

L. Castaño, J.R. Bilbao, I. Urrutia

An Esp Pediatr 1996;45:541-546.

Introducción

En el capítulo anterior, conocimos la forma en la que el material genético se organiza en las células, y se describió brevemente el funcionamiento de los ácidos nucleicos. A pesar de que podría considerarse al ADN como una molécula inalterable que funciona a la perfección, la realidad es bien distinta, y agentes externos (compuestos mutagénicos, radiaciones,...) o internos (errores en los sistemas enzimáticos de la replicación y la transcripción, segregaciones cromosómicas anómalas en la mitosis y meiosis, ...), pueden producir alteraciones en los genes. En este capítulo, analizaremos las alteraciones que pueden aparecer en el ADN, así como las consecuencias de las mismas, para en posteriores capítulos abordar las formas en las que estas alteraciones pueden ser detectadas.

2. Polimorfismos y mutaciones

En general, la secuencia de ADN de los genes que codifican las proteínas está **conservada** (es idéntica en todos los individuos) y modificaciones de la misma podrían alterar negativamente su función. No obstante, las poblaciones humanas se han desarrollado de forma independiente, de modo que entre los diferentes individuos, pueden existir algunas diferencias en determinados genes que no implican patología o pérdida de función. Estas variaciones genéticas se denominan **polimorfismos**. Un ejemplo clásico de polimorfismo se encuentra en los antígenos que conforman el sistema sanguíneo ABO, con tres variantes (A, B y O), pudiendo haber individuos con cualquiera de las posibilidades, que son simplemente diferentes formas del mismo gen, y no producen ninguna patología.

En los genes polimórficos, cada una de las variantes posibles se denomina alelo. En función de los **alelos** o variantes que un individuo presenta en sus dos cromosomas (materno y paterno), se observarán en la población los diferentes fenotipos. Los polimorfismos confieren diversidad a la población y son la consecuencia de **mutaciones** (cambios en la estructura o secuencia de ADN de los genes) que han ocurrido durante la evolución, y que no han sido eliminadas por la selección natural porque no constituyen ninguna desventaja para su portador. Por es-

Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (2): Purificación de ácidos nucleicos

ta razón, se han mantenido, y su frecuencia ha ido creciendo con el tiempo. Si la mutación produjera una patología o incapacidad al individuo portador, este moriría y el nuevo alelo sería eliminado. En general, los polimorfismos se asocian a variantes de la normalidad, mientras que las mutaciones son cambios que potencialmente podrían ser patológicos, aunque también existen casos de **mutaciones silenciosas** (véase más adelante) que no producen enfermedad. En este último caso, el concepto de polimorfismo estaría basado en la frecuencia con la que cada una de las variantes se presentan en la población, y se consideran polimorfismos sólo si su frecuencia es superior al 1%.

Cuando la mutación se produce en alguna de las **células somáticas** (todas las células del organismo excepto los gametos), se habla de **mutación somática**. Esta mutación sólo afecta a las células derivadas de la célula mutada, y afectará sólo a dicho órgano o sistema; no se transmite a la descendencia, y está presente sólo en el individuo donde ocurre la mutación. Este es el caso de algunas formas de cáncer que se asocian a mutaciones somáticas de determinados genes.

Por otro lado, cuando la mutación está presente en las células germinales (**gametos**) se transmite y formará parte del genoma de la descendencia; hablamos entonces de una mutación en línea germinal, que estará presente en todas las células del organismo de la descendencia.

En la Genética Médica, se estudian aquellas mutaciones que suponen una desventaja para el individuo: provocan un cuadro patológico que es necesario tratar. Estas alteraciones en los genes son poco frecuentes en la población, y no constituyen un polimorfismo estable. A continuación, trataremos de los diferentes tipos de mutaciones y de las consecuencias que pueden tener en una proteína. Posteriormente, iniciaremos la descripción de los métodos que son utilizados para detectar dichas alteraciones a nivel genético, y que además de permitir un diagnóstico certero, pueden ayudar al consejo genético o posibilitar una terapia correctora.

