embargo, si esta proteína controla una reacción crítica en una vía, también puede afectar la calidad o cantidad de otras reacciones (Figura No. 9).

En 1902 Garrod describió la existencia de algunas alteraciones a las cuales llamó "errores innatos del meta

bolismo", causadas por deficiencia hereditaria de una enzima específica que provocaba disturbios metabólicos resultando en la acumulación de cantidades anormales de algún intermediario metabólico normal, lo cual daba lugar al síndrome clínico característico.

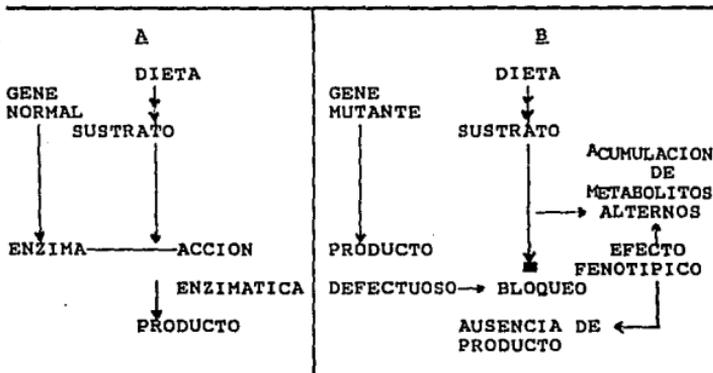


Figura No. 9.- A) Vía metabólica normal.
B) Efecto de un gen defectuoso en la vía metabólica normal.

Hay muchos desórdenes hereditarios debidos a un error innato del metabolismo y la mayoría de las veces el modo de herencia es autosómico recesivo. De esta manera, si el gen es responsable de una enzima esencial y el individuo tiene los dos genes normales (homocigoto normal) la enzima es producida en cantidades normales. El

heterocigoto, quien tiene solamente un gene con efecto normal producirá la enzima en cantidades suficientes para realizar la función metabólica bajo circunstancias normales. El individuo homocigoto anormal o mutante que hereda un gene defectuoso de ambos padres no tendrá enzima funcionante y estará clínicamente afectado.

La fenilcetonuria es un claro ejemplo de un error innato del metabolismo. La primera descripción de la fenilcetonuria fue realizada por el bioquímico noruego Asbjörn Fölling en 1934 cuando reportó que un grupo de pacientes con retraso mental excretaron fenilpiruvato en la orina y tuvieron altos niveles de fenilalanina tanto en orina como en suero, el llamó a la enfermedad "imbecilitas fenilpiruvica". Penrose y Quastel en 1937 introdujeron el nombre de fenilcetonuria.

La fenilcetonuria clásica es un desorden del metabolismo del aminoácido fenilalanina debido a un defecto en la enzima fenilalanina hidroxilasa que convierte fenilalanina a tirosina en la primera fase de su metabolismo, por lo cual la fenilalanina es degradada por una vía alternativa la cual produce ácido fenilpirúvico y otros metabolitos en cantidades anormalmente elevadas, los cuales son excretados en la orina (Figura No. 10).

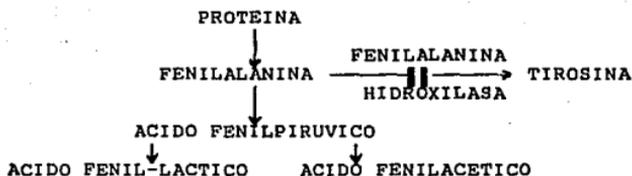


Figura No. 10.- Vías metabólicas de la fenilalanina.

Es una enfermedad transmitida como un carácter autosómico recesivo y se cree que tiene una incidencia de 1 en 10,000 nacimientos en Estados Unidos, de tal manera que la incidencia del acarreador (heterocigoto) es de 1 en 50 (Thompson y Thompson, 1973).

Las principales manifestaciones clínicas que presentan los individuos afectados son: retraso mental, microcefalia e hipopigmentación.

La importancia de la detección prenatal está relacionada con la necesidad de administrar un tratamiento inmediatamente después del nacimiento (dieta baja en fenilalanina) evitando de esta manera el efecto irreversible del retraso mental por acumulaciones tóxicas de metabolitos anormales en el cerebro (Thompson y Thompson, 1973).

Como la fenilalanina hidroxilasa es una enzima hepática y no está presente en el suero del feto o en células

del fibroblasto del embrión, se carecía de una metodología para el diagnóstico prenatal de este desorden hereditario hasta que Woo y colaboradores en 1983 establecieron una técnica para el diagnóstico prenatal (Woo et al., 1983).

Robson y col. en 1982 purificaron el ARNm de la enzima fenilalanina hidroxilasa de hígado de rata por inmunoprecipitación de polisomas y a partir de este ARNm se obtuvo el ADN complementario. Este fue utilizado como una sonda de hibridación específica para identificar el ARNm humano correspondiente a la fenilalanina hidroxilasa. Con el ARNm humano usado como sonda se estudió una biblioteca de ADN complementario de hígado humano para obtener el ADN complementario correspondiente. Este ADN complementario humano fue clonado y usado para analizar el locus de la fenilalanina hidroxilasa en pacientes con fenilcetonuria clásica (Robson et al., 1982) (Cuadro No. 10).

Se realizaron estudios con ADN genómico de pacientes fenilcetonúricos digerido con varias enzimas de restricción y tres de esas enzimas (Sph I, Msp I y Hind III) permitieron descubrir patrones polimórficos por el análisis mediante la técnica de Southern (Woo et al., 1983).

Cuadro No. 10.- Pasos para la obtención de una sonda de ADN complementario humano, para el análisis de la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa humana (según Robson et al., 1982).

- 1.- Obtener ARNm de fenilalanina hidroxilasa a través de inmunoprecipitación de polisomas de rata.
 - 2.- Sintetizar ADN complementario de rata.
 - 3.- Clonación del ADN complementario de rata.
 - 4.- Hibridación del ADN complementario de rata con ARNm de fenilalanina hidroxilasa humano.
 - 5.- El ARNm humano de fenilalanina hidroxilasa es utilizado para sondear una biblioteca de ADN complementario de hígado humano (40,000 transformantes independientes).
 - 6.- Aislar ADN de plásmidos recombinantes de colonias bacterianas que dieron señales de hibridación fuertes.
 - 7.- Este ADN complementario humano es utilizado como sonda para el análisis en pacientes fenilcetonúricos
-

En 1984, Woo y col. analizaron a 7 familias danesas fenilcetonúricas con uno o dos niños afectados y uno no afectado. El ADN se obtuvo de linfocitos y fue analizado por la técnica de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), utilizando la enzima de restricción Sph I, obteniéndose un resultado que sugería que el diagnóstico prenatal se podía realizar en familias fenilcetonúricas (Figura No. 11) (Ledley et al., 1984).

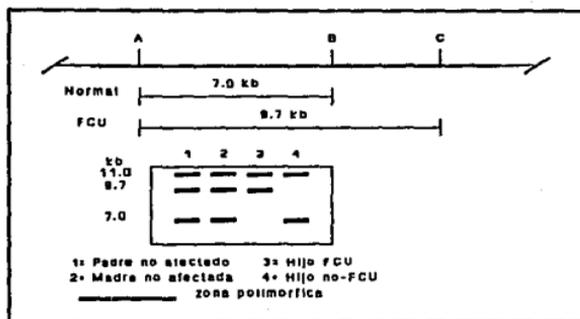


FIGURA No. 11.- Región del gene de la fenilalanina hidroxilasa y el modelo de análisis de restricción. A,B y C corresponden a sitios de reconocimiento de la enzima Sph I. B es la región donde existe un cambio de base que previene el reconocimiento con la enzima de restricción.

Interpretación de los resultados:

- 1.- La enzima de restricción Sph I reconoce un hexanucleótido con una secuencia de GCATGC.
- 2.- En un individuo con dos genes normales, la enzima cortará en los tres sitios marcados como A,B,C, dando un patrón similar al del hijo no fenilcetonúrico.
- 3.- En un individuo con dos genes anormales donde se presenta un polimorfismo en la zona oscura de la figura, la enzima cortará los sitios marcados como A y C y dará un patrón similar al del hijo fenilcetonúrico.

4.- En un individuo con un gene no polimórfico (normal) y un gene polimórfico (anormal) la enzima cortará en el gene no polimórfico en los tres sitios A,B,C, y en el gene polimórfico sólo en dos sitios A y C, y dará un modelo similar al de los padres no afectados pero que son portadores del gene anormal (heterocigotos).

En familias caucásicas se han identificado 10 sitios de restricción polimórficos en el locus de la fenilalanina hidroxilasa y estos marcadores polimórficos segregan de acuerdo con el fenotipo de la fenilcetonuria clásica (Lidsky et al., 1985a).

Las mutaciones responsables de otros tipos de hiperfenilalaninemia, tales como deficiencia de la dihidropteridín reductasa y anormalidades en la vía de síntesis de bipterina, probablemente se encuentran en otros sitios del gene (Lidsky et al., 1985b).

