

L. Castaño, J.R. Bilbao, I. Urrutia

An Esp Pediatr 1997;46:513-518.

Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (5): Casos clínicos. Alteraciones genéticas en la disgenesia gonadal XY y en la distrofia miotónica

Introducción

En los cuatro primeros capítulos de “Introducción a la Biología Molecular y aplicación a la Pediatría”, hemos revisado brevemente la terminología y los aspectos teóricos de los métodos más comúnmente utilizados en el análisis molecular de las enfermedades genéticas. Estos conocimientos nos permitirán, en éste y próximos capítulos, analizar diferentes estrategias utilizadas para el estudio de diferentes alteraciones génicas. No es nuestra intención profundizar en el conocimiento genético de las enfermedades que se presentarán, sino más bien analizar el planteamiento de los estudios y discutir los resultados moleculares. Hemos seleccionado distintos cuadros clínicos de alteraciones genéticas que precisan de planteamientos de estudio diferentes, con el ánimo de examinar los métodos descritos hasta ahora.

Caso clínico nº 1

Breve historia clínica

Recién nacido a término, con cariotipo 46 XY (realizado por ser un embarazo a riesgo) y exploración física normal, con genitales externos femeninos. El análisis detallado de la historia clínica, junto con los estudios bioquímicos, hormonales, y de imagen concluyen con la impresión diagnóstica de disgenesia gonadal pura XY.

Objetivo del estudio molecular

Identificar el trastorno genético que se asocia a la disgenesia gonadal pura XY.

Planteamiento de estudio genético y resultados del análisis molecular

1.- Aproximación a un trastorno genético, a partir de un enfoque clínico adecuado:

En primer lugar, es importante recordar que el paso inicial para el planteamiento de un estudio genético es la aproximación al posible trastorno molecular a través una historia clínica y de una analítica cuidadosamente ponderadas. Intentar localizar, sin más, una alteración genética responsable de una enfermedad en el conjunto de todo el genoma, es como “buscar una aguja en un

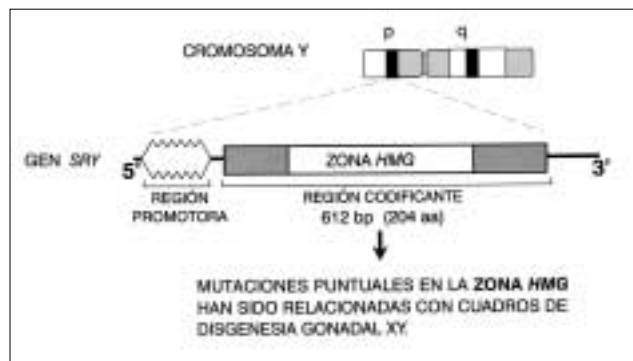


Figura 1. Estructura del gen SRY.

pajar”; por este motivo es fundamental delimitar al máximo, antes de comenzar, el terreno a estudiar.

Así, entre los genes implicados en el desarrollo testicular destaca el papel del gen SRY y trastornos moleculares en este gen se han asociado frecuentemente con cuadros clínicos de disgenesia gonadal pura XY. Una vez identificado el posible “gen candidato” a estudio, el planteamiento de su análisis se realiza en función de las características estructurales del mismo.

2.- Conocimiento de la estructura del gen que se quiere estudiar:

El gen SRY (del inglés Sex Determining Region Y) está localizado en el brazo corto (brazo “p”) del cromosoma Y (Fig.1). Como todos los genes, está formado por el gen estructural propiamente dicho (región codificante de proteína) y por la región promotora, situada en el extremo 5’ del gen (cuya función es el control de la expresión del mismo) (véase cap. 1). En el gen SRY la región codificante consta de un único exón (de 612 pares de bases -bp-, que se traducen a 204 aminoácidos), e incluye la zona HMG (del inglés High Mobility Group, por las características químicas que tiene la proteína codificada por el mismo). Esta zona HMG, de 240 bp (80 aminoácidos), es la región funcionalmente importante y en ella se han descrito la mayoría de las mutaciones de SRY asociadas a disgenesia gonadal XY. Por este motivo, en una primera fase, el planteamiento de estudio incluirá el análisis de esa zona.

