

L. Castaño, J.R. Bilbao,
G. Pérez de Nanclares

An Esp Pediatr 1997;47:653-658.

Introducción

A lo largo de los capítulos anteriores de esta serie se han descrito un conjunto de técnicas que pueden utilizarse para la detección y/o identificación de una mutación en el ADN responsable de una enfermedad. En esta ocasión, volveremos a abordar este tema, presentando muy brevemente un pequeño grupo de métodos alternativos, que aunque de uso menos frecuente, no dejan de ser interesantes y sobre todo, útiles. Posteriormente, presentaremos un ejemplo de la aplicación de una de estas técnicas a un caso clínico.

En la segunda parte de este capítulo, abordaremos un aspecto clave de la aplicación de la Biología Molecular en el estudio de problemas genéticos humanos, como es la creación de animales transgénicos.

1. Métodos de detección de mutaciones

Como ya se ha mencionado en anteriores capítulos, la técnica definitiva para la detección e identificación de una alteración en el genoma es la secuenciación del fragmento de ADN en el que se encuentra dicha mutación. No obstante, la secuenciación de ADN es un proceso largo y costoso y se han ideado una serie de métodos alternativos para la búsqueda de mutaciones genéticas. Como se vio en los capítulos 3 y 4, algunos de estos métodos únicamente detectan la presencia de una alteración, pero son incapaces de identificarla (SSCP, DGGE, ...), por lo que son utilizados como herramientas de *screening* inicial, a los que seguirá una secuenciación. Existe otro grupo de métodos que detectan y localizan la alteración (RFLP, PCR-ASO, ...), pero su uso está restringido al análisis de mutaciones ya conocidas con anterioridad.

El desarrollo de nuevas técnicas de análisis de mutaciones rápidas, sensibles y sobre todo, aplicables a gran escala, continúa y con frecuencia aparecen nuevos métodos en la literatura. Algunos de ellos son aplicables solamente a casos muy concretos, mientras otros son excesivamente complicados de poner a punto, o bien exigen equipamientos poco asequibles. Otros, en cambio, constituyen avances importantes y pueden ser fácilmente adaptados a diferentes campos de estudio por distintos labora-

Introducción a la Biología Molecular y aplicación a la Pediatría (8): Métodos adicionales para la detección de mutaciones. Caso clínico: Hemocromatosis en una familia. Animales transgénicos.

torios. A continuación, describiremos brevemente algunas de estas técnicas. Una vez más, nuestro objetivo no es profundizar en los aspectos técnicos de las mismas, sino simplemente que el lector se familiarice con la nomenclatura empleada.

1.1. Métodos de estudio de mutaciones desconocidas

- **RNase cleavage** (corte con RNasa - *ribonucleasa*). El fundamento de esta técnica es la capacidad de la RNasa de cortar ARN monocatenario. El método consiste en la hibridación en solución, del fragmento de ADN a analizar con una molécula de ARNm (marcada con radioactividad, fluorescencia, etc.) correspondiente al gen normal (obtenida por transcripción *in vitro* en el laboratorio) que se utiliza como sonda. Si la muestra de ADN es normal, es decir, idéntica al ARNm, se formará un híbrido bicatenario ADN:ARN perfecto. Si por el contrario, el ADN presenta alguna alteración (mutación puntual, inserción o deleción) existirán zonas no complementarias (en inglés, *mismatch*), formándose bucles monocatenarios. Estas regiones monocatenarias del ARN son atacables por la enzima RNasa, que corta la molécula en este punto. El corte de la RNasa provocará en la "sonda" de ARNm una reducción de la longitud, que es detectable mediante electroforesis. Esta técnica localiza el punto exacto en el que ha ocurrido la mutación, pero no identifica la naturaleza de la misma.

- **CCM (Chemical Cleavage Method)** (Método del corte químico). Como en el caso anterior, esta tecnología también se basa en el corte de regiones no complementarias entre híbridos formados por la muestra de ADN a analizar y un fragmento del gen normal (ADN o ARN). La diferencia fundamental con el *RNase cleavage* estriba en el agente utilizado para cortar el ADN, que en este caso es un compuesto químico (piperidina).