3. Tipos de mutaciones y sus consecuencias

Desde el punto de vista físico, las alteraciones que puede sufrir un gen se pueden clasificar en tres grupos: **deleciones**, que suponen la pérdida de material genético; **inserciones**, que hacen referencia a la aparición de material genético nuevo; y **sustituciones**, que corresponden a aquellos casos en los que determinado material ha sido sustituido por otro (tabla I). Todas estas

Unidad de Investigación, Departamento de Pediatría, Hospital de Cruces, Barakaldo, Bizkaia

Correspondencia: Dr. Luis Castaño. Unidad de Investigación, 2ª planta Edif. Anatomía Patológica. Hospital de Cruces, Plaza de Cruces s/n, Barakaldo, Bizkaia 48903

Tabla I Tipos de mutaciones, en función de la causa que las produce y sus consecuencias

1.- Causa:	- Delección - Inserción - Sustitución
2.- Consecuencia:	- Silenciosa (<i>silent</i>) - De sentido erróneo (<i>missense</i>) - Sin sentido (<i>nonsense</i>) - De pauta de lectura (<i>frameshift</i>) - De corte-empalme (<i>splicing</i>)

alteraciones pueden afectar a grandes regiones cromosómicas y ser visibles por técnicas de citogenética (hablando entonces de trisomías, traslocaciones, pérdida de fragmentos cromosómicos,...), o bien pueden tratarse de alteraciones que afectan a unos cuantos nucleótidos, o ser simplemente una alteración de un solo nucleótido o base (**mutación puntual**). Como veremos en próximos capítulos, la forma en que estas alteraciones pueden ser estudiadas dependerá del propio gen objeto de estudio (su tamaño, complejidad de organización en exones-intrones,...), del tipo de alteración que se pretende detectar, y del material de estudio y tecnología de la que se dispone.

Las mutaciones puntuales pueden ser responsables de fenotipos patológicos en virtud de los mecanismos que se describen a continuación, y se resumen en la tabla I y la figura 1. Así, una sustitución puntual de un nucleótido por otro en la región codificante de un gen (incluida en los exones), puede suponer que el aminoácido codificado por el triplete sea sustituido por otro. Esta alteración, que se denomina **mutación de sentido**

erróneo (del inglés *missense mutation*), provoca un cambio en la proteína sintetizada por el gen mutado, cuyas consecuencias patológicas dependerán de la función de la proteína alterada, así como de la importancia de ese aminoácido concreto en la funcionalidad de la misma.

En algunos casos, la sustitución de una base por otra puede dar lugar a la aparición de un codon de terminación (véase capítulo anterior). Estas mutaciones se denominan **mutaciones sin sentido** (*nonsense mutation*) y provocan la terminación prematura de la síntesis proteica, formándose una proteína trunca en el punto de la mutación (Fig. 1).

En otros casos, el cambio de nucleótido no supone cambio de aminoácido (recordemos que distintos tripletes pueden codificar para el mismo aminoácido: por ejemplo, CAT y CAG codifican ambos el aminoácido glutamina), y se denomina **mutación silenciosa** (*silent mutation*) (Fig. 1).

Cuando se producen inserciones o deleciones puntuales en la región de un gen que codifica para una proteína, se ve alterada la **pauta de lectura** de los tripletes. Hablamos entonces de **frameshift mutation**, y la secuencia de aminoácidos traducidos en el gen mutado cambia a partir del punto de la inserción o deleción (Fig. 1).

Además de las mutaciones que afectan a la región codificante del gen, también pueden ocurrir sustituciones, inserciones y deleciones en las regiones intrónicas adyacentes a los exones, o zonas de *splicing*, que participan en el correcto procesamiento de la molécula de ARNm inmadura (véase capítulo anterior). Mutaciones en los puntos de corte-empalme de exones (**splicing mutation**), pueden suponer que la molécula de ARNm madura carezca de alguno de sus exones, o presente secuencias intrónicas que debían ser eliminadas, con lo que el producto proteico se verá alterado (Fig. 2). Finalmente, las mutaciones pueden afectar a las regiones reguladoras (promotores, silenciadores, ...), con lo que puede ocurrir que un gen, a pesar de tener su secuencia codificante intacta, no se exprese correctamente por

	GEN NORMAL						
	CAA	ATG	ACC	CAG	CAT
	Pro	Met	Tre	Gln	Gln
<u>MUTACION</u>							<u>CONSECUENCIA</u>
SILENCIOSA	CAA	ATG	ACC	CAG	CAG
	Pro	Met	Tre	Gln	Gln
MISSENSE	CAA	ATA	ACC	CAG	CAT
	Pro	Ile	Tre	Gln	Gln
NONSENSE	CAA	ATG	ACC	TAG	CAG
	Pro	Met	Tre	stop	proteína trunca
FRAMESHIFT	CAA	ATG	CC C	AG C	CAT
	Pro	Met	Tre	Gln	cambio en los aminoácidos posteriores a la mutación

Figura 1. Consecuencias de las mutaciones puntuales en la síntesis de una proteína.