3.- Tecnología para identificar una posible mutación:

La tecnología que se debe utilizar para demostrar una alte-

Unidad de Investigación, Departamento de Pediatría, Hospital de Cruces, Barakaldo, Vizcaya.

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

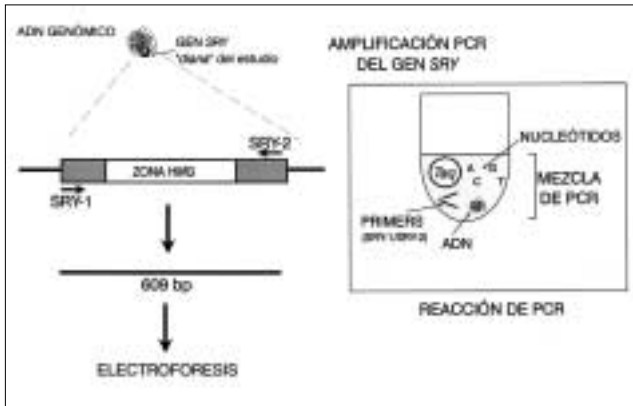


Figura 2. Esquema de la amplificación del gen *SRY* por PCR.

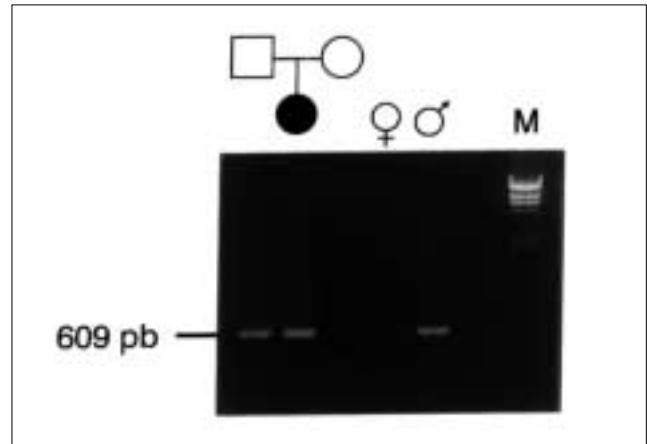


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa del producto de la amplificación por PCR del gen *SRY* en diferentes individuos. M: marcador de tamaño para control. (Explicación en el texto).

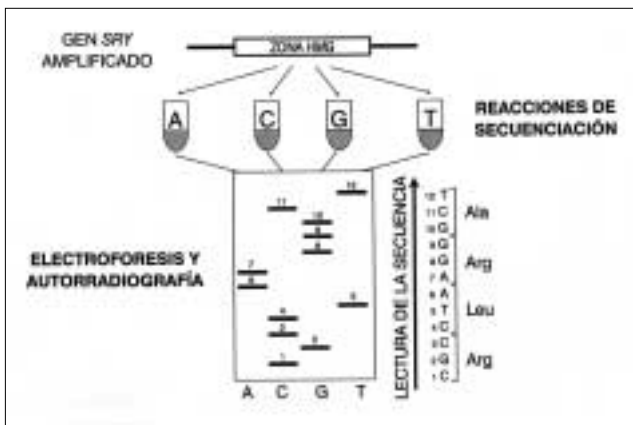


Figura 4. Esquema de la secuenciación del gen *SRY* amplificado y del sistema de lectura de la autorradiografía, así como la traducción de los codones a los aminoácidos correspondientes a la región secuenciada.

ración molecular varía en función de las características clínicas del paciente (que sugieran grandes deleciones de varios genes, o mutaciones puntuales) y de la propia estructura del gen a estudiar, etc. En este caso clínico, y debido al pequeño tamaño del gen *SRY*, es técnicamente factible buscar la posible alteración mediante la secuenciación directa del gen (véanse caps. 3 y 4).

3.1. Muestra de estudio y amplificación del gen

Las alteraciones moleculares conocidas en la disgenesia gonadal se producen generalmente en línea celular germinal, y están presentes en todas las células del individuo, por lo que el tejido más accesible para la extracción de ADN genómico es la sangre periférica (el ADN se extrae de sangre total anticoagulada con EDTA). Sin embargo, para secuenciar un gen necesitamos una cantidad considerable del mismo; por está razón, un paso previo para el análisis del gen *SRY* (o cualquier otro que se pretenda secuenciar) es su amplificación selectiva. Un método simple de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (del inglés, *Polymerase Chain reaction*) (véase cap. 3).