- **EMC (Enzymatic Mismatch Cleavage)** (Método de corte enzimático). De nuevo, los híbridos generados por la desnaturalización por calor y posterior renaturalización de la molécula de ADN a estudio en presencia de ADN normal son sometidos a corte con las enzimas T4 endonucleasa I o T7 endonucleasa I (llamadas también *resolvases*). Estas enzimas digieren el ADN en puntos no apareados. Como en los casos anteriores, tras la reacción, los productos se analizan por electroforesis, y la aparición de fragmentos de tamaño inferior al inicial indican presencia de mutación.

- **CFLP (Cleavage Fragment Length Polymorphism)** (Polimorfismo del tamaño de los fragmentos de corte). De for-

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.

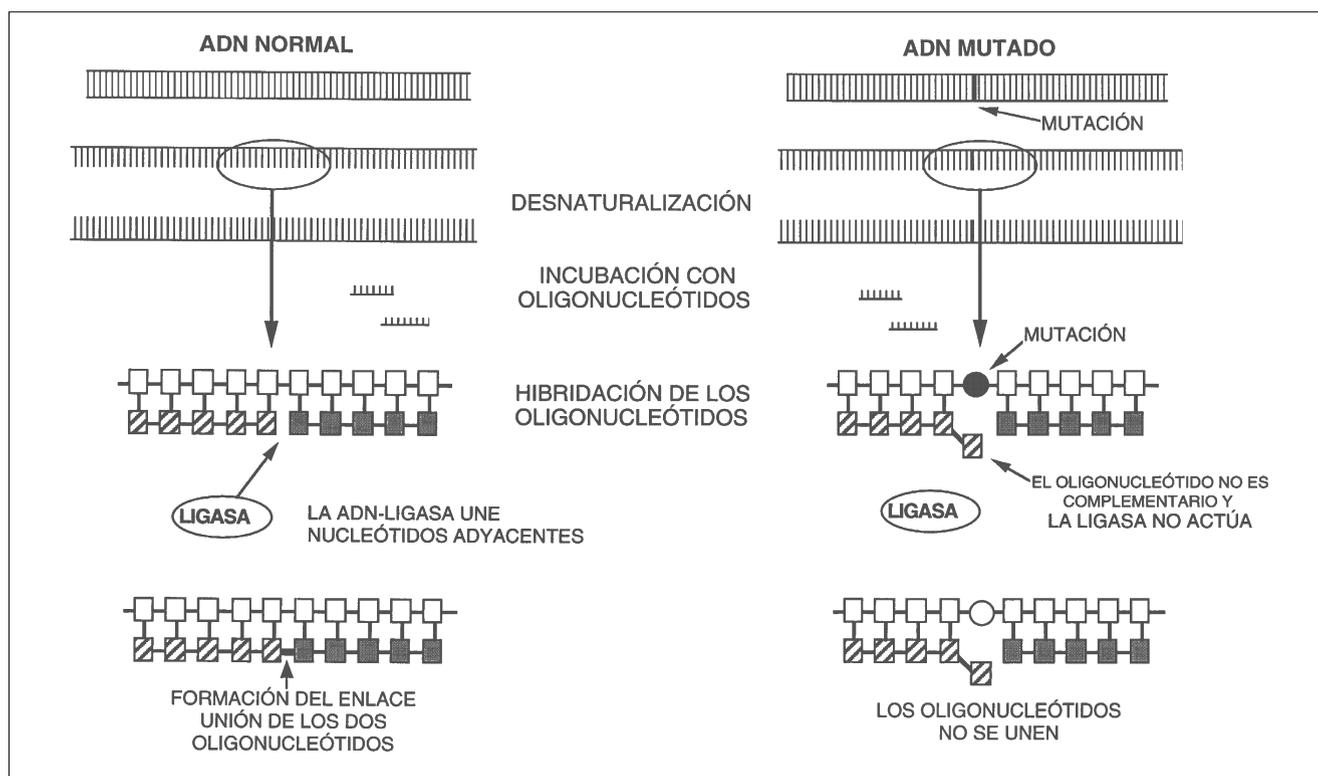


Figura 1. Fundamentos de la técnica OLA. En el dibujo de la izquierda, la ADN-ligasa une los dos oligonucleótidos que hibridan perfectamente con el ADN molde. Por el contrario, si existe un cambio de base en el molde (derecha), la hibridación no es perfecta, y la ADN-ligasa no puede actuar uniendo los oligos entre sí.