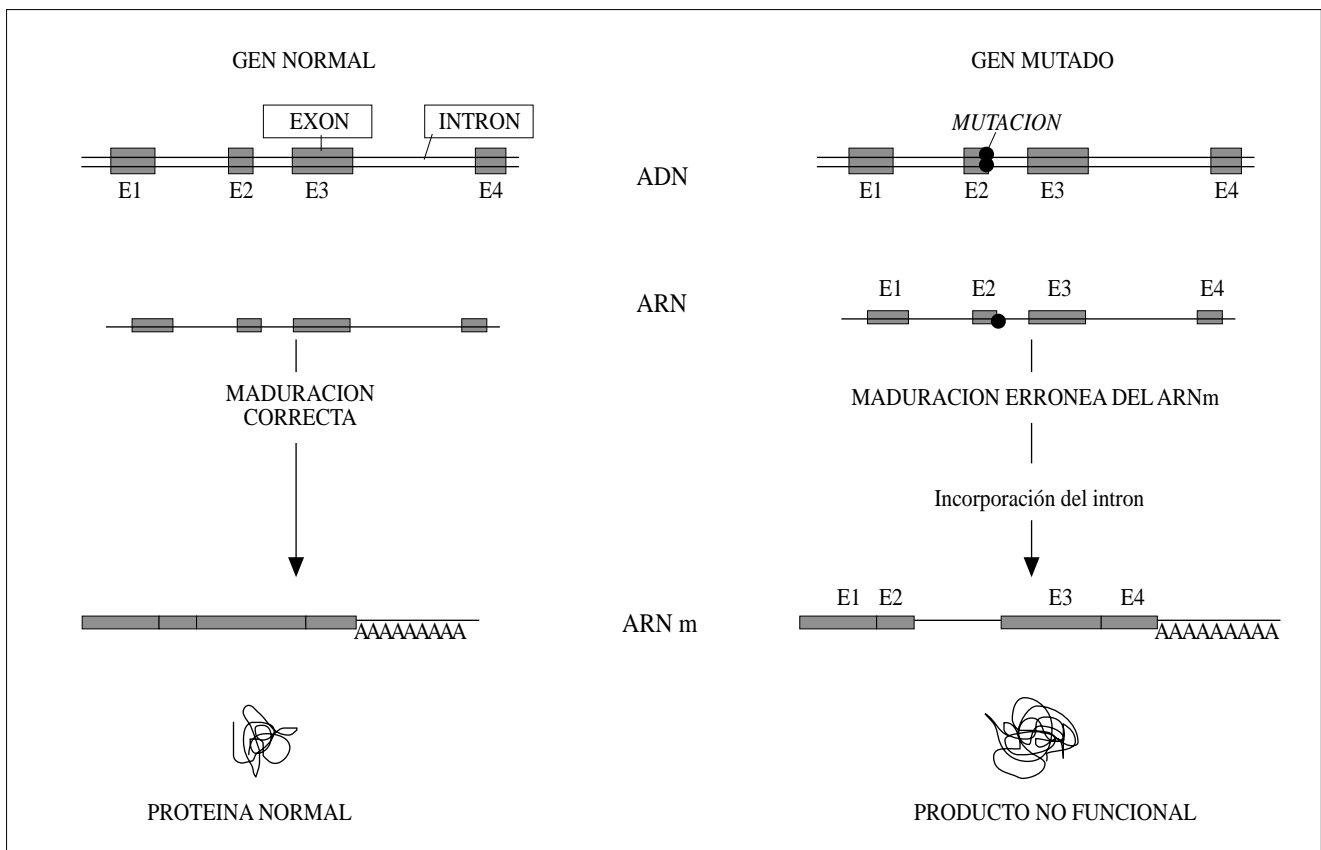


Figura 2. Consecuencias de una *splicing mutation* (mutación puntual en una zona de *splicing*) que impide el correcto procesamiento del mensaje y produce una proteína aberrante. Mutaciones de este tipo también pueden provocar la pérdida de exones, con lo que la proteína resultante sería incompleta. E1-E4: exones 1-4.

no poder ser transcrito a ARNm, o bien no lo sea en los niveles adecuados por su falta de respuesta a los elementos que regulan su expresión.