Así, el diagnóstico prenatal es posible aproximadamente en un 90 % de las familias fenilcetonúricas en la población caucásica (Dalger et al., 1986).

DIAGNOSTICO PRENATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS.

Las hemoglobinopatías producen un modelo de enfermedades genéticas que ofrecen un claro entendimiento de las mutaciones y la aplicación práctica de este conocimiento para el diagnóstico de las enfermedades en una comunidad (Davies, 1986).

Las hemoglobinopatías son enfermedades genéticas comunes y un problema de salud pública en muchas partes del mundo y por esta razón varios países están desarrollando programas de diagnóstico prenatal para la prevención de estos desórdenes, particularmente países desarrollados, debido al gran número de inmigrantes de áreas de alta incidencia (Weatherall *et al.*, 1985).

Son de las alteraciones más comunes como condiciones recesivas. Se estima la existencia aproximadamente de 240 millones de individuos heterocigotos en el mundo y cada año nacen alrededor de 200,000 afectados (Modell 1983).

La proteína más abundante en los glóbulos rojos es la hemoglobina, la cual está constituida de 4 subunidades y cada subunidad contiene una porción hemo y una cadena polipeptídica. Dos clases diferentes de polipéptidos se combinan para formar una molécula de hemoglobina normal. La hemoglobina adulta normal (HbA) está constituida de 2 cadenas alfa idénticas y 2 cadenas beta idénticas. La

cadena alfa contiene 141 residuos de aminoácidos y la cadena beta tiene 146 residuos de aminoácidos.

Existen cinco genes diferentes designados alfa, beta, gamma, delta y epsilon, los cuales dirigen la sinte^sis de cadenas polipeptídicas que conforman las diferentes hemoglobinas (Thompson y Thompson, 1973).

HEMOGLOBINAS NORMALES

FORMULA

Hb A	alfa 2 beta 2
Hb A ₁	alfa 2 delta 2
Hb F	alfa 2 gamma 2
Grower I	epsilon 4
Grower II	alfa 2 epsilon 2

Las talasemias son un grupo de anemias hereditarias en las cuales los eritrocitos tienen una apariencia de estructuras para "tiro al blanco". En estas condiciones la alteración se encuentra en la disminución de la sinte^sis de hemoglobina, específicamente en la síntesis de una cadena polipeptídica en particular.

Existen dos tipos principales de talasemias:

- A) La alfa-talasemia debido a una reducida síntesis de la cadena alfa y
- B) La beta-talasemia con una defectuosa producción de la cadena beta.

Ambas talasemias pueden ocurrir en la forma mayor (homocigótica) y en la forma menor (heterocigótica) (Thompson y Thompson, 1983).

El nombre de talasemia deriva del griego thalasso, mar, y significa que la enfermedad fue descubierta primero en personas del Mediterráneo. La distribución geográfica es característica: el Mediterráneo, Italia, India y el oriente cercano y lejano (Modell 1983).

En las talasemias menores sólo se tiene un gene defectuoso, por lo tanto se tiene suficiente producción de hemoglobina y las manifestaciones del desorden generalmente no se observan.

En las talasemias mayores se producen anemias de severas a fatales. En la alfa-talasemia mayor el feto presenta una anemia intrauterina severa con hidrops fetalis y muerte intrauterina o neonatal (Modell 1983).

La beta-talasemia mayor generalmente se desarrolla durante el primer año de vida habiendo alteraciones en el desarrollo de los huesos del cráneo (Modell 1983).

Los genes de la cadena alfa se encuentran en el brazo corto del cromosoma 16, mientras que los genes de las cadenas beta, gamma, delta y epsilon se hallan en el brazo corto del cromosoma 11 (Antonarakis et al., 1985).

En la secuencia de ADN del gene de la beta-globina existen una gran cantidad de polimorfismos y éstos se re-

fieren a variaciones neutras en el ADN. Estos polimorfismos introducen o remueven sitios de restricción, dando así un método directo para el análisis de ADN.

Wainscoat y col. en 1984 describieron un polimorfismo para la enzima de restricción Ava II en el gene de la beta-globina (Figura No. 12).

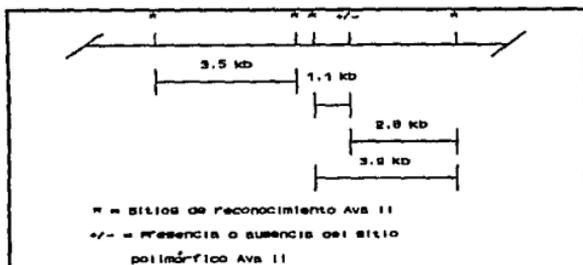


Figura No. 12.- Diagrama mostrando los sitios de corte de la enzima Ava II en la región del gene de la beta-globina y los fragmentos resultantes

El sitio polimórfico generalmente está ausente en cromosomas beta-talasémicos de origen mediterráneo y casi siempre está presente en cromosomas normales.

Quando las muestras de ADN fueron digeridas con la enzima de restricción y los fragmentos obtenidos separados y transferidos a filtros de nitrocelulosa e hibridados con una sonda específica, el patrón observado se muestra en la figura No. 13.

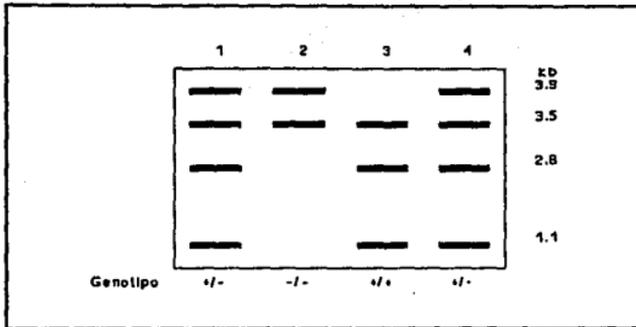


Figura No. 13.- Autoradiografía de muestras de ADN digeridas con Ava II. Los cromosomas normales dan fragmentos de 1.1 y 2.8 kb, mientras que los cromosomas talasémicos dan el fragmento de 3.9 kb.

La muestra 3 corresponde a un individuo homocigoto normal, la muestra 2 a un homocigoto anormal y las muestras 1 y 4 a heterocigotos.

En poblaciones del noreste de Italia la factibilidad del diagnóstico es entre el 70 y 90 % con este polimorfismo (Wainscoat, 1984).

En aquellos casos donde la mutación no está caracterizada, el diagnóstico prenatal puede realizarse por análisis de ligamiento de los sitios de restricción polimórficos dentro del gene de la β -globina. Sin embargo, este

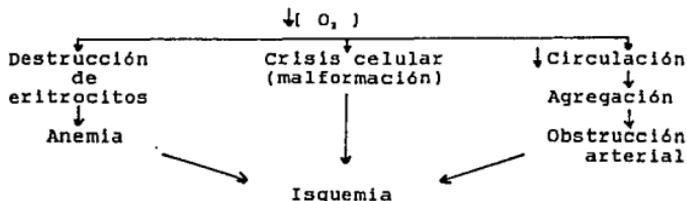
análisis por ligamiento sólo puede ser aplicado cuando los cromosomas β -talasémicos y normales pueden ser identificados y siempre y cuando la pareja tenga un hijo normal o uno afectado para definir el ligamiento (Cao, 1986). Estos estudios consumen tiempo y es mejor realizarlos antes de nuevos embarazos (Alter, 1986).

El uso de sondas de oligonucleótidos puede evitar el consumo de tiempo cuando ya se conocen las mutaciones responsables de la mayoría de las beta-talasemias (Cao et al., 1986; Alter, 1986).

Existen otros métodos de diagnóstico prenatal de beta-talasemias como el análisis de distribución del tamaño de los glóbulos rojos a través de un analizador Coulter (Rosatelli et al., 1986), electroenfoque en gradientes de pH inmovilizado (Manca et al., 1986) y el uso de anticuerpos monoclonales (Allen et al., 1986). Sin embargo, son métodos con menor aplicación y sobre todo con problemas adicionales al tener que utilizar sangre fetal que debe ser obtenida en la décimo-octava semana de gestación con un riesgo de pérdida fetal mayor del 5 % (Alter, 1986).

DIAGNOSTICO PRENATAL DE ANEMIA DE CELULAS FALCIFORMES.

La anemia de células falciformes es una enfermedad hemolítica severa caracterizada por una tendencia de los eritrocitos a tomar una forma de media luna bajo condiciones de baja tensión de oxígeno. Las manifestaciones clínicas incluyen anemia, ictericia, obstrucción vascular y la subsecuente isquemia tisular (Cuadro No. 11) (Kan y Dozy, 1978).



Cuadro No. 11.- Sintomatología clínica en la anemia de células falciformes por una baja presión parcial de oxígeno.

La enfermedad tiene una distribución geográfica característica, ocurriendo más frecuentemente en Africa equatorial. En los negros americanos, cerca del 0.25% nacen con esta enfermedad. Los individuos afectados son homocigotos para el gene mutante; los padres de los niños afectados son clínicamente normales, pero sus eritrocitos

se alteran cuando son sometidos a muy bajas presiones de oxígeno in vitro. Este estado heterocigoto se presenta aproximadamente en un 8 % en los negros americanos (Steinberg, 1984).