ma análoga al RFLP, el CFLP detecta los cambios en la secuencia de ADN en base a diferencias en el patrón de bandas observables por electroforesis tras la digestión con la enzima endonucleasa *cleavase I*. La técnica se apoya en la capacidad de esta enzima para cortar el ADN en las zonas de transición de molécula monocatenaria a bicatenaria. El método consiste en la formación de estructuras secundarias (de doble cadena) en cada una de las hebras de ADN tras la desnaturalización de la molécula de ADN. Como en el caso del SSCP (*Capítulo 3*), alteraciones de la secuencia (mutaciones) provocan cambios en la estructura secundaria de la hebras del ADN y moléculas de secuencias diferentes presentarán patrones de corte diferentes. El método no localiza la mutación.

- **PTT (Protein Truncation Test)** (Test de Proteína truncada). Este método detecta mutaciones *nonsense* (aquellas que codifican un codón *stop* o de terminación), que producirán una proteína truncada a partir del punto de la mutación. El gen amplificado se utiliza como molde en una reacción de transcripción/traducción *in vitro* y los productos de la reacción (péptidos) se analizan por electroforesis. La presencia de un codón *stop* prematuro se traduce en una proteína de menor tamaño.

- **ddF (Dideoxy-Fingerprinting)** ("Huella" dideoxi). Este método es una combinación de la secuenciación y el SSCP. Así, los productos de una reacción de secuenciación de "un solo tubo" (por ejemplo, sólo ddA) se someten a electroforesis en con-

diciones no desnaturizantes, como en un SSCP. Debido a que la reacción de pseudosecuenciación produce múltiples fragmentos monocatenarios, la sensibilidad del método multiplica considerablemente la del SSCP (en la que se corre un solo fragmento). La detección de la mutación se consigue comparando el patrón de bandas obtenido con el patrón de bandas de una muestra normal.

1.2. Métodos para mutaciones conocidas

- **Single Nucleotide Primer Extension** (Extensión de un nucleótido). El método se conoce también como "*minisecuenciación*", y consiste en diseñar un *primer* que termina un nucleótido antes de la supuesta mutación, de forma que la siguiente base distinga la secuencia normal de la mutada; por ejemplo, "A" en los individuos sanos y "C" en los enfermos. Si en una reacción se incuban el ADN a analizar con el *primer* y una ADN-polimerasa en presencia de únicamente el nucleótido dCTP marcado (que aporta la "C" - citosina - a la reacción), se producirá la elongación del *primer* sólo en los individuos mutados (en los que "C" es la siguiente base). La electroforesis de los productos de la reacción revelará presencia de fragmentos marcados (por incorporación del nucleótido) únicamente en los individuos afectados.

- **OLA (Oligonucleotide ligation assay)** (Ensayo de ligado de oligonucleótidos). Se basa en la capacidad de la enzima ADN-

