

L. Castaño, J.R. Bilbao

An Esp Pediatr 1997;47:437-442.

1. Conceptos de genética de las enfermedades hereditarias

En los capítulos anteriores hemos descrito la tecnología utilizada en un laboratorio de Biología Molecular para estudios genéticos enfocados principalmente al diagnóstico molecular de alteraciones genéticas. Asimismo, hemos presentado distintos casos clínicos en los que estas tecnologías son utilizadas para el diagnóstico. No obstante, detrás de cada uno de los posibles métodos de diagnóstico molecular realizados en un laboratorio hospitalario existe un trabajo previo muy intenso, encaminado a identificar los genes que se alteran en cada enfermedad, el modo de herencia de la misma, etc. Hemos creído interesante describir brevemente en este capítulo una serie de aspectos teóricos relacionados con estos trabajos preliminares, que esperamos den al lector al menos una idea general de la complejidad de las enfermedades hereditarias y la dificultad de conseguir un ensayo capaz de detectar las alteraciones genéticas responsables de las mismas.

1.1. Enfermedades monogénicas: patrones de herencia

Las enfermedades hereditarias son consecuencia de alteraciones a nivel genético que se transmiten de generación en generación. En el caso de las enfermedades *monogénicas*, causadas por alteraciones en un solo gen, los distintos patrones de transmisión de la enfermedad o *patrones de herencia* han sido clásicamente definidos como (Fig. 1): *autosómica dominante*, en la que la alteración en una única copia del gen (de las dos que se heredan de padre y madre) es suficiente para provocar el trastorno; *autosómica recesiva*, donde es necesario que ambas copias o alelos del gen estén afectados (aunque la mutación no sea idéntica en ambos); *herencia ligada al cromosoma X*, generalmente dominante para los varones y recesiva para las mujeres, las cuales actúan como portadoras y raramente se ven afectadas (también existen enfermedades ligadas al cromosoma X que tienen carácter dominante, como algunos raquitismos resistentes a vitamina D y cuya herencia se asemeja a la autosómica dominante); y por último, la *herencia ligada al cromosoma Y (holoándrica)*, que únicamente se manifiesta en varones y se hereda siempre del padre.

La mutación causante de una enfermedad monogénica pue-

Introducción a la Biología Molecular y aplicación a la Pediatría (7): Conceptos de genética en las enfermedades hereditarias. Genotecas

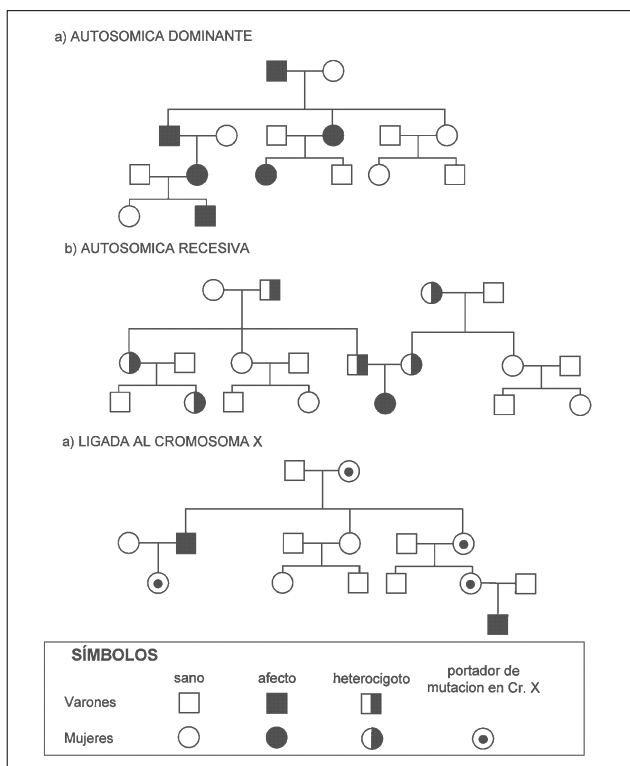


Figura 1. Árboles genealógicos mostrando los patrones de herencia. **a)** autosómica dominante, caracterizada por la persistencia de individuos afectados de ambos sexos en las diferentes generaciones; **b)** autosómica recesiva, donde aparecen individuos heterocigotos para la mutación pero no afectados (portadores) y ocasionalmente, algún individuo homocigoto afectado clínicamente. **c)** herencia ligada al cromosoma X, en la que únicamente aparecen varones afectados y las mujeres portadoras (no afectas) pueden transmitir la enfermedad.

de ser siempre la misma (p. ej. la anemia falciforme), o puede afectar a diferentes lugares del gen en cada paciente (como en la fibrosis quística), lo que se conoce como *heterogeneidad alélica* de la enfermedad.