En 1959, V. M. Ingram descubrió que la diferencia entre la hemoglobina normal y la de células falciformes yacía en la cadena beta, existiendo el cambio de un aminoácido en la sexta posición de la cadena: valina por ácido glutámico. Esta sustitución en las dos cadenas beta de la hemoglobina de células falciformes es la única diferencia bioquímica y nos explica la diferencia en el comportamiento electroforético así como todas las manifestaciones clínicas (Thompson y Thompson, 1973).

Kan y Dozy en 1978 implementaron una técnica indirecta para el diagnóstico prenatal de esta enfermedad por análisis de ADN de células de líquido amniótico basándose en que, en los negros americanos, el gene está asociado en forma frecuente con un sitio de restricción de Hpa I que flanquea el gene de la cadena beta. Sin embargo, esta situación requiere de un estudio familiar para establecer el ligamiento con la enfermedad.

En 1982, Orkin y col. desarrollaron otra técnica de diagnóstico prenatal de la anemia de células falciformes por análisis de ADN de células de líquido amniótico, pero su análisis fue más directo y utilizaron la enzima de reg

tricción Mst II que rompe la secuencia CCTNAGG. Esta secuencia ocurre menos frecuentemente y requiere de 1 μ g de ADN para su análisis.

En 1984 Law y col. desarrollaron un método miniaturizado todavía más sensitivo y rápido utilizando el mismo principio que el equipo de Orkin.

Goossens y col. en 1983 desarrollaron en Francia una técnica para el diagnóstico de anemia de células falciformes usando la enzima de restricción Cvn I para analizar el ADN de vellosidades coriónicas, abriendo la posibilidad de un diagnóstico durante el primer trimestre del embarazo. Analizaron 5 casos de los cuales dos mostraron fetos con genotipo normal, uno con genotipo portador de la mutación y dos fetos con genotipo anormal. En la figura se puede observar la diferencia entre el modelo homocigoto anormal y el del portador (Figura No. 14).

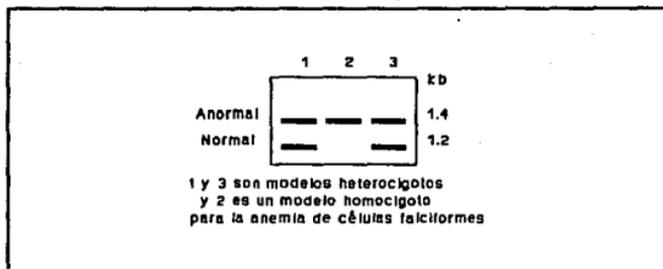


Figura No. 14.- Diagnóstico prenatal de la anemia de células falciformes. Modelo autoradiográfico de muestras de ADN obtenidas de la madre (1), padre (3) y feto (2).

La endonucleasa Cvn I (un isosquisómero de la enzima de restricción Mst II) rompe la secuencia CCTNAGG y produce fragmentos de ADN de diferentes longitudes para los genes normal y anormal. Estos son separados por electroforesis en gel y transferidos a un filtro de nitrocelulosa donde son hibridados con una sonda de ADN marcada. Esta sonda fue obtenida de un fragmento genómico de 1.2 kb de longitud a partir del sitio de reconocimiento de Cvn I en el sexto codón del gene de la β -globina al siguiente sitio de reconocimiento de Cvn I en la región flanqueadora en dirección 5' (Figura No. 15) (Goossens et al., 1983).

Con este estudio se demostró que la biopsia de vello

sidades coriónicas es útil para el diagnóstico prenatal de la anemia de células falciformes a través del uso de una endonucleasa de restricción específica para el sitio mutado, o sea, en un caso donde el defecto molecular responsable del desorden altera al mismo tiempo un sitio de restricción.

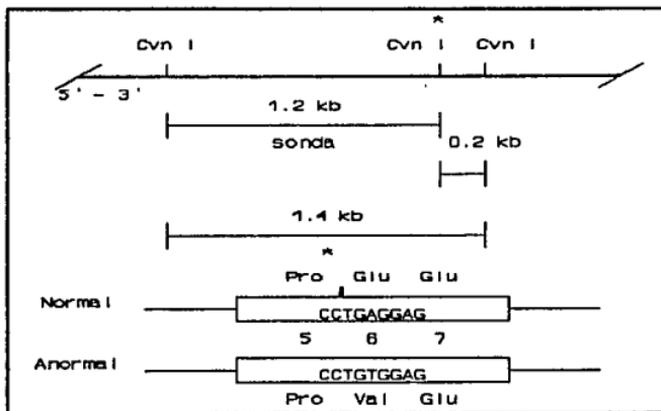


Figura No. 15.- Sonda de ADN obtenida de un fragmento genómico de 1.2 kb de longitud.

**DIAGNOSTICO DE LA DEFICIENCIA DE ORNITIN
TRANSCARBAMILASA.**

En los mamíferos, la ornitín transcarnbamilasa es una enzima que se localiza en la matriz mitocondrial de los hepatocitos. Es un trímico de subunidades idénticas y cataliza la segunda etapa del ciclo de la urea, la condensación del fosfato de carbamilo con ornitina para formar citrulina. Es una enzima codificada en el núcleo, traducida en los polirribosomas del citoplasma y después transportada hacia el interior de la mitocondria por un proceso dependiente de energía (Horwich et al., 1984).

El gene de la ornitín transcarnbamilasa se encuentra codificado en el cromosoma X y su deficiencia da como resultado una característica intoxicación con amoniaco, intolerancia a proteínas y retraso mental; es común la muerte de niños varones hemiciotos afectados (el término hemicioto se aplica sólo al cromosoma X en varones) (Rozen et al., 1985).

El diagnóstico prenatal por amniocentesis no es posible porque la ornitín transcarnbamilasa no está expresada en amniocitos y no hay productos metabólicos en este desorden que puedan ser observados en el líquido amniótico. La biopsia fetal se ha realizado en algunas familias en riesgo pero los peligros inherentes a este procedimiento limitan severamente su utilidad (Rozen et al., 1985).

Fox y col. en 1986 lograron hacer diagnóstico prenatal mediante el empleo de polimorfismos en la longitud del fragmento de restricción para el locus de la ornitín transcarbamilasa en dos familias donde las mujeres estaban en riesgo de tener hijos con deficiencia.

En una familia se estudiaron dos embarazos consecutivos. El primero fue diagnosticado como alterado mientras que el segundo se diagnosticó como normal. En la segunda familia el feto fue diagnosticado afectado y fue confirmado por un ensayo directo de la actividad de la ornitín transcarbamilasa en el hígado fetal obtenido después de terminado el embarazo (Fox et al., 1986).

En la primer familia, el ADN de la mujer mostró corresponder a un heterocigoto para el polimorfismo identificado con la enzima Msp I el cual se caracterizó por dos bandas en 5.1 kb y 4.4 kb (Figura No. 16 carril 3). Se obtuvo muestra de ADN de un hijo nacido vivo pero afectado y que murió más tarde y de un niño afectado que abortó a la décimo-novena semana de embarazo. Cada uno de estos hijos afectados mostraron la banda de 4.4 kb pero no el fragmento de 5.1 kb (Figura No. 16 carril 1 y 2 respectivamente). Así, en esta familia se estableció que la deficiencia de la ornitín transcarbamilasa está ligada al cromosoma X que porta la banda de 4.4 kb.

En el quinto embarazo, el análisis de ADN reveló úni

camente la banda 4.4 kb indicando que el feto varón estaba afectado (Figura No. 16 carril 4).

El análisis de ADN durante un sexto embarazo reveló la presencia de la banda 5.1 kb y la ausencia del fragmento 4.4 kb, indicando que el feto varón no estaba afectado por la deficiencia de la ornitín transcarbamilasa (Figura No. 16 carril 5).

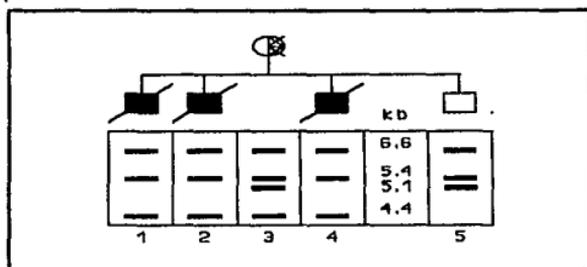


Figura No. 16.- Pedigree y análisis de Southern para la familia 1 afectada por deficiencia de la ornitín transcarbamilasa. Las muestras de ADN fueron digeridas con Hsp I e hibridadas con una sonda de ADN complementario de la ornitín transcarbamilasa humana marcada con ³²P. La deficiencia está asociada al fragmento de 4.4 kb en esta familia.

En la familia 2 el análisis de ADN de la madre identificó a un heterocigoto para el polimorfismo descubierto por la endonucleasa Bam HI y caracterizado por bandas de 18.0 kb y 5.2 kb (Figura No. 17 carril 2).