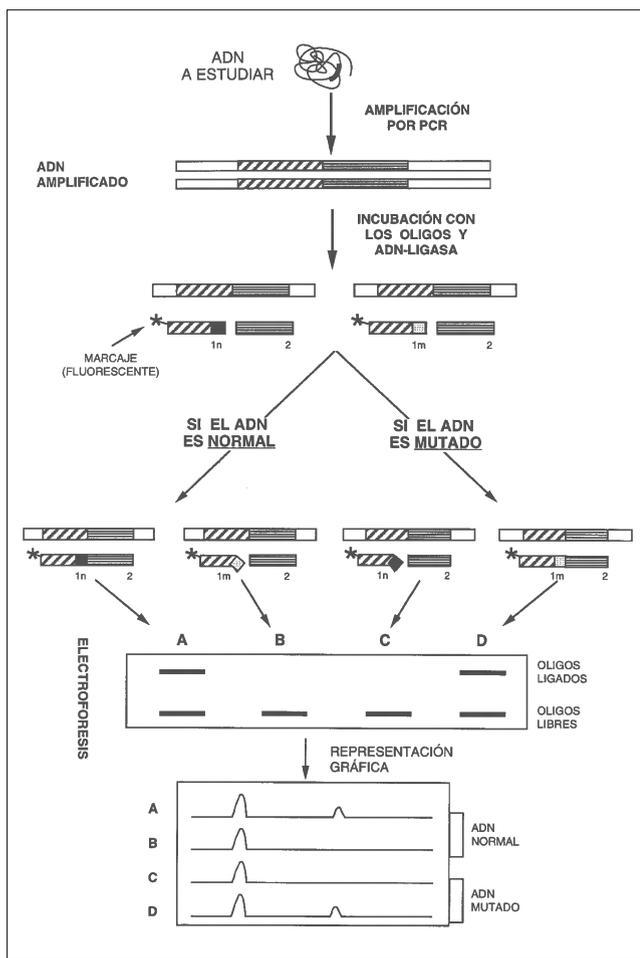


Figura 2. Representación esquemática de la técnica OLA aplicada en este estudio. El fragmento a analizar se amplifica por PCR y se incuba en dos tubos, uno correspondiente al nucleótido normal (oligo 1n) y el otro al mutado (oligo 1m) junto con el oligo común (oligo 2). Si se trata de un individuo normal, sólo se producirá hibridación (y consiguiente unión de los oligonucleótidos) en el tubo normal (1n+2), y observaremos una banda de mayor tamaño en la electroforesis (calle A). Para el ADN normal, no se produce unión en el tubo con oligonucleótido mutado, y no hay banda de mayor tamaño en la electroforesis (calle B). Con un ADN mutado, la banda mayor se formará en el tubo con los oligos 1m y 2 (calle D), pero no en el tubo con el oligo normal (calle C). Si se tratara de un individuo heterocigoto se daría ligamiento en ambos tubos (calles A+D). En el recuadro inferior, se observa la representación gráfica, en forma de picos, de la electroforesis realizada con oligos marcados con fluorescencia.

ligasa de unir dos fragmentos de ADN adyacentes únicamente cuando son totalmente complementarios en el punto de la unión a una cadena de ADN molde. Esta técnica se describe con detalle a continuación, en la presentación del caso clínico.

2. Caso clínico

2.1. Breve historia clínica

Mujer de 37 años, con rasgos bioquímicos característicos de hemocromatosis (índice de saturación de transferrina superior al 50%, así como concentración de ferritina superior a 1.000 mg/ml) y elevada cantidad de hierro en los hepatocitos. En la