4. Purificación de ácidos nucleicos

Las técnicas de Biología Molecular que pueden ser aplicadas al estudio de las mutaciones causantes de enfermedades se basan en el análisis de los ácidos nucleicos, y todas ellas tienen como primera etapa, la obtención del propio ácido nucleico (bien ADN o ARN). La decisión sobre la conveniencia de trabajar con ADN o ARN dependerá de características inherentes a cada una de estas dos moléculas, de la estructura del gen a estudiar y del tipo de alteración que se pretende detectar.

En primer lugar, el ADN genómico se encuentra en todas las células nucleadas del organismo, y en general, es idéntico en todas ellas. Por esta razón, el ADN puede ser purificado de las células blancas de sangre periférica para lo que basta una simple extracción de sangre. Por regla general, es el material a estudiar para observar alteraciones estructurales en los genes. El estudio a nivel del ADN nos dará información estructural, sobre la presencia/ausencia del gen, su tamaño, variantes y mutaciones, etc..

El análisis genético en ARN se realiza sobre ARN mensajero.

Para un determinado gen, su ARNm estará presente sólo en aquellos tipos celulares donde se expresa (encontraremos ARNm del gen de la insulina únicamente en las células β del páncreas) y en algunos casos la obtención de la muestra puede ser problemática, necesiéndose una biopsia más o menos complicada. Además, el ARN es menos estable que el ADN, siendo fácilmente destruido por una enzima, la **ribonucleasa** (RNasa) presente en muchos tejidos e incluso en el material de laboratorio, con lo que su purificación, manipulación y almacenamiento son problemáticos. La información que nos proporciona el estudio de ARNm es funcional, y hace referencia a la expresión del gen, tanto cualitativa como cuantitativa.

A partir del ARN mensajero puede construirse en el laboratorio su correspondiente **ADN complementario o ADNc** (molécula de ADN que sólo contiene los exones) utilizando un proceso llamado **retrotranscripción** (Fig. 3). Esta posibilidad es interesante en casos de genes estructuralmente muy complejos o grandes (por ejemplo, el gen de la 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-3, donde las mutaciones puntuales causantes de pseudohermafroditismo masculino se distribuyen al azar por todo el gen, está formado por 11 exones y 10 intrones, que abarcan unas 60 kb (kilobases = 1.000 pb (pares de bases)), mien-