La reacción de PCR necesita, además del ADN genómico (que contiene el gen que queremos amplificar), los *primers* o cebadores específicos del gen a amplificar (que flanquean sus extremos) y que son diseñados por el propio investigador, una mezcla de los cuatro nucleótidos, y una enzima ADN polimerasa (generalmente *Taq* polimerasa) cuya función es ir ligando los nucleótidos para formar la cadena complementaria al gen inicial (Fig. 2). Como se recordará, este proceso de síntesis de ADN *in vitro* se realiza de forma repetida (en ciclos), con una rentabilidad exponencial (véase cap. 3), lo que permite disponer en pocas horas de una cantidad de copias del gen suficiente para su secuenciación.

Un fragmento de ADN amplificado por PCR puede visualizarse en un gel de electroforesis, en forma de banda que migra en el gel en función de su tamaño. En la figura 3 se observa una electroforesis de las amplificaciones por PCR del gen *SRY* (el fragmento amplificado tiene un tamaño de 609 bp) de distintos individuos, que incluyen el caso clínico a estudiar (niña 46 XY), sus padres, junto con dos controles (varón y mujer sanos). Como era de esperar, se observa una banda de 609 pb en el padre, en la niña 46 XY y en el control varón, mientras que la amplificación es negativa en la madre y en el control mujer (ya que carecen del cromosoma Y que contienen el gen *SRY*).

3.2. Secuenciación del gen

La secuenciación directa de un gen, amplificado por PCR, nos permite analizar su secuencia de nucleótidos y compararla a la secuencia normal ya descrita. Aunque los detalles técnicos de las reacciones de secuenciación no son el objetivo de este documento, puede ser interesante el poder interpretar una imagen de la autorradiografía de una secuenciación. Como se indica en la figura 4, la lectura se realiza de abajo hacia arriba, buscando la presencia de bandas en cada una de las cuatro calles, (que corresponden a cada uno de los nucleótidos). En este caso, el orden de las calles es "A-C-G-T", pero puede ser diferente, y



Figura 5. Detalle de la secuencia del gen *SRY* en un varón normal, comparado a un gen mutado. (Explicación en el texto).

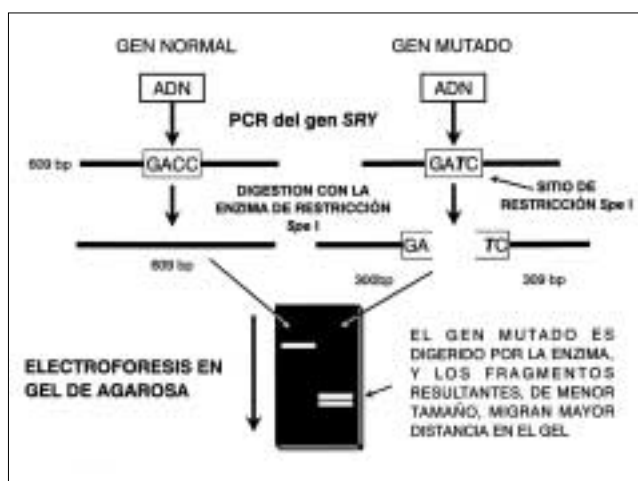


Figura 6. Esquema de la técnica de *PCR-RFLP* para comprobar la mutación del gen *SRY*.

ha de indicarse en las figuras. En la **figura 5** se observa una electroforesis de un detalle de la secuencia del gen *SRY* normal, comparada con la secuencia motivo del estudio que presenta una mutación puntual (cambio de una citosina "C" por una timina "T"). Este cambio en la secuencia de nucleótidos supone un cambio del triplete "CAG" (que codifica para el aminoácido glutamina) por un triplete "TAG" que codifica para un codón de terminación (véase *cap. 1*). Se trata, pues, de una "mutación sin sentido" (o *nonsense*) que provocará la finalización anticipada de la síntesis de la proteína, y por tanto una proteína truncada, probablemente no funcional (véase *cap. 2*).