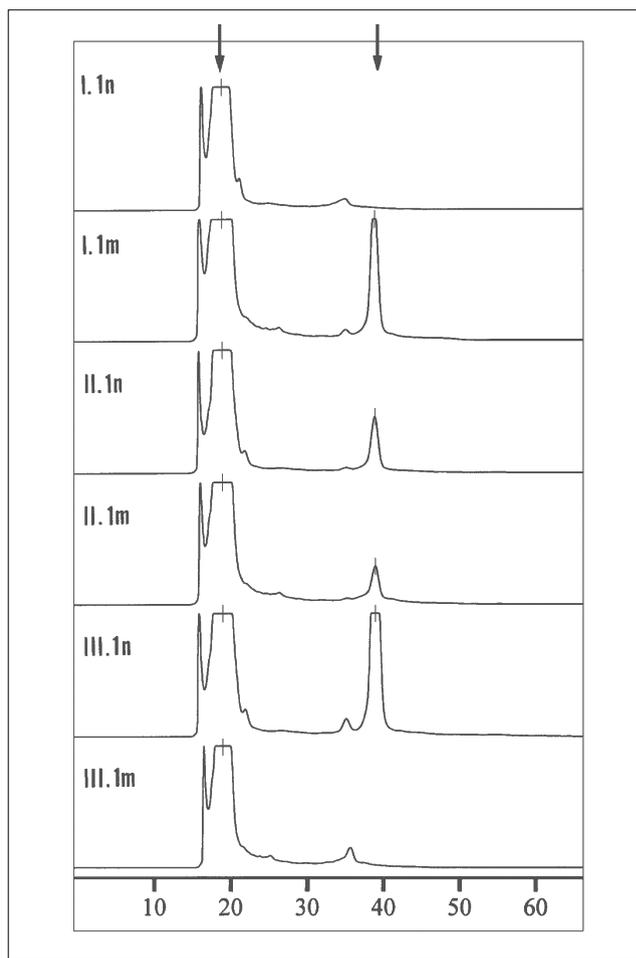


Figura 3. Resultados de un experimento OLA de las posibilidades genotípicas de la mutación causante de la hemocromatosis en el gen HLA-H, donde I es un individuo enfermo, homocigoto para la mutación; II es un individuo heterocigoto y III, un individuo homocigoto normal. 1n y 1m, corresponden a los experimentos realizados con el oligonucleótido que lleva la base normal y mutada, respectivamente. Las flechas indican la posición de los picos; el primero de 20 nucleótidos, corresponde a los oligos libres y el segundo de 40 nucleótidos, a los oligos unidos.

historia familiar, su esposo está sano y tienen dos hijos, un niño de 10 años y una niña de 8.

2.2. Objetivo del estudio

Confirmación, mediante el estudio genético, del diagnóstico clínico de hemocromatosis primaria en el caso índice. Estudiar la posible presencia de alteración genética en los familiares asintomáticos, como técnica de diagnóstico precoz y para su utilización en consejo genético.

2.3. Planteamiento del estudio genético y resultados del análisis molecular

2.3.1. Conocimiento del gen responsable y su estructura

La hemocromatosis familiar es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la acumulación excesiva de hierro en

los tejidos, lo que puede ocasionar desórdenes secundarios como cirrosis, diabetes, cardiomiopatías, artritis, entre otros.

Estudios recientes han asociado esta alteración al gen *HLA-H* o *HFE*, localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3). Este gen está constituido por siete exones, habiéndose observado que en la mayoría de los pacientes diagnosticados con hemocromatosis aparece una mutación en homocigosis (ambos alelos están mutados) en el exón 4. Esta mutación origina el cambio de una base guanina por una adenina, produciéndose la sustitución del aminoácido cisteína por tirosina en la proteína codificada.

2.3.2. Tecnología para la detección de la alteración genética

La técnica que utilizamos para este estudio se denomina *OLA* (del inglés *Oligonucleotide Ligation Assay*), basada en la capacidad de la enzima ADN-ligasa de unir dos oligonucleótidos adyacentes sólo cuando son totalmente complementarios a una hebra sencilla de ADN desnaturalizada (Figura 1).

Previamente a la realización de la técnica (Figura 2), se lleva a cabo la amplificación por PCR (véase capítulo 3) del fragmento del genoma donde probablemente se encuentra la mutación. El ADN amplificado será sometido a dos reacciones *OLA* independientes. En cada una de ellas, el ADN a analizar, que se utilizará como molde, se incubará con una pareja de oligonucleótidos (comúnmente llamados "oligos") adyacentes y complementarios al molde, y cuyo ligamiento se pretende conseguir (*oligo 1* y *oligo 2*). Uno de los oligonucleótidos utilizados es común en ambas reacciones (*oligo 2*), mientras que los otros dos corresponden a la secuencia normal (*oligo 1n*) y mutada (*oligo 1m*), respectivamente (los oligos *1n* y *1m* difieren únicamente en su última base). En una de las reacciones se incluyen, junto con el ADN problema (molde) y la ADN-ligasa, el oligonucleótido común (*oligo 2*) y el que corresponde a la secuencia normal (*oligo 1n*); lo llamaremos el "tubo normal". En este tubo, un ADN no mutado permitirá la unión de los dos oligonucleótidos (*1n+2*), mientras que la existencia de mutación impedirá el ligamiento. Al mismo tiempo, en la otra reacción ("tubo mutado"), se incluyen el oligonucleótido común (*oligo 2*) y el que corresponde a la secuencia mutada (*oligo 1m*) y ocurrirá lo contrario; es decir, únicamente se producirá ligamiento de los oligonucleótidos (*1m+2*) si la muestra de ADN a analizar presenta la mutación. Finalmente, los productos de cada una de las reacciones se someten a electroforesis en un gel de poliacrilamida. Los oligonucleótidos que no se han unido, al ser de menor tamaño, migran más rápidamente, pero si ocurre unión de los oligos entre sí, aparecerá una banda adicional de mayor tamaño. Es decir, la aparición de la banda superior indica ligamiento de los oligos, mientras que su ausencia indica que éste no se ha producido. Así, si la banda mayor aparece únicamente en el "tubo normal" (*oligos 1n+2*), se trata de un individuo sano y homocigoto para la secuencia normal. Si por el contrario, la banda mayor se produce sólo en el "tubo mutado" (*oligos 1m+2*), se trata de un individuo con la mutación en homocigosis. Por último, la presencia de banda aumentada en ambos