El análisis de ADN de un niño nacido vivo y muerto más tarde mostró únicamente la banda de 5.2 kb (Figura No. 17 carril 1); indicando que en esta familia la deficiencia de la ornitín transcarbamilasa está ligada al cromosoma X portador de la banda 5.2 kb. El análisis de ADN fetal durante un segundo embarazo también presentó únicamente la banda de 5.2 kb, indicando que el feto estaba afectado por la deficiencia de la enzima (Figura No. 17 carril 3). El embarazo fue terminado a la semana vigésimo primera. Se realizó biopsia fetal, se midió la actividad de la enzima ornitín transcarbamilasa y se encontró muy por abajo del valor normal, confirmando el diagnóstico prenatal (la actividad de la enzima en 2 determinaciones dió valores por abajo de 0.4 unidades; el rango normal en fetos de 16 a 21 semanas de gestación ha sido reportado entre 10.7-19.4 unidades) (Holzgreve y Golbus, 1984).

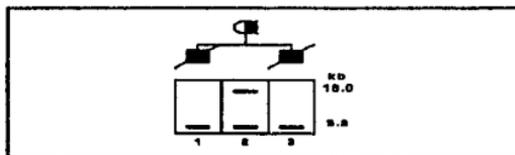


Figura No. 17.- Pedigree y análisis de Southern para la familia 2. Las muestras de ADN fueron digeridas con la enzima Bam HI e hibridadas con una sonda de ADN complementario de la ornitín transcarbamilasa.

El diagnóstico de mortalidad para ornitín transcarbamilasa en fetos varones en riesgo se ha hecho en base a los polimorfismos del ADN (Old et al., 1985).

Como el análisis de los polimorfismos en la longitud del fragmento de restricción no identifica una mutación específica general en el locus de la ornitín transcarbamilasa, la detección correcta de mujeres portadoras de la deficiencia es esencial para poder establecer el diagnóstico prenatal. Una vez que se diagnostica a un miembro afectado de la familia, es necesario intentar determinar el estado portador de la madre en riesgo. La detección del estado portador en ausencia de una historia familiar positiva es un problema importante (Fox et al., 1986).

Algunos polimorfismos son informativos única y exclusivamente en algunas familias, para otras pueden no ser informativos y se tiene que seleccionar otro juego de endonucleasas que generen resultados informativos (Fox et al., 1986).

En esta deficiencia se ha observado una frecuencia alta de mutaciones nuevas. Esto, en conjunto con la variabilidad en la severidad del defecto entre las diferentes familias, sugiere que las mutaciones son de naturaleza heterogénea (Old et al., 1985).

Los estudios bioquímicos han mostrado que la deficiencia puede ser causada por una insuficiencia cuantita-

tiva de la enzima o por anomalías en la afinidad o cinética de la reacción (Saheki et al., 1984).

Maddalena y col. en 1988 estudiaron un paciente (niño de 6 años) con deficiencia moderada de ornitín transcarbamilasa y los resultados del análisis de ADN fueron interpretados como la presencia de una deleción de una porción sustancial del gene de la ornitín transcarbamilasa. Sin embargo, el problema se resolvió al detectar un gene de ornitín transcarbamilasa intacto en una población celular separada. De esta manera, se concluyó que este paciente tuvo un mosaicismo para la deficiencia de la ornitín transcarbamilasa. Este caso de mosaicismo pudo ser detectado por la gran cantidad de sondas de ADN disponibles para la detección del gene de la enzima (un paciente con un mosaicismo significa que es un individuo que puede tener 2 o más líneas celulares con diferente número de cromosomas) (Maddalena et al., 1988).

Del paciente se tomaron muestras de piel y sangre periférica a la edad de 5 años y 10 meses. El ADN fue preparado directamente de la sangre, de fibroblastos primarios, de linfoblastos transformados (LBL-644) y de una línea celular linfoblastoide subclonada (LBL421A) obtenida de células del paciente a la edad de 4 años y 2 meses.

El ADN fue digerido con la endonucleasa Hind III y sondeado con un fragmento ADN complementario que tiene

la secuencia codificadora completa para el gene de la ornitín transcarbamilasa. Los resultados obtenidos después de la autoradiografía son mostrados en la Figura No. 18.

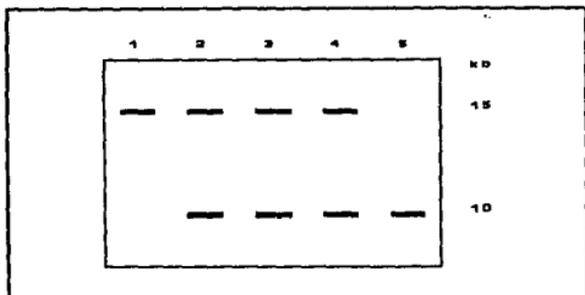


Figura No. 18.- Autoradiografía presentando los fragmentos de ADN correspondientes a los genes OTC en varios tejidos del paciente.
 Carril 1, muestra de ADN control.
 Carril 2, línea de fibroblastos del paciente.
 Carril 3, sangre periférica reciente.
 Carril 4, linfoblastos transformados (LBL-644).
 Carril 5, línea linfoblastoide subclonada (LBL-421A) (subpoblación celular portadora del gene anormal).

A través de estos resultados en que aparecen las dos bandas, normal (15 kb) y anormal (10 kb) en unas líneas celulares y la derivación de una subpoblación celular llevando solamente el gene OTC afectado probaron conclusivamente el mosaicismo en este paciente. Posteriormente,

a través de otros estudios se encontró que varió la proporción relativa de los 2 fragmentos Hind III entre diferentes tejidos, apoyando nuevamente el diagnóstico de mosaicismo del paciente para el gene OTC (Maddalena et al., 1988).

La existencia de 2 poblaciones celulares, una con deleción en OTC y otra normal, sugiere que la deleción ocurrió como resultado de un error mitótico en el embrión (Maddalena et al., 1988).

DIAGNOSTICO PRENATAL DE LA COREA DE HUNTINGTON.

Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante. El nombre de la enfermedad se debió a George Huntington que en 1872 describió en forma completa la enfermedad.

Clinicamente la enfermedad puede manifestarse en dos formas diferentes:

- a) la forma de corea clásica y
- b) la forma rígida.

La forma de corea consiste generalmente en movimientos involuntarios anormales (corea), acompañados por deterioro intelectual (demencia) y disturbios psiquiátricos (Conneally, 1984). Los movimientos son característicos, aumentan con el tiempo y en las fases tardías de la enfermedad parecen grotescos.

La forma rígida, a menudo referida como variante Westphal, involucra rigidez muscular, lentitud de movimientos, tremor. El deterioro mental es similar en ambos casos (Conneally, 1984).

En la fase final de la enfermedad los pacientes no pueden realizar sus funciones en forma independiente y requieren de un soporte completo en todas las actividades de la vida diaria.

Las causas más comunes de muerte son las enfermedades cardiovasculares y neumonía (Conneally, 1984). El com

portamiento suicida también es una causa común de muerte (Hayden et al., 1980).

Las manifestaciones clínicas pueden ocurrir en cualquier tiempo desde el período neonatal hasta los 70 años o más. Sin embargo, la edad en que se presentan los síntomas clínicos en el 50% de los genotipos susceptibles de desarrollar la enfermedad es alrededor de los 40 años (Figura No. 19) (Reed y Chandler, 1958).

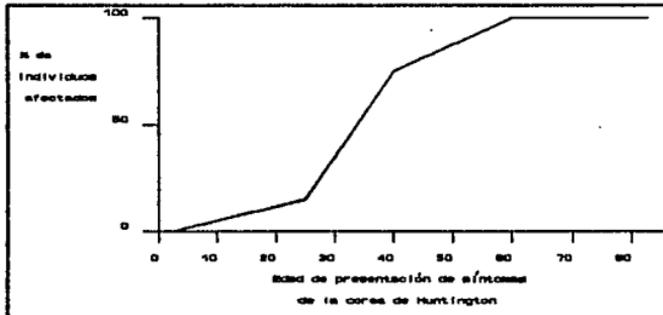


Figura No. 19.- Edad de presentación de la corea de Huntington. A la edad de 40 años la enfermedad se manifiesta en aproximadamente la mitad de los individuos genéticamente susceptibles.

La prevalencia de la enfermedad de Huntington es aproximadamente de 10 por 100,000 en muchas poblaciones caucásicas (Gusella et al., 1984; Robertson, 1983;

Bird, 1985).

Las investigaciones en el área de la neuroquímica han encontrado varias diferencias entre los pacientes con la enfermedad de Huntington y controles. Se han observado cantidades disminuidas de neurotransmisores como dopamina gaba, acetilcolina transferasa y algunos péptidos como la sustancia P y la enzima convertidora de la angiotensina en áreas específicas del cerebro en pacientes con la enfermedad (Barbeau, 1979).

Si todos los individuos afectados se abstuvieran de la reproducción, un desorden dominante se podría erradicar en la primera generación y sólo aquellos casos causados por nuevas mutaciones evitarán la completa desaparición de la enfermedad. Sin embargo, las personas susceptibles no saben si ellos son portadores del gene afectado hasta que han pasado su período reproductivo; de aquí la importancia de su detección.