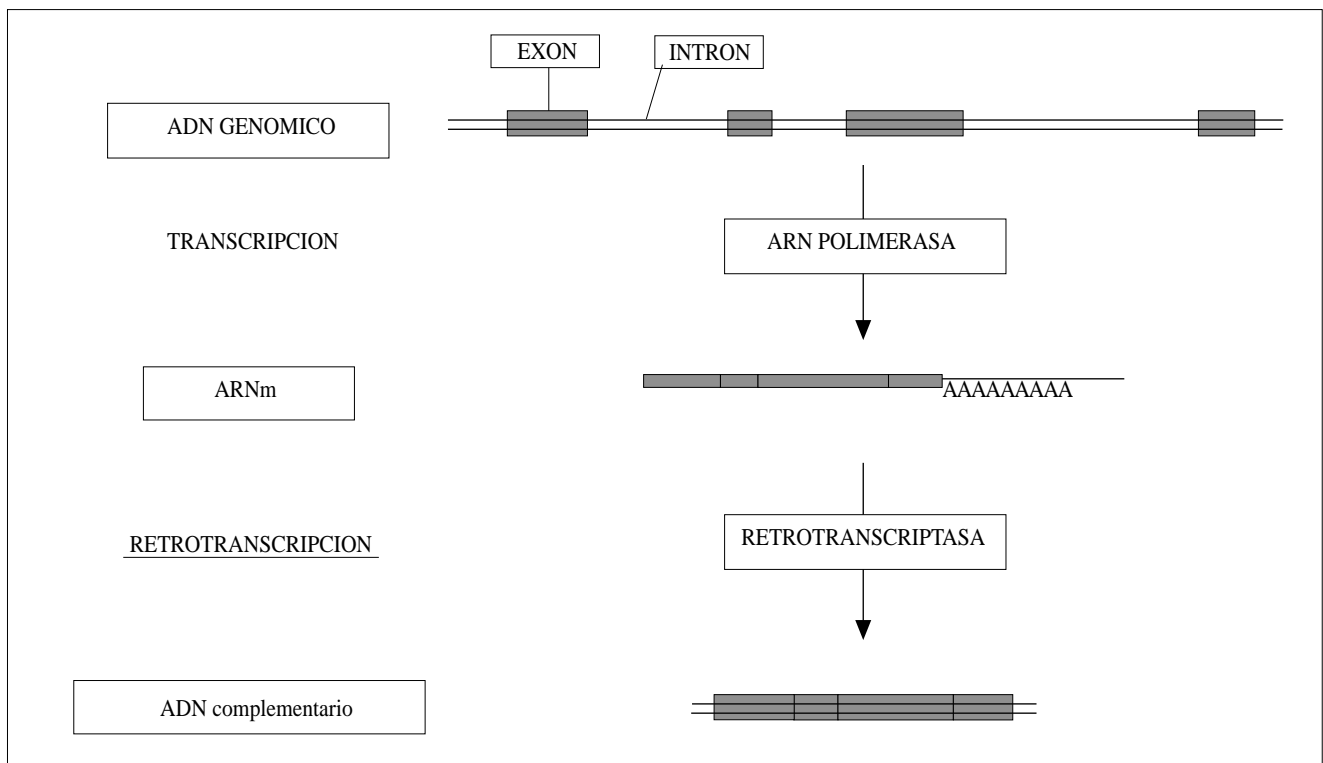


Figura 3. Proceso de la retrotranscripción, inverso a la transcripción, con el que se puede producir en el laboratorio ADN complementario (ADN de los exones) a partir del ARNm aislado de un tejido.

tras que la molécula de ARNm apenas tiene 1.500 nucleótidos). Un estudio de ADNc a partir de ARNm es mucho más sencillo que el análisis de ADN genómico, siempre que el tejido en el que se expresa el gen esté disponible.

5. Extracción de ADN

La preparación de ADN genómico es posible a partir de diferentes tejidos. La elección del tejido a procesar vendrá determinada por su disponibilidad y la facilidad de la preparación de ADN a partir del mismo, ya que como se ha dicho ya, cualquier célula nucleada de un organismo posee la totalidad de la información genética del mismo. Las células más utilizadas como fuente de ADN son las células blancas de sangre periférica (hay que recordar que los eritrocitos carecen de núcleo), pero también se utilizan otros tejidos sólidos como el hígado, bazo, riñón, o incluso tejido óseo.

Desde un punto de vista práctico (tabla II), en el medio clínico habitual, el ADN puede extraerse a partir de:

- **TEJIDO FRESCO** (Tejidos sólidos, sangre total, células blancas).

- **MUESTRAS CONGELADAS:** Idealmente, el ADN de mejor calidad (menos degradado por nucleasas) se extraerá de muestras frescas, no obstante, en el caso de números importantes de muestras a procesar, éstas pueden ser conservadas para realizar la extracción con posterioridad. El ADN no sufre demasiado, sobre todo si se conservan las muestras a -80°C y el rendimiento es aceptable.

miento es aceptable.

- **MUESTRAS EN PARAFINA:** El procedimiento de extracción es más laborioso y largo. El rendimiento es más bajo y el ADN está fragmentado. El ADN extraído de muestras fijadas e incluidas en parafina se suele utilizar para amplificaciones por PCR, como se discutirá en próximos capítulos.

Para la extracción de ADN de tejidos sólidos, lo ideal es que éstos, una vez extraídos, se congelen y mantengan congelados (al menos a -80°C) hasta su procesamiento. En el caso de muestras de sangre, ésta ha de recogerse en tubos con anticoagulante (preferentemente EDTA) tras lo que pueden ser procesadas inmediatamente o congeladas hasta su procesamiento. En el caso de que vayan a ser enviadas a otro centro para la purificación del ADN, es posible realizar el envío en el propio tubo de extracción, si no tarda más de 24-48 horas. Aunque el rendimiento en ADN se verá reducido, esta reducción puede compensarse enviando algo más de sangre.