Si bien estos modelos de herencia sencillos se cumplen para algunas enfermedades, existen casos en los que la realidad es más compleja, debido a que en ocasiones, las mutaciones no se manifiestan en todos los individuos en los que están presentes. Se habla entonces de *penetrancia incompleta* y, así, personas portadoras de una misma mutación, a veces en una misma familia, pueden presentar diferentes grados de afectación o incluso

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. 48903 Barakaldo, Bizkaia

ser totalmente asintomáticos. En este sentido, la *penetrancia* de un alelo hace referencia a su expresión y, puede verse influenciada por su interacción con otros genes, así como, por factores no genéticos como la edad, sexo o el medio ambiente. Por ejemplo, el riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres portadoras de una mutación en el gen *BRCA1*, está en función de la edad y es del 37%, 66% y 85% a los 40, 55 y 80 años de edad, respectivamente, en comparación al 0,4%, 3% y 8% de mujeres sin la mutación de los mismos grupos de edad. En el otro extremo, estarían aquellos casos en los que una determinada enfermedad aparece sin que sea posible detectar alteración genética alguna. Estos casos se catalogan como *fenocopias* (fenotipos idénticos que responden a diferentes genotipos) y pueden deberse a que la enfermedad está causada por otros mecanismos, bien genéticos, bien ambientales. Además, no hemos de olvidar que una misma enfermedad puede originarse por mutaciones en distintos genes, sobre todo, cuando todos ellos pertenecen a la misma ruta metabólica (p. ej., síntesis de una hormona). Este fenómeno recibe el nombre de *heterogeneidad genética* de una enfermedad.

En los últimos años se han descubierto otros mecanismos de herencia diferentes de los "clásicos" descritos anteriormente y que pueden tener importancia en la transmisión y desarrollo de enfermedades genéticas. Entre estos fenómenos se encuentra la *herencia mitocondrial* (recuérdese que las mitocondrias portan su propio material genético) en la que la enfermedad sólo puede ser transmitida por la madre, ya que solo se heredan las mitocondrias de la línea materna. En segundo lugar, el *imprinting* o inactivación alélica es un proceso normal que ocurre en determinados genes y que consiste en la inactivación selectiva de uno de los alelos heredados, de forma que sólo uno de los dos alelos es totalmente funcional. Se habla de *imprinting materno* cuando el alelo inactivo se hereda de la línea materna y de *imprinting paterno* cuando se trata del alelo paterno. La diferente actividad que pueden presentar cada uno de los alelos puede influir en la expresión fenotípica de una mutación. Así por ejemplo, en el síndrome X-frágil, las niñas que heredan la mutación de su madre están más afectadas que las que la heredan de su padre. También merecen mención especial las enfermedades caracterizadas por un aumento del número de tripletes repetidos o *expansión alélica* (véase el caso de *Distrofia Miotónica en el cap. 5*), mutaciones dinámicas que parecen ser responsables de fenómenos de *anticipación* o aparición a edad más temprana de la sintomatología en la descendencia.

1.2. Identificación del gen responsable

A pesar de su valor para la determinación del riesgo a padecer una enfermedad, el conocimiento del patrón de herencia no aporta información acerca de la identidad o localización del gen portador de la mutación responsable del trastorno. La identificación del gen responsable de la enfermedad es fundamental para poder diseñar una prueba de diagnóstico genético fiable. Se trata de una tarea muy compleja y la estrategia a emplear estará condicionada por la información previa de la que se disponga.

1.2.1. Estrategia de gen candidato

En algunos casos existe información detallada acerca de la alteración metabólica o bioquímica (déficit enzimático, hormonal, etc.) asociada a la enfermedad o es posible que se conozca la secuencia de aminoácidos de la proteína afectada, el tejido donde se expresa, etc. Estos conocimientos nos orientarán acerca de la localización e identidad del gen responsable (*gen candidato*). Cuando se ha elegido un gen candidato, es extremadamente útil conocer genes homólogos de otras especies, que serán utilizados como sondas de hibridación a genotecas para el aislamiento del gen humano (véase el apartado 2). Si por el contrario, lo que se pretende es determinar su localización cromosómica, la hibridación se lleva a cabo sobre una preparación de cromosomas (*hibridación in situ*). Otra posibilidad para obtener sondas de hibridación es sintetizarlas en el laboratorio conforme a la secuencia de aminoácidos de la proteína, si ésta es conocida.