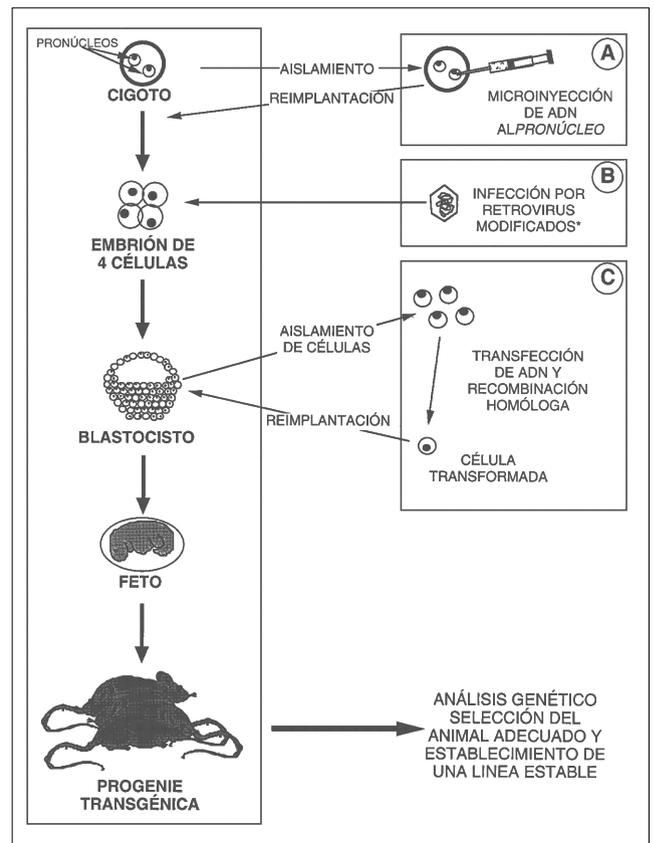


Figura 4. Metodología para la construcción de ratones transgénicos. Como se explica en el texto, es posible introducir ADN extraño mediante (A) inyección directa del mismo a uno de los pronúcleos del óvulo fecundado; (B) infección de células embrionarias con retrovirus manipulados que contienen el gen clonado (*en cualquier etapa del desarrollo embrionario), y (C) por transfección del gen a células embrionarias aisladas en las que el fragmento se inserta en el lugar que originalmente ocupaba el gen endógeno, sustituyéndolo.

tubos, normal y mutado, ocurrirá en muestras de individuos heterocigotos (Figuras 2 y 3).

Al analizar los resultados de la familia en estudio observamos que el padre y la hija estudiados son heterocigotos, mientras que la madre y el hijo son homocigotos para la mutación. Estos datos genéticos explicarían la sintomatología de la madre y es útil para el diagnóstico precoz del hijo mayor, dado que la hemocromatosis no puede ser determinada bioquímicamente a edades tan tempranas. En cuanto al consejo genético, deberá tenerse en cuenta que si este matrimonio tuviera nueva descendencia, existirán un 50% de probabilidades de que el descendiente padezca la enfermedad, así como que la hija de la familia es portadora de la alteración.