3.3. Confirmación de la mutación y estudio familiar

Si bien el método definitivo para demostrar una mutación es la secuenciación del gen alterado, es éste un método lento. No obstante, una vez identificada una mutación en un individuo, existen otras técnicas más sencillas que opcionalmente pueden

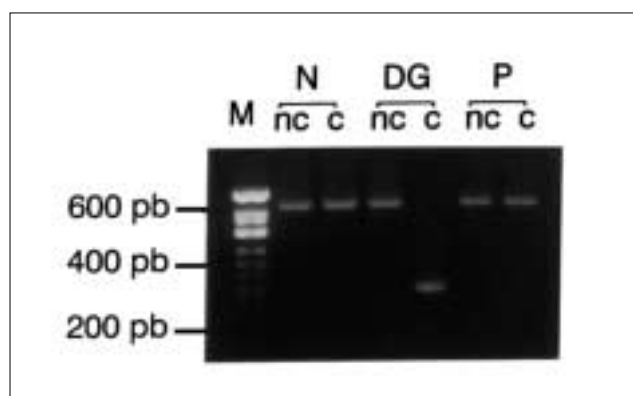


Figura 7. Resultado de la prueba de *PCR-RFLP* en la paciente con disgenesia gonadal XY estudiada.

utilizarse. Un ejemplo de ello lo exponemos en este caso clínico que estamos discutiendo.

Todo gen tiene un mapa de restricción (véase *cap. 3*) con determinados sitios de corte por enzimas en función de su secuencia de nucleótidos. Debido a un cambio en la secuencia (por ejemplo una mutación puntual), puede aparecer un nuevo lugar de restricción para determinada enzima (o desaparecer otro que existía en la secuencia normal) de forma que cuando se digiere el gen mutado con dicha enzima de restricción, el número de fragmentos resultantes es diferente de lo que se observa para el gen normal.

En el ejemplo que nos ocupa, el gen *SRY* normal no presenta ningún lugar de restricción para la enzima *Spe I*, por lo que su digestión con esta enzima resulta en el mismo fragmento original (no se corta). En la electroforesis se observa una banda de 609 bp (**Figs. 6 y 7**). Por el contrario en el caso índice, la mutación C a T, origina un sitio de corte para la enzima *Spe I*, de manera que su digestión con la enzima crea dos fragmentos de aproximadamente 300 bp (se ven en el gen como una banda ya que migran juntas).

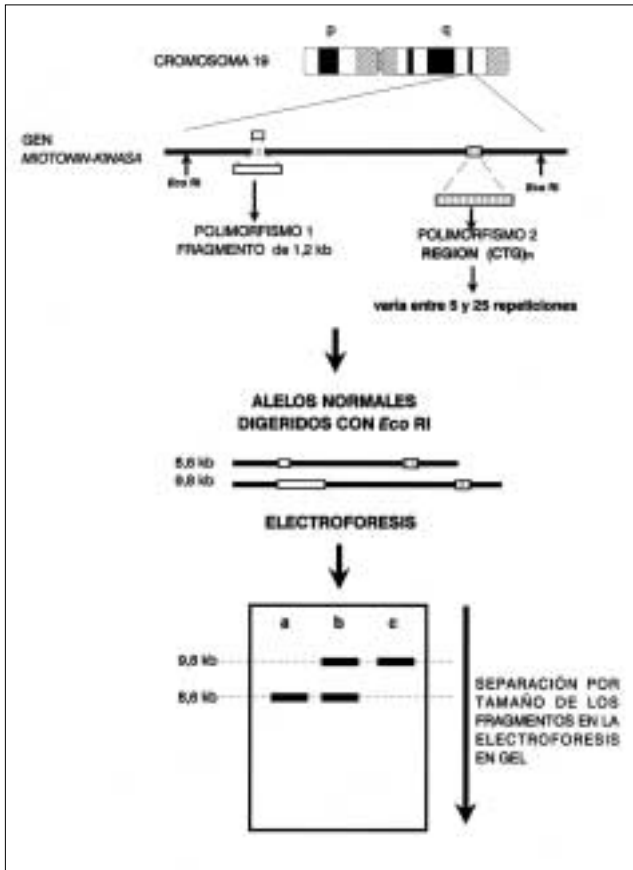


Figura 8. Estructura del gen de la *miotonín-kinasa* en individuos sanos. Calle **a**, sujeto homocigoto 8,6 kb; **b**, sujeto heterocigoto 8,6/9,8 kb; y **c**, homocigoto 9,8 kb.