Una vez caracterizado el gen y conocidas su secuencia y estructura puede compararse con el mismo gen de individuos que padecen la enfermedad, para detectar posibles mutaciones. La naturaleza de las alteraciones descubiertas condicionará la estrategia ideal para las futuras técnicas de *screening* de enfermos a mayor escala (como se vio en capítulos anteriores).

1.2.2. Estrategia de aislamiento o clonaje posicional

Aunque la presencia de un gen candidato es la situación de partida ideal, las enfermedades genéticas para las que el defecto metabólico es conocido son escasas y en la mayoría de los casos no se dispone de información funcional. En estos casos, se ha de optar por otro enfoque metodológico, como es la estrategia de *aislamiento o clonaje posicional*. Mediante este procedimiento se persigue reducir al mínimo tamaño la región del genoma en la que puede encontrarse el gen responsable de la enfermedad, para luego analizar esta región en detalle y descubrir el *locus* concreto. En el planteamiento clásico de esta estrategia, el proceso comienza con la localización cromosómica del gen, para lo que se recurre a todo aquello que pueda aportar claves al respecto. Así, se analizan los casos de la misma enfermedad en los que se hayan observado aneuploidías, deleciones o malformaciones cromosómicas. También es lógico pensar que los genes responsables de aquellas enfermedades genéticas que aparezcan frecuentemente asociadas se encuentren físicamente cerca, en un mismo cromosoma. Hasta hace pocos años la asignación de un trastorno a un cromosoma era imprescindible para iniciar este tipo de estudios. Hoy en día, gracias a la automatización y rapidez con los que se pueden realizar análisis genéticos en un gran número de muestras, se puede recurrir directamente al *análisis de ligamiento*.

Recordaremos brevemente los fundamentos teóricos de este tipo de análisis. En primer lugar, es un hecho conocido que los pares de cromosomas homólogos de un individuo (materno y paterno) pueden sufrir *recombinación* durante la meiosis, de forma que se rompen y reorganizan. La probabilidad de que ocurra una recombinación cromosómica entre dos *loci* se mide en centiMorgan (cM), y será mayor cuanto mayor sea la distancia física que los separa. Así, es poco probable que el cromosoma se

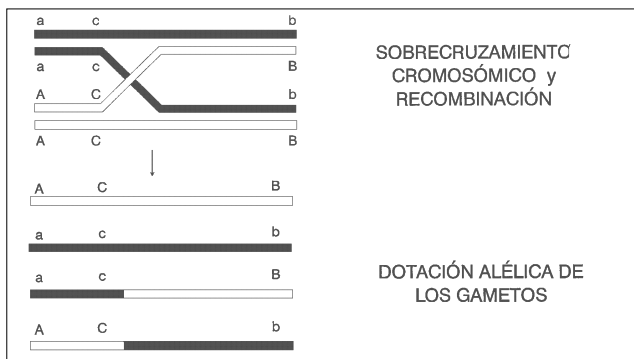


Figura 2. Esquema de recombinación genética en un cromosoma. Los cromosomas homólogos se aparean y sobrecruzan durante la meiosis, de forma que puede ocurrir intercambio de material entre ambos (recombinación). Cuando los loci están muy alejados (Aa y Bb), la recombinación entre ellos es frecuente, mientras que cuando están próximos (ligados), tienen tendencia a seguir unidos a pesar de la recombinación cromosómica (Aa y

rompa entre dos *loci* muy próximos entre sí, y ocurra una recombinación, por lo que tenderán a heredarse juntos (Fig. 2). Se dice entonces que estos *loci* están **ligados** (o que existe **ligamiento** entre ellos) en función de su proximidad. En segundo lugar, se sabe que en el genoma humano existen numerosas regiones polimórficas (de gran variabilidad alélica) que pueden servir para la caracterización o tipaje de individuos o poblaciones.