En un proceso normal de extracción, se obtienen unos 25 μg de ADN por ml de sangre, lo que es generalmente suficiente para realizar cualquier determinación sencilla. No obstante, dado que hay casos en los que han de realizarse diferentes estudios, y teniendo en cuenta la posibilidad de que éstos hayan de repetirse, es una práctica aconsejable, en los casos en que las características del paciente lo permitan, extraer al menos dos tubos de 5 ml de sangre. Para niños muy pequeños, 2-3 ml de sangre pueden servir. En cualquier caso, la más mínima muestra

Tabla II Pautas de recogida de muestras para estudios de ácidos nucleicos. Los volúmenes y otros parámetros son orientativos, y dependen del estudio a realizar. Es recomendable consultar con el Centro donde se realizará el estudio concreto

ADN

1.- Extracción de muestras:

- Cualquier tejido sólido
- Sangre periférica anticoagulada
- EDTA
- Heparina
- Citrato ...

2.- Volumen de muestra*:

- Variable según paciente y tipo de estudio
- Adultos: 5 - 10 ml de sangre
- Niños: aprox. 5 ml de sangre
- Lactantes: 1 - 2 ml de sangre

3.- Procesamiento:

- Inmediato: según el protocolo establecido
- Conservación: congelada (preferentemente a -80° C) hasta ser procesada
- Envío de muestras:
 - en el propio tubo de extracción si ≤ 24 h
 - congeladas para envíos internacionales > 24 h

ARN

1.- Extracción de muestras:

- Tejido concreto donde el gen sea expresado
- Congelación inmediata en N₂ líquido; no descongelar hasta procesado

puede ser potencialmente útil, y no está de más contactar con el Centro que realizará el estudio para saber qué cantidad de muestra es necesaria para un estudio determinado (tabla II).

En el laboratorio, la purificación de ADN a partir de cualquier muestra requiere una serie de etapas (Fig. 4):

- **DISGREGACIÓN DEL TEJIDO:** En primer lugar, y en función del tipo celular del que se pretende aislar el ADN, existe una primera fase de disgregación, eliminación de la matriz extracelular, etc..

- **LISIS CELULAR** más o menos laboriosa según el tejido elegido, se basa en la utilización de detergentes que destruyen la membrana celular, liberando el contenido de las células al exterior.

- **DESPROTEINIZACIÓN** (eliminación de proteínas): Se realiza mediante extracciones repetidas de las proteínas con disolventes orgánicos (fundamentalmente fenol y cloroformo) algunas veces después de una incubación con enzimas que degradan las proteínas (proteasas).

- **PRECIPITACIÓN del ADN:** Una vez el ADN está purificado, se realiza la precipitación, que se consigue con un alcohol (etanol o isopropanol) en presencia de sales.

Hoy en día, se dispone de numerosos "kit" comercializados

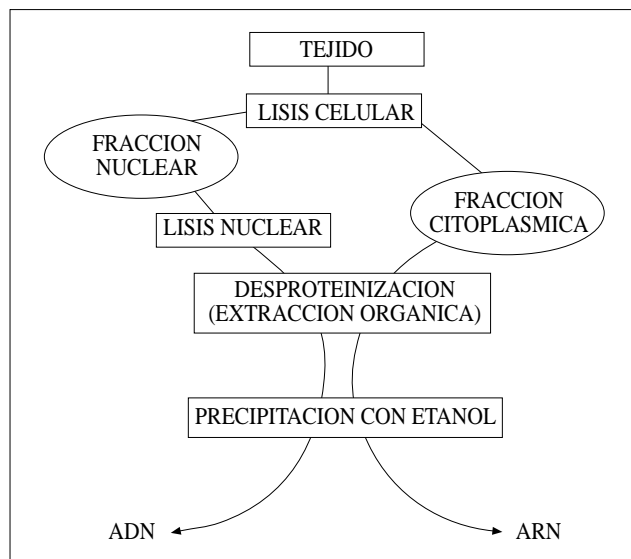


Figura 4. Esquema del proceso de purificación de ácidos nucleicos.

que simplifican la purificación de ADN genómico para prácticamente cualquier tipo de tejido, y que son recomendables para aplicaciones de rutina en las que el número de muestras a procesar es relativamente grande.