Siguiendo esta estrategia, y sin necesidad de volver a secuenciar, podemos confirmar la mutación hallada en una primera secuenciación (a veces puede haber errores técnicos) o buscar esa misma alteración en otras personas (por ejemplo otros familiares).

Caso clínico nº 2

Breve historia clínica

Paciente varón de 52 años, con signos y síntomas clínicos de pérdida de fuerza muscular, miotonía y con el electromiograma compatible con descargas miotónicas, diagnosticado de distrofia miotónica de Steinert (DM). En la historia familiar, su esposa está sana y tiene tres hijos varones de 22, 13 y 10 años, presentando el mayor de los hermanos sintomatología similar a la de su padre.

Objetivo del estudio

En este caso, el estudio genético persigue la confirmación del diagnóstico clínico, así como descartar la presencia de la alteración genética en familiares asintomáticos del paciente de DM, como técnica de diagnóstico precoz y para su utilización en consejo genético.

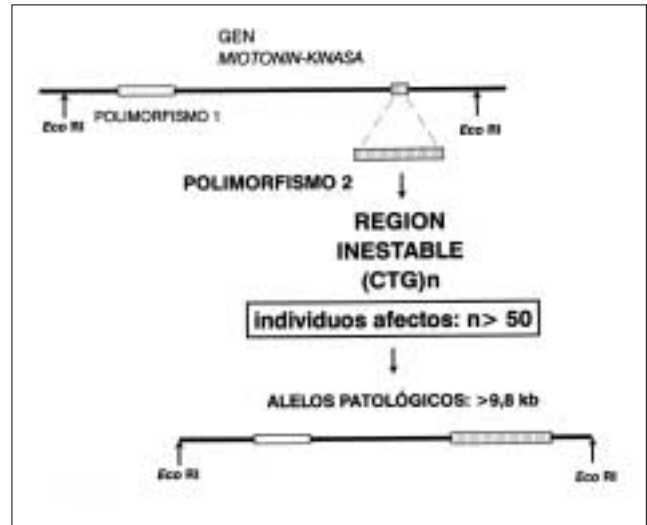


Figura 9. Alteración del gen de la *miotonín-kinasa* en individuos enfermos de distrofia miotónica de Steinert.

Planteamiento del estudio genético y resultados del análisis molecular

1.- Conocimiento del gen y su estructura:

A pesar de que no se conoce con certeza el gen responsable de la DM, se ha descrito la asociación entre una alteración genética en un gen denominado "*miotonin-kinasa*" y la aparición de la enfermedad. Este gen, localizado en el brazo largo (q) del cromosoma 19, codifica para una proteína de la familia de las proteína kinasas, de función aún desconocida, y presenta dos zonas variables o polimórficas (Fig. 8). La primera zona polimórfica (polimorfismo 1) consiste en una variación de tamaño del gen en 1,2 kb (kilobases), y la segunda (polimorfismo 2) es una región formada por repeticiones del triplete CTG, cuyo número varía entre 5 y 25 en la población general. En los sujetos sanos, en función de estos polimorfismos (fundamentalmente el polimorfismo 1), y atendiendo al mapa de restricción de este gen, la digestión del gen de *miotonin-kinasa* con la enzima de restricción *EcoRI* puede originar dos tipos de fragmentos, de 8,6 o de 9,8 kb de tamaño, que son los alelos o variantes normales del gen (Fig. 8). Así, un individuo sano, que presentará dos copias del gen (materna y paterna), puede tener ambas copias del alelo de 8,6 kb (homocigoto 8,6 kb), ambas de 9,8 kb (homocigoto 9,8 kb), o bien un alelo 8,6 kb y el otro 9,8 kb (heterocigoto) (Fig. 8).

Por otro lado, en pacientes con distrofia miotónica de Steinert, la región CTG (polimorfismo 2) se vuelve "*inestable*" y sufre una expansión, aumentando el número de tripletes CTG por encima de 50. Es decir, los enfermos de DM presentan alelos de mayor tamaño que los individuos sanos (Figs. 9 y 10). Además, el grado de expansión (el número de tripletes CTG) tiende a aumentar de generación en generación y está asimismo en relación directa con la gravedad de los síntomas y la edad de aparición de los mismos.