El análisis de ligamiento aprovecha estos dos fenómenos e intenta localizar aquellos *loci* polimórficos que se encuentran ligados (próximos) al *locus* desconocido que alberga el gen de la enfermedad. Es decir, aun desconociendo el gen concreto que produce la enfermedad, la herencia de un *locus* próximo a él puede servir como **marcador genético** de la herencia de la enfermedad. Normalmente, este tipo de análisis se realiza en familias con individuos afectados, en las que se estudia el modo en el que se heredan los alelos de diferentes *loci* polimórficos en relación a la transmisión de la enfermedad (Fig. 3).

La tecnología actual (PCR, secuenciadores automáticos, informática potente, etc.) permite analizar de forma rápida numerosos marcadores repartidos por todo el genoma para descubrir aquellos que están ligados a la enfermedad. Estos marcadores pueden servir como recurso provisional y utilizarse para analizar el riesgo que presentan los familiares de un enfermo de padecer la enfermedad. Cuanto menor sea la distancia entre el marcador y el verdadero gen que provoca la enfermedad el ligamiento será mayor y por lo tanto, el marcador será más fiable para el diagnóstico. Además, una vez localizado el área en el que presumiblemente está situado el gen de susceptibilidad a la enfermedad, se puede analizar esta región con mayor detalle para encontrar el gen responsable.

Clásicamente, los estudios de ligamiento se han realizado en **grandes árboles genealógicos** y con numerosos individuos afectados en varias generaciones (ésta es una característica de enfermedades con una prevalencia relativamente alta). En enfermedades menos frecuentes, el número de enfermos por familia es sensiblemente menor y se han diseñado otro tipo de análisis, co-

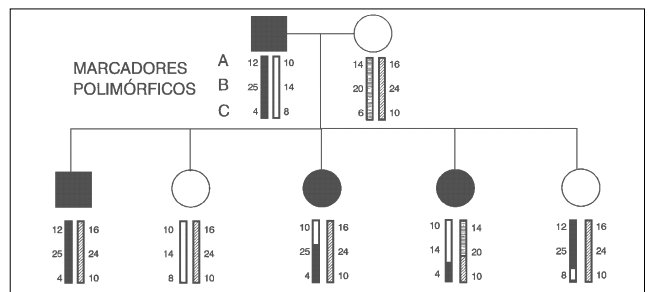


Figura 3. Esquema de un análisis de ligamiento con diferentes marcadores (loci A, B y C). La observación de los alelos heredados en función de la herencia de la enfermedad (símbolos negros), nos informa que el gen de la enfermedad está ligado al locus C, ya que, a pesar de que ocurren recombinaciones, la enfermedad se transmite en todos los casos en que se hereda el alelo 4.

mo el grado de identidad genética en **parejas de hermanos afectados**. Otros estudios analizan en familias con algún enfermo, la proporción de transmisión de los alelos de determinados marcadores a la descendencia enferma y a la sana, asumiendo que cuando existe **desequilibrio de transmisión**, es decir, cuando un alelo es transmitido con mayor frecuencia a los hijos enfermos, dicho *locus* está ligado a la enfermedad.

1.3. Enfermedades poligénicas y multifactoriales:

Si la localización del gen responsable de una enfermedad monogénica es complicada, aún es más difícil identificar los genes que intervienen en el desarrollo de enfermedades **poligénicas** (aquellas que resultan de alteraciones en varios genes) y **multifactoriales** (producidas por la interacción de factores ambientales y un conjunto de determinantes genéticos). Esto se complica por el hecho de que estas enfermedades no siguen un patrón de herencia clásico y además, su prevalencia, incluso en el seno de familias con individuos afectados, es relativamente baja. No obstante, se están realizando grandes avances para explicar la herencia de desórdenes tan comunes y a la vez tan complejos como la diabetes infanto-juvenil, la esquizofrenia o el cáncer, para los que se han descrito varios *loci* implicados.

2. Genotecas: Herramienta para el aislamiento de genes

El avance de la tecnología molecular ha permitido en los últimos años disponer de métodos para la identificación y caracterización de genes y proteínas importantes en el desarrollo de enfermedades. Una de las técnicas más frecuentemente utilizadas es la derivada del estudio de una **"librería" de genes** (del inglés *gene library*) o **genoteca**. En las siguientes líneas describiremos someramente el concepto de genoteca y el fundamento y utilidad de su estudio. Como en los capítulos precedentes, nuestra intención es la de introducir nueva terminología pero sin entrar en profundos detalles técnicos para los que existen manuales detallados. Como ejemplo describiremos un caso en el que se utilizó una genoteca para aislar una molécula asociada a la diabetes tipo I.