Como ya se ha mencionado, la tecnología de ADN recombinante provee de un método para la obtención de marcadores genéticos que permitan el monitoreo de diferencias heredables en la secuencia de ADN genómico. Estos marcadores son precisamente los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción. Como ya se mencionó, los polimorfismos del ADN pueden ser encontrados tanto en regiones codificadoras o no del genoma (Gusella

et al., 1983).

Gusella y col. identificaron un fragmento de ADN anónimo, del cromosoma 4 humano que permite detectar dos polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción al digerir el ADN con la endonucleasa Hind III. El marcador muestra un ligamiento genético muy cercano al gene de la enfermedad de Huntington (Gusella et al., 1983; Gusella et al., 1985).

El estudio lo realizaron en dos familias diferentes: una norteamericana y otra venezolana.

De los marcadores utilizados, sólo el G8 sugirió ligamiento al gene de la enfermedad de Huntington a una distancia de 4 cM del locus del gene (Folstein et al., 1985).

La clona G8 es un bacteriófago recombinante con 17 kb de ADN humano libre de secuencias repetitivas. La sonda detectó dos fragmentos invariables y varios variables de ADN genómico humano digerido con Hind III.

Para determinar la base de la variación se realizó un mapeo de restricción de la clona G8 con la enzima de restricción Eco RI y se obtuvo un fragmento de 5.5 kb que fue subclonado y utilizado como sonda contra el ADN genómico digerido con Hind III, dando los resultados mostrados en la figura No. 20. Si los sitios polimórficos en el mapeo de ADN están tan cercanos que la frecuencia de

recombinación entre ellos es despreciable, se dice que ellos son heredados juntos como una unidad. Esta unidad establecida sobre un cromosoma puede ser considerada como un haplotipo (un haplotipo está constituido de dos subloci, cada uno con especificidades antigénicas diferentes, que se transmiten como una unidad de los padres a los hijos) (Thompson y Thompson, 1973).

Las cuatro posibles combinaciones de los alelos en los dos sitios polimórficos se muestran en la figura No. 20.

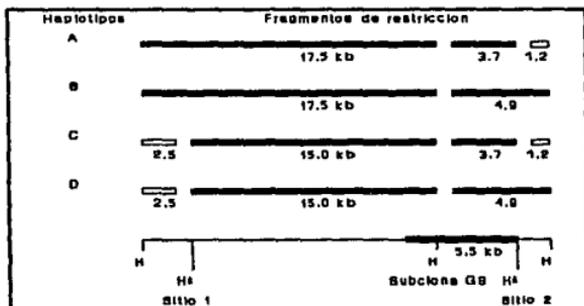


Figura No. 20.- Haplotipos en el locus G8. El marcador resulta de la detección de 2 sitios polimórficos Hind III, cada uno dando dos posibles alelos (presencia o ausencia del sitio). La combinación de alelos de cada uno de estos sitios es referido como haplotipo. Los segmentos oscuros corresponden a los fragmentos detectados con la sonda (subclona G8). (La subclona G8 proviene de la sonda G8 de 17.6 kb corta con la endonucleasa Eco RI y contiene 5.5 kb).

Cada haplotipo tiene una frecuencia significativa en la población general, haciendo de la subclona G8 un locus de cuatro alelos altamente informativo (Gusella et al., 1984).

El descubrimiento de este marcador ligado a la enfermedad de Huntington tiene varias implicaciones:

1) La tipificación de familias con la enfermedad muestra que el gene responsable está localizado sobre el cromosoma 4, en la parte distal del brazo corto.

2) Se puede estudiar la frecuencia de nuevas mutaciones en el gene responsable de la enfermedad (tiene una baja frecuencia de mutación).

3) Se debe buscar otro marcador polimórfico del otro lado del gene responsable de la enfermedad, de manera de poder intentar la clonación del gene implicado en la enfermedad de Huntington.

DIAGNOSTICO PRENATAL DE LA DEFICIENCIA DE LA ALFA-1-ANTITRIPSINA.

La α -1-antitripsina es una proteína sérica de la fracción α -1 que inhibe la actividad de la tripsina y de otras enzimas proteolíticas (Thompson y Thompson, 1973).

El interés clínico radica en que la deficiencia se encuentra presente en muchos pacientes con enfermedades hepáticas y pulmonares (Thompson y Thompson, 1973).

Esta proteína es sintetizada en el hígado y su sitio primario de acción fisiológica es en la estructura alveolar del pulmón (Laurell y Erikson, 1965).

La α -1-antitripsina actúa inhibiendo la elastasa de los leucocitos, protegiendo de la hidrólisis las fibras elásticas de las paredes alveolares. Cuando existe un desequilibrio entre los niveles de α -1-antitripsina y elastasa, de manera que ésta última se encuentre en exceso, ocurre un daño permanente a la estructura alveolar del pulmón, resultando en un desarrollo eventual de enfisema pulmonar. Así, aquellos individuos que sufren de una deficiencia genética de la enzima están predispuestos a esta enfermedad degenerativa de pulmón con un riesgo de 20 a 30 veces mayor que la población general (Kidd et al., 1983; Cox y Mansfield, 1985).

La severidad de la enfermedad en individuos deficientes es influenciada directamente por factores ambientales

como inhalantes industriales y humo de cigarrillo (Kidd et al., 1983).

Existen alrededor de 30 fenotipos diferentes de la proteína. La mayoría de los individuos son homocigotos mostrando el fenotipo normal M, los individuos que muestran el fenotipo homocigoto Z sufren de una severa deficiencia de la α -1-antitripsina. Este caracter es heredado en forma autosómica recesiva. Los demás fenotipos resultan con niveles normales de la enzima (Kidd et al., 1983).

Se ha estimado que en los individuos caucásicos uno de cada 2,000 son homocigotos Z y un 5% son portadores del gene Z (Kidd et al., 1983; Cox et al., 1985).

La prevalencia del fenotipo Z en blancos norteamericanos es de uno en 7,600 (Cox et al., 1976).

La base de la deficiencia es la sustitución del residuo de ácido glutámico en la posición 342 de la proteína tipo M normal por un residuo de lisina en la proteína tipo Z, anormal (Yoshida et al., 1976).

La estructura molecular del gene α -1-antitripsina en el cromosoma humano se muestra en la figura No. 21. El gene mide aproximadamente 10 kb de longitud, consistiendo de 5 exones separados por 4 intrones. La mutación se localiza en el exón 5, contenido dentro del fragmento de 2.4 kb producido por digestión del ADN con las endonucleasas

de restricción Hind III y Xba I (Kidd et al., 1984).

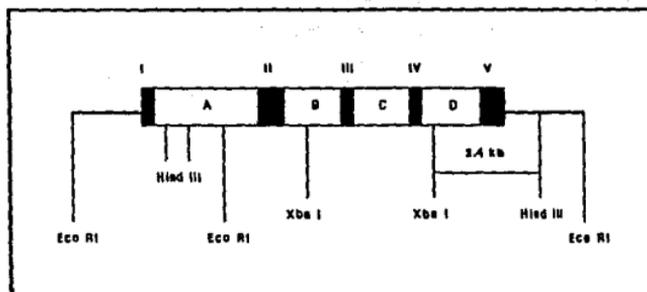


Figura No. 21.- Estructura del gene α -1-antitripsina mostrando el fragmento de restricción Hind III + Xba I de 2.4 kb.

Kidd y col. en 1983 sintetizaron sondas de oligonucleótidos complementarios a los genotipos M y Z del gene α -1-antitripsina las cuales fueron utilizadas para el diagnóstico prenatal de la deficiencia de la enzima en dos familias, obteniendo los resultados mostrados en las figuras No. 22 y 23 (Kidd et al., 1984).

El diagnóstico prenatal de los dos fetos fue confirmado después del nacimiento.

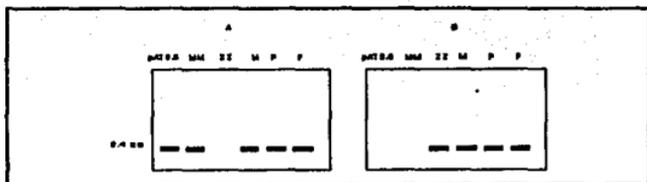


Figura No. 22.- Análisis de ADN de la familia 1 digerido con Hind III/Xba I e hibridado con oligómeros M (A) y Z (B). El gene clonado α -1-antitripsina está representado por pAT9.6. MM y ZZ representan homocigotos controles de ADN. M es madre, P es padre y F es el feto.

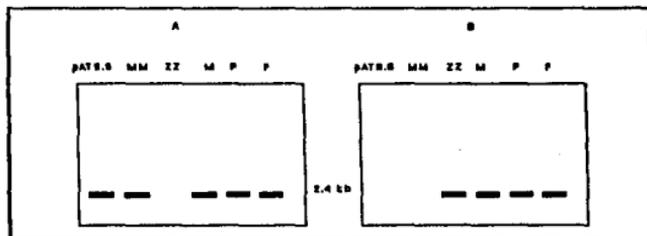


Figura No. 23.- Análisis de ADN de la familia 2 digerido con Hind III/Xba I e hibridado con oligómeros M (A) y Z (B). El gene clonado α -1-antitripsina está representado por pAT9.6. MM y ZZ representan homocigotos controles de ADN. M es madre, P es padre y F es el feto.