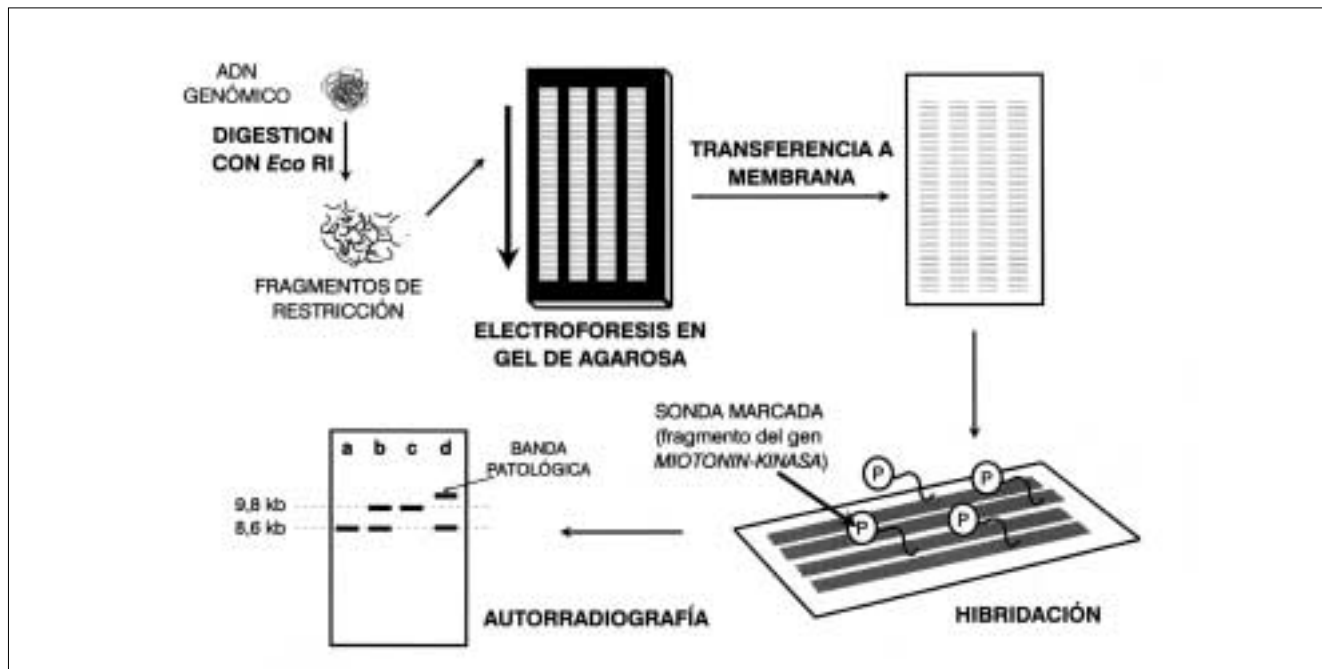


Figura 10. Esquema de la técnica de *Southern Blot-RFLP*, utilizada para la detección de la alteración genética en pacientes con distrofia miotónica. Las calles **a**, **b** y **c**, presentan las bandas de tres sujetos normales (homocigoto 8,6 kb, heterocigoto 8,6/9,8 kb y homocigoto 9,8 kb, respectivamente). La calle **d** presenta un enfermo de DM, con una banda normal (de 8,6 kb) y otra banda patológica, de tamaño superior a 9,8 kb.

2.- Tecnología para la detección de la alteración genética:

En la práctica, el diagnóstico genético de la DM se basa en detectar un aumento de tamaño del gen de la *miotoin-kinasa*, debido a la expansión de la zona inestable (CTG)_n (polimorfismo 2). En principio, más de una técnica parece adecuada para la detección de un aumento de tamaño en un fragmento de ADN. Podríamos pensar que una simple PCR sería capaz de mostrarnos el tamaño de los alelos, pero las características del gen a amplificar (gran tamaño y, sobre todo, repeticiones de un triplete CTG) hacen muy complicada su amplificación por PCR. Por esta razón, se opta por un enfoque más clásico y laborioso: el *Southern Blot-RFLP* (véase cap. 3). Recordamos que en esta técnica se parte de una muestra de ADN genómico extraída de sangre periférica, y se digiere con una enzima de restricción (*Eco* RI) que sabemos flanquea el gen de la *miotoin-kinasa*. La infinidad de fragmentos de restricción originados por la digestión se separan por electroforesis en gel de agarosa, quedando ordenados por tamaño. El ADN es visible en el gel, pero es imposible identificar el gen de la *miotoin-kinasa* entre todos los fragmentos. La técnica que utilizaremos para su detección será la hibridación con una sonda (fragmento de ADN correspondiente al gen de la *miotoin-kinasa*), marcada en este caso con el isótopo ³²P. Para llevar a cabo la hibridación, hemos de transferir el ADN a un soporte más estable, como una membrana de nylon, a la que se fija en la misma posición que ocupaba en el gel (es una especie de “copia”), pero aquí el ADN es invisible. La membrana se incuba con la sonda radiactiva, que se pegará únicamente al gen de la *miotoin-kinasa*. La visuali-

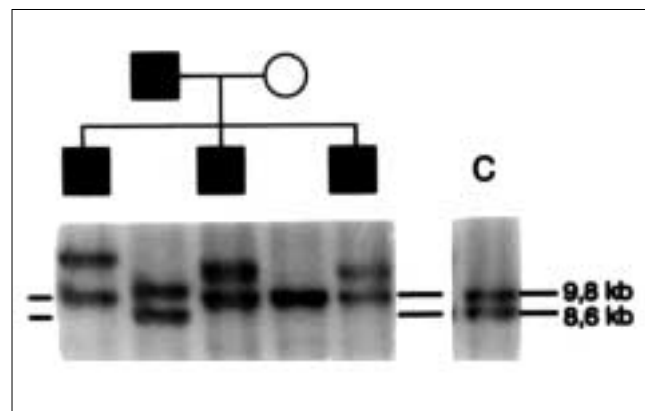


Figura 11. Resultado de la prueba *Southern Blot-RFLP* en la familia objeto de estudio. (Explicación en el texto).

zación consiste en exponer la membrana a una placa de rayos X (autorradiografía), quedando impresionada con la radiactividad de la sonda, en la posición que ocupan los alelos de la *miotoin-kinasa* en el gel. Así, para individuos sanos, observaremos bandas a la altura de 9,8 y 8,6 kb, mientras que en los enfermos de DM uno de sus alelos será mayor y presentarán alguna banda de tamaño superior a 9,8 kb.

En el ejemplo de la **figura 11**, se observa el resultado final del proceso descrito anteriormente, aplicado a la familia motivo del estudio. El control sano “C” es heterocigoto para los dos alelos normales y presenta una banda de 8,6 kb y otra de 9,8

kb. En la familia, el padre presenta la alteración genética y muestra una banda correspondiente a un alelo normal (8,6 kb) y otra patológica (> 9,8 kb). Su esposa, normal, es homocigota para el alelo 9,8, y únicamente se observa una banda de ese tamaño, pero más intensa. Los tres hijos han heredado uno de los alelos 9,8 kb de su madre, así como el alelo mutado paterno, que además ha aumentado de tamaño en todos los casos. Estos datos genéticos explicarían la sintomatología del padre y del hijo mayor, y además hacen muy probable que los otros dos hijos desarrollen la enfermedad a lo largo de su vida. Asimismo, en lo que respecta al consejo genético, deberá tenerse en cuenta que si alguno de los hijos tuviera descendencia, existiría un 50% de probabilidades de que transmitan la alteración.

Bibliografía

- 1 Castaño L, Bilbao JR. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (1): Conceptos básicos. *An. Esp. Pediatr.* **45**: 315-320, 1996.
- 2 Castaño L, Bilbao JR, Urrutia I. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (2): Purificación de ácidos nucleicos. *An. Esp. Pediatr.* **45**: 541-546, 1996.
- 3 Castaño L, Bilbao JR, Calvo B. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (3): Enzimas de Restricción. Reacción en cadena de la polimerasa. Formas de estudio de mutaciones. *An. Esp. Pediatr.* **46**: 87-92, 1997.
- 4 Castaño L, Bilbao JR. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (4): Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PCR. *An. Esp. Pediatr.* **46**: 305-310, 1997.