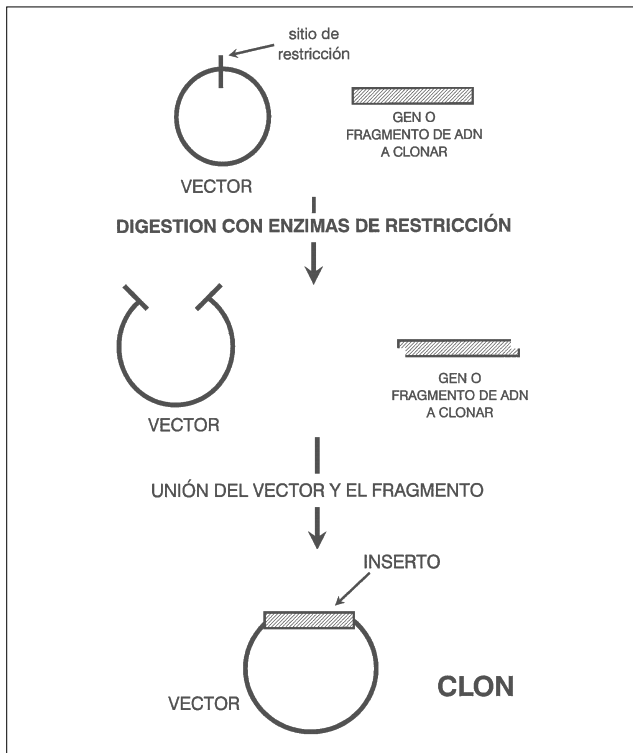


Figura 4. Proceso de clonaje de un fragmento de ADN en un vector.

2.1. Clonaje de genes

Para aislar un gen de entre todo el genoma, con el objetivo de conocer su estructura y función, o para manipularlo, se utiliza la tecnología de **clonaje** de genes. Generalmente se entiende por “clonaje de un gen” (o de un fragmento de ADN), la inserción o introducción del mismo en un vector (Fig. 4); una vez que hemos clonado un gen o un fragmento de ADN en un vector se puede trabajar sobre él (amplificarlo, mutarlo, etc.). Un **vector** es una estructura de ADN de organismos sencillos (virus, levaduras, etc.) que se puede manipular en el laboratorio (cortarlo, introducirlo en células, etc.), y nos facilita el trabajo con los genes que queremos estudiar (Fig. 4). El conjunto del vector y de su fragmento o gen insertado (*inserto*) se denomina **clon** (clon: vector + inserto).

2.2. Genotecas: Concepto y tipos

Una “*librería*” de genes o genoteca es un conjunto de clones, cada uno de los cuales está formado por un vector que contiene un fragmento de ADN (Fig. 5). En función del origen del ADN de los insertos existen dos tipos de genotecas. Cuando el ADN con el que se construye la genoteca es ADN de todo el genoma de un organismo hablamos de **genotecas genómicas** (Figs. 5 y 6), en cuyo caso cada clon de la genoteca contiene un fragmento diferente de ADN, representando el conjunto de todos los clones la totalidad del genoma celular. Por otro lado, existen las **genotecas de ADN complementario** en las que los fragmentos de ADN insertados en los vectores proceden del ADN complementario (ADNc) producido *in vitro* en el laboratorio, a partir

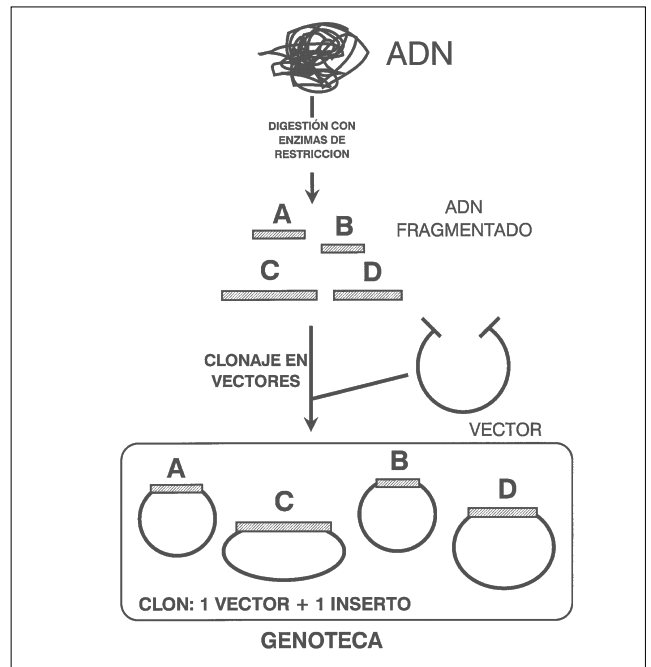


Figura 5. Construcción de una genoteca.

del ARN mensajero (ARNm) de una determinada célula o tejido (Figs. 5 y 6).