Este método de análisis directo del sitio de mutación en el gene de la α -1-antitripsina puede diagnosticar

los fenotipos MM, ZZ y MZ. Sin embargo, si hay un polimorfismo o una mutación silenciosa en el ADN del gene normal, debido a la degeneración del código genético, un feto MZ puede ser diagnosticado como homocigoto ZZ. Esta remota posibilidad puede ser eliminada con la inclusión dentro del análisis del ADN de los padres, de tal manera que si el genotipo de los padres, siendo MZ o MM, es caracterizado como ZZ por la prueba, entonces ello será una fuerte indicación de la presencia de un polimorfismo o una mutación en la región del gene α -1-antitripsina (Kidd et al., 1984).

En 1986 Cox y Billingsley así como Hejtmancik y col. en 1986 hicieron una comparación del método anterior con el método de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción hibridado con una sonda genómica marcada. La sonda es un fragmento de 6.5 kb obtenido del gene por digestión con Bam HI. Los 2 métodos dieron resultados idénticos.

Las ventajas del análisis por polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción son:

- a) es una técnica más simple,
- b) raramente necesita repetirse,
- c) los resultados se obtienen 7-10 días después del muestreo (sin cultivo celular),
- d) requiere menor cantidad de ADN.

CONCLUSIONES:

- 1.- Con las técnicas de ADN recombinante es posible el diagnóstico prenatal de una gran variedad de enfermedades genéticas.
- 2.- Con estas técnicas se tiene la ventaja de identificar directamente el gene afectado en lugar de basarse en el producto del gene.
- 3.- Existe la posibilidad de crear alguna sonda de ADN complementario que nos ayude en el diagnóstico prenatal, conforme se van describiendo los defectos bioquímicos de la enfermedad.
- 4.- El muestreo de vellosidades coriónicas es un fuerte sustituto de la amniocentesis como fuente de ADN para el diagnóstico prenatal.
- 5.- La posibilidad de contaminación de la toma de muestra de vellosidades coriónicas con células maternas es mínima.
- 6.- Cuando la muestra de ADN es insuficiente para realizar el examen, existe la posibilidad de amplificar in vitro aquella porción del gene que contiene el sitio dañado.
- 7.- Las reacciones de amplificación de ADN in vitro ya se encuentran automatizadas.

- 8.- La introducción de la técnica del "random primer extension" en sustitución de la técnica de "nick translation" para la producción de sondas marcadas, ha dado pautas en la obtención de ADN de alta actividad específica con mejores rendimientos.
- 9.- Una posible limitación de estos métodos en cuanto a su aplicación rutinaria es el empleo de isótopos radiactivos. Sin embargo, el uso de nucleótidos biotinilados incorporados a la sonda como marca podría permitir un medio alternativo para la detección de anomalías genéticas sin el uso de marcas radiactivas cuando se alcance un grado de sensibilidad similar a los métodos radiactivos.
- 10.- La técnica de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) es una poderosa técnica indirecta para la detección de anomalías genéticas cuando no se conoce la mutación, pero se conoce la posición sobre el mapa genético de manera que sigven exclusivamente como marcadores genéticos para mostrar la transmisión de la región del gene a través de una familia.
- 11.- Los marcadores genéticos (RFLP) necesitan estar intiamente ligados al locus defectuoso de tal manera que sean heredados juntos como una unidad a lo largo de la descendencia.

- 12.- Los marcadores genéticos (RFLP) deben ser informativos, esto se refiere a que exista un desequilibrio entre la población afectada y la población control.
- 13.- Para poder usar oligonucleótidos sintéticos como sondas de hibridación se debe tener información de la secuencia de aminoácidos del producto.
- 14.- El diagnóstico individual por esta metodología tiene un precio elevado, sin embargo, al utilizarlo en gran escala conlleva a una disminución en su costo.

COMENTARIOS:

El uso de metodologías de ADN recombinante para diagnosticar enfermedades genéticas continúa con un rápido desarrollo, muchas enfermedades y predisposiciones genéticas a enfermedades están siendo mapeadas diariamente, por ejemplo, los genes involucrados en el metabolismo del colesterol, como varias formas de receptores de lipoproteínas de baja densidad (Brown y Goldstein, 1986) o los genes de Apo B, C y E (Shoulders y Baralle, 1986), son factores que predisponen a enfermedades de las arterias coronarias.

Existen enfermedades donde la mutación precisa no se puede predecir y el análisis genético tiene que realizarse en familias afectadas y se sigue la herencia del gene mutante a través de marcadores genéticos, como es el caso de la distrofia muscular de Duchenne (Ionasescu *et al.*, 1986) y fibrosis quística (Farral *et al.*, 1986).

El diagnóstico de ciertas enfermedades infecciosas por técnicas de análisis de ácidos nucleicos ofrece muchas ventajas sobre las técnicas inmunológicas ya que se pueden ensayar factores de virulencia microbiana y genes que confieren resistencia a antibióticos, de tal forma, que ayudarán a una rápida selección del tratamiento apropiado (Caskey, 1987).

Con esta metodología también nos permite la detección de leucemias o cánceres en general, esto debido a la relativa facilidad con la cual las sondas de ADN pueden ser sintetizadas, de tal manera, que es posible diseñar reactivos basados en el análisis de secuencias de ADN para detectar recurrencias o diseminación de células tumorales con las alteraciones genéticas características (Landergren *et al.*, 1988).

Un avance tecnológico surgido es el método de amplificación de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa, con esta reacción se puede amplificar exponencialmente un segmento de ADN. En 25 ciclos de amplificación, la secuencia tratada aumenta aproximadamente 10^4 veces. Una vez realizada la amplificación del segmento de ADN, la secuencia de nucleótidos puede ser determinada (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988).

En México existen buenos equipos de trabajo en el área de biología molecular y algunos trabajan en el área de diagnóstico de enfermedades utilizando las metodologías presentadas, pero su estudio no es a nivel prenatal.

REFERENCIAS:

- Allen C., Weereratne H., Gale R., Beverley P.C.L. and Huehns E.R. (1987).
The use of monoclonal antibodies UCH β and UCH gamma for the antenatal diagnosis of beta-thalassaemia.
Br J Haematol 65: 199 - 203.
- Alter B.P. (1984).
Advances in the prenatal diagnosis of hematologic disease.
Blood 64: 329 - 340.
- Alter B.P. (1986).
Antenatal diagnosis of thalassemia: a review.
Ann N Y Acad Sci 445: 393 - 407.
- Antonarakis S.E., Kazazian H.H.Jr. and Orkin S.H. (1985).
DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters.
Hum Genet 69: 1 - 14.
- Bakketeig L.S., Eik-Nes S.H., Jacobsen G., Ulstein M.K., Brodtkorb C.J., Balstad P., Eriksen B.C. and Jørgensen N.P. (1984).
Diagnostic ultrasound in pregnancy.
Lancet ii: 744.
- Barbeau A. (1979).
Update on the biochemistry of Huntington's chorea.
Adv Neurol 23: 449 - 461.
- Besancon A.M., Belon J.P., Castelnaud L., Dumez Y. and Poenaru L. (1984).
Prenatal diagnosis of atypical Tay-Sachs disease by chorionic villi sampling.
Prenatal Diagn 4: 365 - 370.
- Bird S.J. (1985).
Presymptomatic testing for Huntington's disease.
JAMA 253: 3286 - 3291.
- Brock D.J. (1983).
Amniotic fluid tests for fetal neural tube defects.
Br Med Bull 39: 373 - 377.

- Brown M.S. and Goldstein J.L. (1986).
A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis.
Science 232: 34 - 47.
- Campbell S. and Pearce J.M. (1983).
Ultrasound visualization of congenital malformations.
Br Med Bull 39: 322 - 331.
- Cao A., Pirastu M. and Rosatelli C. (1986).
The prenatal diagnosis of thalassaemia.
Br J Haematol 63: 215 - 220.
- Casey J. and Davidson N. (1977).
Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplex at high concentrations of formamide.
Nucleic Acids Res 4: 1539
- Caskey C.T. (1987).
Disease diagnosis by recombinant DNA methods.
Science 236: 1223 - 1229.
- Conneally P.M. (1984).
Huntington disease: Genetics and epidemiology.
Am J Hum Genet 36: 506 - 526.
- Cox D.W., Hoepfner V.H. and Levison H. (1976).
Protease inhibitors in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the α -1-antitrypsin heterozygote controversy.
Am Rev Resp Dis 113: 601 - 606.
- Cox D.W. and Mansfield T. (1985).
Prenatal diagnosis for alpha-1-antitrypsin deficiency.
Lancet i: 230.
- Cox D.W., Woo S.L.C. and Mansfield T. (1985).
DNA restriction fragments associated with α -1-antitrypsin indicate a single origin for deficiency allele PI Z.
Nature 316: 79 - 81.
- Cox D.W. and Billingsley G.D. (1986).
Restriction enzyme Mae III for prenatal diagnosis of α -1-antitrypsin deficiency.
Lancet i: 741 - 742.