6. Extracción de ARN

Como ya se ha mencionado, la extracción de ARNm sólo puede realizarse de aquellos tejidos que expresan el gen de interés. El procedimiento de extracción de **ARN total**, requiere los mismos pasos que la purificación de ADN (Fig. 4), con la salvedad de que se utiliza en la lisis celular, algún agente que inactive las RNasas propias de la célula lisada (EDTA, tiocianato de guanidina, urea, 2-mercaptoetanol).

El resultado de estos procesos es la obtención de ARN total, del que más del 90% corresponde a ARN ribosómico (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt) que no codifican proteínas, y solo el 5% es ARN mensajero (ARNm), que se ha transcrito de los genes que codifican proteínas. Para la purificación del ARN mensajero, se suele aprovechar la presencia de la cola poli-A (región rica en adenina del extremo 3' del ARNm maduro) realizándose cromatografía en columnas con resinas ligadas a residuos poli-T a las que se unirán las moléculas de ARNm. Como en el caso anterior, existen productos comercializados para facilitar la extracción de ARN.

Glosario

ADN complementario (ADNc): Molécula de ADN que contiene sólo el material de los exones, ya que se obtiene "in vitro", a partir del ARN mensajero, por el proceso de retrotranscripción.

Alelo: cada una de las varias formas alternativas de un gen. En la herencia autosómica dominante, la presencia de un alelo mutado es suficiente para producir el cambio de fenotipo. Por el contrario, en la recesiva, es necesario que ambos alelos (ma-

terno y paterno) estén mutados.

ARN total: la totalidad del ARN celular, formado por ARNm, ARNt y ARNr.

Célula somática: cualquier célula del organismo, a excepción de las células germinales.

Delección: mutación que supone la pérdida de material genético.

Frameshift mutation: mutación que, como consecuencia de la inserción o delección de uno (o varios) nucleótidos, provoca que, a partir del punto en el que se altera la pauta de lectura, la traducción de los tripletes es diferente, y la proteína producida es distinta.

Gameto: células reproductoras (germinales) con contenido haploide.

Inserción: mutación que se produce por aparición de material genético nuevo

Missense mutation: sustitución en un gen, de un nucleótido que provoca un cambio de aminoácido en esa posición. La proteína sólo tendrá un aminoácido diferente que la proteína normal.

Mutación: cualquier alteración o cambio de la secuencia o estructura del ADN genómico.

Mutación de cambio de pauta de lectura: véase *frameshift mutation*

Mutación de sentido erróneo: véase *missense mutation*

Mutación puntual: aquella que afecta a un solo nucleótido, y puede ser inserción, delección o sustitución.

Mutación silenciosa: véase *silent mutation*

Mutación sin sentido: véase *nonsense mutation*

Mutación somática: aquella que afecta a una célula somática, y por tanto no afecta a la descendencia del individuo.

Nonsense mutation: sustitución en un gen, de un nucleótido que provoca la aparición de un codon de terminación o stop,

con lo que la proteína será truncada en ese punto.

Polimorfismo: presencia en la población de distintas variantes de un determinado gen, que se dice polimórfico.

Retrotranscripción: proceso que se realiza en el laboratorio, para producir ADN complementario a partir de ARNm maduro.

Secuencia conservada: secuencia de ADN que se mantiene invariable en la Evolución, por la importancia funcional de la proteína que codifica.

Silent mutation: cambio en un gen, de un nucleótido, que no provoca cambio de aminoácido en la proteína, y por tanto no altera su función

Splicing mutation: mutación en la zona de *splicing*, que provoca un procesamiento erróneo del ARN inmaduro, con lo que la molécula de ARNm puede contener regiones intrónicas o carecer de algún exón.

Sustitución: mutación en un gen, en la que el material genético existente es sustituido por otro

Bibliografía

- 1 Watson J, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. Ed. Freeman & Co, 2nd ed. New York, 1992.
- 2 Lewin B. Genes V, Ed. Oxford University Press, New York 1994
- 3 Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current protocols in molecular Biology. Ed. J. Wiley & Sons, 1st Ed., 1994
- 4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd Ed. New York 1989.
- 5 Emery AEH, Mueller RF. Principios de Genética Médica. Ed. Churchill Livingstone. Madrid 1992.