Todas las células de un organismo poseen una dotación genómica idéntica (tienen los mismos genes). Por este motivo, el conjunto de clones que forman una genoteca genómica tiene todos los genes de ese organismo y es representativa del mismo. Por el contrario en una genoteca de ADN complementario, los genes insertados proceden del ARN mensajero y son específicas del tejido del que se aisló el ARN mensajero (recordemos que el ARN mensajero de cada tejido corresponde a las proteínas que se producen en el mismo, por lo que los genes que no se expresan en ese tejido no tendrán representación en la genoteca) (*véase cap. 2*).

2.3. ¿Como construir una genoteca?

La creación de una genoteca consiste en introducir el ADN, fragmentado, en vectores para formar los clones. El número de clones de que consta la genoteca estará en función del número de fragmentos de ADN del que consta la misma (un fragmento por vector y por clon); hay que recordar que el tamaño de los insertos es de pocas kilobases, por lo cual una genoteca genómica (p. ej., humana) estará formada por varios millones de clones.

La construcción de una genoteca (Fig. 3) incluye varios pasos:

A.- Extracción del ADN genómico de cualquier tejido (genoteca genómica) o del ARNm del tejido del que se quiere hacer la genoteca (genoteca de ADNc). En las genotecas de ADNc, producción de ADNc.

B.- Fragmentación del ADN con enzimas de restricción.

C.- Introducción de cada fragmento en un vector, para formar los clones.

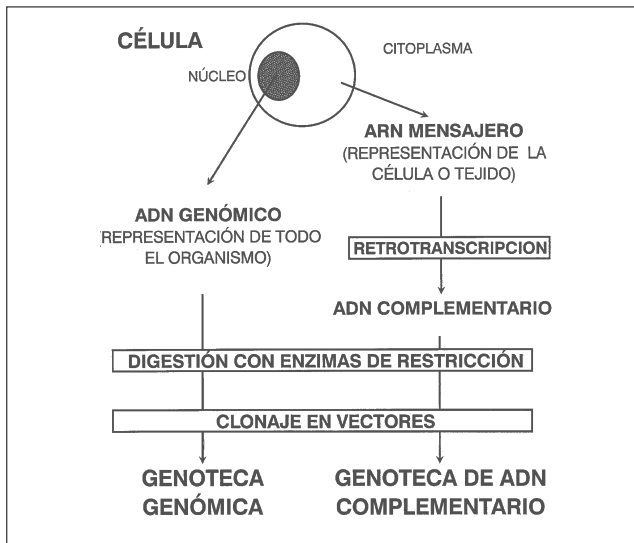


Figura 6. Tipos de genotecas, en función del origen del ADN que las forma.

2.4. ¿Cómo aislar genes en una genoteca?

El estudio de una genoteca puede ser un sistema adecuado para poder aislar y caracterizar genes aún no conocidos. El aislamiento de un gen de una genoteca supone encontrar el clon que lo contiene entre los millones de clones que la forman.

Para poder encontrar ese clon debemos disponer de un útil de búsqueda que consiste, generalmente, en una sonda de ADN (p. ej., de un gen conocido de una especie animal para aislar el gen humano) o en un anticuerpo específico (p. ej., si disponemos de un anticuerpo contra una proteína es posible utilizarlo para aislar el gen que la codifica). En las enfermedades autoinmunes, en las que existen autoanticuerpos circulantes contra distintas moléculas, se ha utilizado esta tecnología para identificar los genes y sus productos proteicos sobre los que se había desarrollado la autorrespuesta inmune (véase ejemplo más adelante).