- Chervenak F.A., Isaacson G. and Mahoney M.J. (1986).
Advances in the diagnosis of fetal defects.
N Engl J Med 315: 305 - 307.
- Daiger S.P., Lidsky A.S., Chakraborty R., Koch R.,
Güttler F. and Woo S.L.C. (1986).
Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine
hydroxylase locus in prenatal diagnosis of
phenylketonuria.
Lancet i: 229 - 232.
- Davies K.E. (1986).
Human genetic disease. A practical approach.
IRL Press Limited Oxford, England. First edition.
- Delpuch M., Deburgrave N., Baudis M., Maissonneuve P.,
Bardin J.M., Sultan Y. and Kaplan J.C. (1986).
De novo mutation in hemophilia A established by DNA
haplotype analysis and precluding prenatal
diagnosis.
Hum Genet 74: 316 - 317.
- Epstein C.J., Cox D.R., Schonberg S.A. and Hogge W.A.
(1983).
Recent developments in the prenatal diagnosis of
genetic diseases and birth defects.
Ann Rev Genet 17: 49 - 83.
- Evans H.J. (1986).
New trends in human genetic research. An
introduction and overview.
Experientia 42: 1069 - 1075.
- Farrall M., Rodeck C. H., Stanier P., Lissens W., Watson
E., Law H. Y., Warren R., Super M., Scambler P.,
Wainwright B. and Williamson R. (1986).
First trimester prenatal diagnosis of cystic
fibrosis with linked DNA probes.
Lancet ii: 1402 - 1405.
- Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1983).
A technique for radiolabeling DNA restriction
endonuclease fragments to high specific activity.
Anal Biochem 132: 6 - 13.
- Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1984).
A technique for radiolabeling DNA restriction
endonuclease fragments to high specific activity.
Addendum Anal Biochem 137: 266 - 267.

- Feingold J., Serre J.L. and Carnevale P. (1986).
Some trends in medical populations genetics.
Experientia 42: 1102 - 1109.
- Ferguson-Smith M.A. (1983a).
Prenatal chromosome analysis and its impact on the
birth incidence of chromosome disorders.
Br Med Bull 39: 355 - 364.
- Ferguson-Smith M.A. (1983b).
The reduction of anencephalic and spina bifida
births by maternal serum alphafetoprotein
screening.
Br Med Bull 39: 365 - 372.
- Folstein S.E., Phillips J.A., Meyers D.A., Chase G.A.,
Abbott M.H., Franz M.L., Waber P.G., Kazazian H.H.
Jr., Conneally P.M., Tanzi R.E., Hobbs W.,
Faxyriarz A., Gibbons K. and Gussella J.F. (1985).
Huntington's disease: Two families with differing
clinical features show linkage to the G8 probe.
Science 229: 776 - 779.
- Forestier F., Daffos F., Solé Y. and Rainaut M. (1986).
Prenatal diagnosis of hemophilia by fetal blood
sampling under ultrasound guidance.
Haemostasis 16: 346 - 351.
- Fox J., Hack A.M., Fenton W.A., Golbus M.S., Winter S.,
Kalousek F., Rozen R., Brusilow S.W. and Rosenberg
L.E. (1986).
Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase
deficiency with use of DNA Polymorphisms.
N Engl J Med 315: 1205-1208.
- Galjaard H. (1986).
Biochemical diagnosis of genetic disease.
Experientia 42: 1075 - 1085.
- Goeddel D.V.V., Sheppard H.M., Yelverton E., Leung D.
and Crea R. (1980).
Synthesis of human fibroblast interferon by E.
coli.
Nucleic Acids Res 8: 4057.
- Goossens M., Dumez Y., Kaplan L., Lupker M., Chabret C.,
Henrion R. and Rosa J. (1983).
Prenatal diagnosis of sickle cell anemia in the
first trimester of pregnancy.
N Engl J Med 309: 831 - 833.

- Gosden C.M. (1983).
Amniotic fluid cell types and culture.
Br Med Bull 39: 348 - 354.
- Grzeschik K.H. (1986).
The role of somatic cell genetics in human gene mapping.
Experientia 42: 1128 - 1137.
- Gusella J.F., Wexler N.S., Conneally P.M., Naylor S.L., Anderson M.A., Tanzi R.E., Watkins P.C., Ottina K., Wallace M.R., Sakaguchi A.Y., Young A.B., Shoulson I., Bonilla E. and Martin J.B. (1983).
A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease.
Nature 306: 234 - 238.
- Gusella J.F., Tanzi R.E., Anderson M.A., Hobbs W., Gibbons K., Raschtchian R., Gilliam T.C., Wallace M.R., Wexler N.S. and Conneally P.M. (1984).
DNA markers for nervous system diseases.
Science 225: 1320 - 1326.
- Gusella J.F., Tanzi R.E., Bader P.I., Phelan M.C., Stevenson R., Hayden M.R., Hofman K.J., Faryniarz A.G. and Gibbons K. (1985).
Deletion of Huntington's disease-linked G8 (D4S10) locus in Wolf-Hirschhorn syndrome.
Nature 318: 75 - 78.
- Gusella J.F. (1986).
DNA polymorphism and human disease.
Ann Rev Biochem 55: 831 - 854.
- Gustavii B. (1984).
Chorionic villi sampling under direct vision.
Clin Genet 26: 297 - 300.
- Hayden M.R., Ehrlich R., Parker H. and Ferera S.J. (1980).
Social perspectives in Huntington's chorea.
S Afr Med J 58: 201 - 203.
- Hejtmancik J.F., Sifers R.N., Ward P.A., Harris S., Mansfield T. and Cox D.W. (1986).
Prenatal diagnosis of α -1-antitrypsin deficiency by restriction fragment length polymorphisms and comparison with oligonucleotide probe analysis.
Lancet i: 767 - 770.

- Holzgreve W. and Golbus M.S. (1984).
Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency utilizing fetal liver biopsy.
Am J Hum Genet 36: 320 - 328.
- Horwich A.L., Fenton W.A., Williams K.R., Kalousek F., Kraus J.P., Doolittle R.F., Konigsberg W. and Rosenberg L.E. (1984).
Structure and expression of a complementary DNA for the nuclear coded precursor of human mitochondrial ornithine transcarbamylase.
Science 224: 1068-1074.
- Humphries S.E. and Williamson R. (1983).
Application of recombinant DNA technology to prenatal detection of inherited defects.
Br Med Bull 39: 343 - 347.
- Ionasescu V.V., Searby C. and Ionasescu R. (1986).
Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy based on Xp21.2 deletion.
Neurol 36: 1143 - 1144.
- Jeffreys A.J., Wilson V. and Thein S.L. (1985).
Hypervariable minisatellite regions in human DNA.
Nature 314: 67 - 73.
- Johnson P.H. and Grossman L.I. (1977).
Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double and single stranded DNA's.
Biochem 16: 4217
- Kan Y.W. and Dozy A.M. (1978).
Antenatal diagnosis of sickle cell anaemia by DNA analysis of amniotic fluid cells.
Lancet ii: 910 - 912.
- Kidd V.J., Wallace B., Itakura K. and Woo S.L.C. (1983).
 α -1-antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene.
Nature 304: 230 - 234.
- Kidd V.J., Golbus M.S., Wallace B., Itakura K. and Woo S.L.C. (1984).
Prenatal diagnosis of α -1-antitrypsin deficiency by direct analysis of the mutation site in the gene.
N Engl J Med 310: 639 - 642.

- Landegren U., Kaiser R., Caskey C.T. and Hood L. (1988).
DNA diagnostics molecular techniques and automation.
Science 242: 229 - 237.
- Laurell C.B. and Erikson S. (1965).
Studies in alpha-1-antitripsin deficiency.
Acta Med Scand 177 (Suppl 432): 5 - 85.
- Law D.J., Frossard P.M. and Rucknagel D.L. (1984).
Highly sensitive and rapid gene mapping using
miniaturized blot hybridization: application to
prenatal diagnosis.
Gene 28: 153 - 158.
- Ledley F.D., Grenett H.E., DiLella A.G., Kwok S.C.M. and
Woo S.L.C. (1985).
Gene transfer and expression of human phenylalanine
hydroxylase.
Science 228: 77 - 79.
- Lidsky A.S., Ledley F.D., DiLella A.G., Kwok S.C.M.,
Daiger S.P., Robson K.J.H. and Woo S.L.C. (1985a).
Extensive restriction site polymorphism at the
human phenylalanine hydroxylase locus and
application in prenatal diagnosis of
phenylketonuria.
Am J Hum Genet 37: 619 - 634.
- Lidsky A.S., Güttler F. and Woo S.L.C. (1985b).
Prenatal diagnosis of classic phenylketonuria by
DNA analysis.
Lancet i: 549 - 551.
- Linch D.C. and Levinsky R.J. (1983).
Prenatal diagnosis of immunodeficiency disorders.
Br Med Bull 39: 399 - 404.
- Maddalena A., Sosnoski D.M., Berry G.T. and Nussbaum
R.L. (1988).
Mosaicism for an intragenic deletion in a boy with
mild ornithine transcarbamylase deficiency.
N Engl J Med 319: 999-1003.
- Manca M., Cossu G., Angioni G., Gigliotti B., Bosisio
A.B., Gianazza E. and Righetti P.G. (1986).
Antenatal diagnosis of the β -thalassemia by
isoelectric focusing in immobilized pH gradients.
Am J Hematol 22: 285 - 293.