El principio del trabajo de búsqueda consiste en que la sonda de ADN o el anticuerpo sean marcados con algún sistema de detección (radioactividad, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, etc.) y que esa sonda se hibride al ADN del clon que contiene el gen que buscamos (véase cap. 3) (Fig. 7). El uso de un anticuerpo como sistema de búsqueda de un gen se basa en que éste reconoce la proteína contra la que se ha formado. Existe un método de aislamiento de genes en el que cada clon de una genoteca se introduce en una bacteria (p. ej., *Escherichia coli*) que es capaz de producir la proteína correspondiente al ADN del clon que hemos introducido. Esta proteína, expresada en la superficie bacteriana, es reconocida por el anticuerpo, que solo se pegará a la bacteria que la produce. Una vez identificado el clon de la genoteca que contiene el gen buscado se puede extraer su ADN para amplificar el inserto y caracterizarlo (Fig. 7).

2.5. Ejemplo práctico: Identificación de la proteína

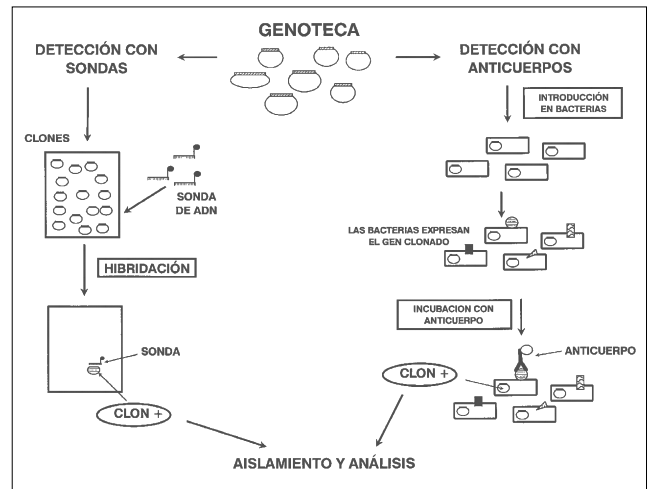


Figura 7. Métodos de estudio de una genoteca para el aislamiento de genes.

carboxipeptidasa H como antígeno en la diabetes tipo I

2.5.1. Problema

La diabetes tipo I es una enfermedad autoinmune en la que existen autoanticuerpos circulantes contra distintas proteínas, alguna de las cuales aún no ha sido identificada.

2.5.2. Objetivo

Identificación de las moléculas del organismo contra las que está dirigida la respuesta inmune característica de la diabetes tipo I.

2.5.3. Plan y material de trabajo

Se plantea, en primer lugar, la creación de una genoteca. El tipo de genoteca a construir está en función de la enfermedad que queremos estudiar y del órgano afectado. En este caso, los genes y las proteínas que se pretenden identificar están asociados a la diabetes tipo I, por lo que se plantea la construcción de una genoteca de ADN complementario de páncreas (también se podría utilizar una genoteca más específica de islotes de Langerhans). En otras ocasiones se han utilizado genotecas de tiroides para identificar genes asociados a cuadros de tiroiditis o genotecas de glándula suprarrenal en la enfermedad de Addison, etc.

Para la construcción de la genoteca de ADN complementario de páncreas, se aísla el ARN mensajero del órgano y se sintetiza el ADNc por retrotranscripción *in vitro* (véase cap. 2). El ADNc se fragmenta con enzimas de restricción y se inserta en vectores (clonaje).

Como sistema de detección se utilizan autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes con diabetes tipo I, dado que estos pacientes presentan anticuerpos circulantes contra algunas proteínas conocidas como la insulina y otros anticuerpos contra otras proteínas aún no identificadas.

2.5.4. Resultados y discusión

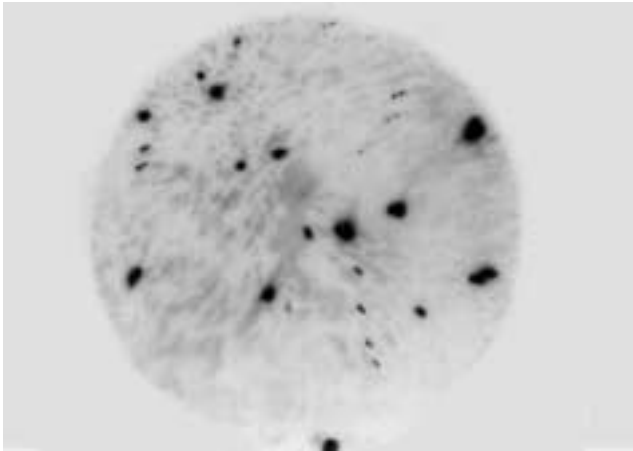


Figura 8. Resultado del screening de una genoteca: imagen de un filtro de nitrocelulosa en el que se observan puntos negros, correspondientes a clones positivos, sobre un fondo de clones negativos (puntos más claros).

El estudio de más de un millón de clones permitió identificar uno cuya proteína era reconocida por los autoanticuerpos circulantes de un paciente diabético (Fig. 8). El aislamiento del clon, y la posterior secuenciación del fragmento de ADN insertado demostró que se trataba del gen de la carboxipeptidasa H. De esta forma se demuestra que algunos diabéticos tienen autoanticuerpos contra esta proteína, que se localiza en las células β de los islotes pancreáticos. Una vez identificado un gen o una molécula, comienza una nueva etapa de estudio que incluye su caracterización funcional y su papel en la enfermedad estudiada.

Glosario

Anticipación: tendencia de algunas enfermedades para que en cada generación sucesiva, se manifieste de forma más grave y más temprana.

Clon: molécula de ADN formada por un **vector** y un **inserto**.

Clonaje: introducción de un gen (o fragmento de ADN) en un vector.

Fenocopia: aparición del mismo fenotipo sin que exista la misma dotación genética.

Genoteca: conjunto de clones que contienen toda la información genética de un organismo (genoteca **genómica**) o la que se expresa en un tejido (genoteca de **ADN complementario**).

Herencia autosómica dominante: aquella que se manifiesta con la alteración de uno de los dos alelos del gen implicado (heterocigotos afectados).

Herencia autosómica recesiva: aquella que se manifiesta únicamente si ambos alelos del gen están alterados (afectos sólo los homocigotos).

Herencia holoándrica: véase **herencia ligada al cromosoma Y**.

Herencia ligada al cromosoma X: aquella en la que están implicados genes del cromosoma X. Generalmente es de carácter recesivo, y se manifiesta en varones, mientras que las mujeres suelen ser portadoras no afectas.

Herencia ligada al cromosoma Y: aquella en la que están implicados genes del cromosoma Y. Afecta sólo a varones.

Herencia mitocondrial: herencia de los genes mitocondriales, que ocurre únicamente por vía materna.

Heterogeneidad alélica: distintas mutaciones de un mismo gen producen la misma enfermedad.

Heterogeneidad genética: una misma enfermedad puede originarse por alteraciones de genes distintos.

Imprinting: inactivación selectiva de uno de los dos alelos de un gen. El **imprinting materno**, o inactivación del alelo materno, supone preponderancia del alelo paterno, y viceversa.

Inactivación alélica: véase **imprinting**.

Inserto: fragmento de ADN (uno o varios genes, o una parte de un gen) que se ha introducido en un vector.

Ligamiento: se dice que dos genes están **ligados**, cuando, debido a su proximidad física en el mismo cromosoma, tienden a heredarse conjuntamente. Cuando existe ligamiento, la probabilidad de **recombinación** entre dos genes es baja.

Penetrancia incompleta: cuando un determinado carácter genético, influenciado por otros genes o el ambiente, no se manifiesta en todos los portadores del mismo.

Penetrancia: grado de manifestación de un carácter genético.

Recombinación: fenómeno que ocurre durante la meiosis, en la que los cromosomas homólogos se rompen y reorganizan, con lo que genes situados en el mismo cromosoma pueden separarse, y genes inicialmente en cromosomas homólogos diferentes, pueden transmitirse juntos.

Vector: molécula de ADN (viral, bacteriana, etc.), que se utiliza como estructura para replicar o manipular material genético en el laboratorio.

Bibliografía

- 1 Castaño L, Bilbao JR. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (1): Conceptos básicos. *An. Esp. Pediatr.* 1996; **45**:315-320.
- 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.* 1996; **45**:541-546.
- 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.* 1997; **46**:87-92.
- 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.* 1997; **46**:305-310.
- 5 Castaño L, Bilbao JR, Urrutia I. 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. *An. Esp. Pediatr.* 1997; **46**:513-518.
- 6 Castaño L, Bilbao JR, Calvo B. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (6): Caso clínico: Trastorno molecular en la diabetes insípida central. Análisis de un gen polimórfico: tipaje HLA. *An. Esp. Pediatr.* 1997; **47**:201-206.
- 7 Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA, 2ª ed. Scientific American Books, New York, 1992.
- 8 Lander ES, Schork J. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; **265**:2037-2048.
- 9 Castaño L, Russo E, Zhou L, Lipes MA, Eisenbarth GS. Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase H) associated