- Maniatis T., Fritach E.F. and Sambrook J. (1982).
Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Maxwell D., Lilford R., Czepulkowski B. and Heaton D.
(1986).
Transabdominal chorionic villus sampling.
Lancet i: 123 - 126.
- Meinkoth J. and Wahl G. (1984).
Hibridization of nucleic acids immobilized on solid
support.
Anal Biochem 138: 267
- Mibashan R.S. and Millar D.S. (1983).
Fetal haemophilia and allied bleeding disorders.
Br Med Bull 39: 392 - 398.
- Modell B. (1983).
Prevention of the haemoglobinopathies.
Br Med Bull 39: 386 - 391.
- Montgomery D.L., Hall B.D., Gillam S. and Smith M.
(1978).
Identification and isolation of the yeast
cytochrome c gene.
Cell 14: 673
- Montiel F. (1987).
Cuarto curso de técnicas básicas. Análisis de
secuencias específicas de ácidos nucleicos.
Técnicas de Southern y Northern.
UNAM, México.
- Mulcahy M.T., Roberman B. and Reid S.E. (1984).
Chorion biopsy, cytogenetic diagnosis, and
selective termination in a twin pregnancy at risk
of haemophilia.
Lancet i: 866 - 867.
- Newmark P. (1984).
Molecular diagnostic medicine.
Nature 307: 11 - 12.
- Odile R. (1985).
El diagnóstico prenatal.
Mundo Científico 49: 812 - 822.

- Old J.M., Ayyub H., Wood W.G., Clegg J.B. and Weatherall D.J. (1982).
Linkage analysis of nondeletion hereditary persistence of fetal hemoglobin.
Science 215: 981 - 982.
- Old J.M. and Higgs D.R. (1983).
Methods in Hematology, Weatherall, D.J. (ed).
Churchill Livingstone, Edinburg.
Vol 6: 74 - 89.
- Old J.M., Briand P.L. and Purvis-Smith S. (1985).
Prenatal exclusion of ornithine transcarbamylase deficiency by direct gene analysis.
Lancet i: 73 - 75.
- Old J.M., Fitches A., Heath C., Thein S.L., Weatherall D.J., Warren R., McKenzie C., Rodeck C.H., Modell B., Petrou M. and Ward R.H.T. (1986).
First-trimester fetal diagnosis for haemoglobinopathies: Report on 200 cases.
Lancet ii: 765 - 767.
- Orkin S.H., Little P.F.R., Kazazian H.H.Jr. and Boehm C.D. (1982).
Improved detection of the sickle mutation by DNA analysis. Application to prenatal diagnosis.
N Engl J Med 307: 32 - 36.
- Patrick A.D. (1983).
Inherited metabolic disorders.
Br Med Bull 39: 378 - 385.
- Penrose L. and Quastel J.H. (1937).
Metabolic studies in phenylketonuria.
Biochem J 31: 266 - 274.
- Pilu G., Reece E.A., Romero R., Bovicelli L. and Hobbins J.C. (1986).
Prenatal diagnosis of craniofacial malformations with ultrasonography.
Am J Obstet Gynecol 155: 45 - 50.
- Poenaru L., Kaplan L., Dumez Y. and Dreyfus J.C. (1984a).
Evaluation of possible first trimester prenatal diagnosis in lysosomal disease by trophoblast biopsy.
Ped Res 18: 1032 - 1034.

- Poenaru L., Castelnau L., Dumez Y. and Thepot F. (1984b).
First trimester prenatal diagnosis of Mucopolipidosis II (I-cell disease) by chorionic biopsy.
Am J Hum Genet 36: 1379 - 1385.
- Reed T.E. and Chandler J.H. (1958).
Huntington's chorea in Michigan. I Demography and genetics.
Am J Hum Genet 10: 201 - 225.
- Rigby P.W.J., Dieckmann M., Rhodes C. and Berg P. (1977).
Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J Mol Biol 113: 237 - 251.
- Robertson M. (1983).
Huntington's disease: The beginning of the end of a dilemma?
Nature 306: 222.
- Robson J.H., Chandra T., MacGillivray R.T.A. and Woo S.L.C. (1982).
Polysome immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA.
Proc Natl Acad Sci USA 79: 4701 - 4705.
- Rodeck C.H. and Morsman J.M. (1983).
First trimester chorion biopsy.
Br Med Bull 39: 338 - 342.
- Rodeck C.H. and Nicolaides K.H. (1983).
Fetoscopy and fetal tissue sampling.
Br Med Bull 39: 332 - 337.
- Rosatelli C., Maccioni L., Scalas M.T. and Cao A. (1986).
Pitfalls in prenatal diagnosis of β -thalassaemia.
J Med Genet 23: 456 - 458.
- Roy D.J. (1986).
First trimester fetal diagnosis: prudential ethics.
Can Med Assoc J 135: 737 - 739.

- Rozen R., Fox J., Fenton W.A., Horwich A.L. and Rosenberg L.E. (1985).
Gene deletion and restriction fragment length polymorphisms at the human ornithine transcarbamylase locus.
Nature 313: 815-817.
- Saheki T., Imamura Y. and Inove I. (1984).
Molecular basis of ornithine transcarbamylase deficiency lacking enzyme protein.
J Inherited Metab Dis 7: 2 - 8.
- Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N. (1985).
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science 230: 1350 - 1354.
- Saiki R.K., Gelford D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A. (1988).
Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239: 487 - 494.
- Schmid W. (1986).
Medical genetics.
Experientia 42: 1086 - 1089.
- Sharp P.A., Sugden B. and Sambrook J. (1973).
Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose.
Biochem 12: 3055.
- Shoulders C.C. and Baralle F.E. (1986).
Genetic polymorphism in the ApoA-I/C-III complex.
Methods Enzimol 128: 727 -745.
- Simoni G. and Rosella F. (1986).
First trimester fetal karyotyping using chorionic villi: technical development and diagnostic application.
Experientia 42: 1097 - 1101.

- Southern E.M. (1975).
Detection of specific sequences among DNA fragments
separated by gel electrophoresis.
J Mol Biol 98: 503 - 517.
- Steinberg M.H. (1984).
Review: the sickle hemoglobinopathies - genetic
analysis of common phenocopies and new molecular
approaches to treatment.
Am J Med Sci 288: 169 - 174.
- Suggs S.V., Wallace R.B., Hirose T., Kawashima E.H. and
Itakura K. (1981).
Use of synthetic oligonucleotides as hybridization
probes: Isolation of cloned cDNA sequences for
human β_2 -Microglobulin.
Proc Natl Acad Sci 78: 6613.
- Sybert V.P. and Holbrook K.A. (1987).
Prenatal diagnosis and screening.
Dermatol Clin 5: 17 - 39.
- Thompson J.S. and Thompson M.W. (1973).
Genetics in medicine.
W.B. Saunders Co. USA. Second edition.
- Tonnesen T., Sondergaard F., Güttler F., Oberlé I.,
Moisan J.P., Mandel J.L., Hauge M. and Damsgard
E.M. (1984).
Exclusion of haemophilia B in male fetus by
chorionic villus biopsy.
Lancet i: 932.
- Turnbull A.C. and Mackenzie I.Z. (1983).
Second trimester amniocentesis and termination of
pregnancy.
Br Med Bull 39: 315 - 321.
- Wainscoat J.S., Old J.M., Thein S.L. and Weatherall D.J.
(1984).
A new DNA polymorphism for prenatal diagnosis of β -
Thalassaemia in mediterranean populations.
Lancet ii5: 1299 - 1301.
- Weatherall D. (1984).
On the track of genetic disease.
New Scientist 4: 32 - 36.

- Weatherall D.J., Old J.M., Thein S.L., Wainscoat J.S. and Clegg J.B. (1985).
Prenatal diagnosis of the common haemoglobin disorders.
J Med Genet 22: 422 - 430.
- Wijsman E.M. (1984).
Optimizing selection of restriction enzymes in the search for DNA variants.
Nucleic Acids Res 12: 9209 - 9226.
- Woo S.L.C., Lidsky A.S., Güttler F., Chandra T. and Robson K.H. (1983).
Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria.
Nature 306: 151 - 155.
- Woo S.L.C., Robson J.H. and Güttler F. (1984).
The possibility for prenatal diagnosis of PKU by linkage analyses based on phenylalanine hydroxylase locus specific DNA polymorphisms.
J Inher Metab Dis 7: 139 - 140.
- Yoshida A., Lieberman J., Gaidulis L. and Ewing C. (1976).
Molecular abnormality of human α -1-antitrypsin variant (Pi-ZZ) associated with plasma activity deficiency.
Proc Natl Acad Sci USA 73: 1324 - 1328.