3. Animales transgénicos

El conocimiento de las alteraciones moleculares que subyacen a las enfermedades humanas es complicado, sobre todo en aquellos casos en los que están implicados distintos mecanis-

mos fisiológicos, gobernados por la genética, que interactúan unos con otros y con el medio ambiente. El desarrollo de los **animales transgénicos** (portadores de **transgenes**, o genes ajenos) proporciona nuevas estrategias experimentales para comprender procesos fisiopatológicos complejos, así como la oportunidad de crear animales con alteraciones genéticas bien definidas (modelos animales de una determinada enfermedad humana) que contribuyan en el estudio de las patologías. La metodología de la producción de animales transgénicos es sumamente complicada y nos limitaremos a introducir brevemente el tema, con el objetivo de que el lector obtenga una visión general de esta materia.

3.1. Metodologías para la construcción de animales transgénicos

El ratón es el animal transgénico por excelencia, debido al amplio conocimiento de su fisiología y su genética, así como a la larga tradición del trabajo con ratones en la experimentación. La producción de ratones transgénicos consiste en la introducción de ADN ajeno en las células del animal, de forma que este ADN se incorpore al genoma del ratón, se exprese en el animal y sea transmitido a su descendencia, con el fin de crear colonias estables de estos animales manipulados genéticamente.

La producción de ratones transgénicos implica la extracción de cigotos o embriones de ratón (en distintas fases de desarrollo), su manipulación genética *in vitro* y posterior implantación en “madres” que llevarán a término el desarrollo del nuevo animal. En la actualidad existen tres estrategias generales para la introducción de ADN ajeno en células embrionarias de ratón (Figura 4).

- **Microyección de ADN al pronúcleo del óvulo fertilizado.** Es la técnica más sencilla y más ampliamente utilizada, en la que el gen de interés se “introduce” literalmente al interior del pronúcleo del óvulo fecundado, que posteriormente es reimplantado en la madre portadora. Esta técnica presenta una serie de problemas: el investigador desconoce tanto, el lugar exacto del genoma del ratón en el que se ha incorporado el nuevo gen, como el número de copias del gen que han sido incorporadas.

- **Infección retroviral.** El gen de interés se clona en un vector vírico, que posteriormente se utiliza para infectar células embrionarias del animal en desarrollo. Presenta limitaciones en cuanto al tamaño máximo del gen que puede introducirse. Este método permite introducir una única copia del gen, así como elegir el momento del desarrollo embrionario en que será incorporado, pero tampoco es posible controlar el lugar exacto de inserción.

- **Recombinación homóloga.** Las dos estrategias anteriores no seleccionan el punto de inserción del nuevo gen, y presentan problemas a la hora de evaluar la alteración funcional producida, ya que la localización cromosómica del transgén puede influir sobre su propia funcionalidad, así como sobre el grado de expresión de genes endógenos (inactivación o sobreactivación). Esta última técnica, más compleja que las anteriores, supone la extracción de células embrionarias en estado de blastocisto, que

se mantienen en cultivo y conservan su pluripotencialidad. El gen extraño se introduce en estas células y en unos pocos casos sustituirá, por recombinación, al gen homólogo del animal, es decir, se sitúa en su lugar “original”. Las células manipuladas se reintroducen en el blastocisto, que se implanta en la madre portadora, para desarrollarse en ratones quiméricos (con células normales y manipuladas). Mediante cruzamientos consanguíneos de estos animales quiméricos puede crearse animales homocigotos para el transgén.

3.2. Estrategias con animales transgénicos

Al menos en teoría, las tecnologías de animales transgénicos permiten introducir en un animal material genético extraño con el propósito de provocar la expresión de nueva información genética, o bien conseguir la alteración o supresión total de la expresión de un gen endógeno. Con estas herramientas pueden estudiarse alteraciones genéticas puntuales en animales por lo demás intactos. A continuación se describen unos ejemplos de dichas estrategias.

- **Regulación y control de la expresión génica:** Mediante la manipulación de las regiones adyacentes a un gen pueden identificarse aquellas secuencias importantes para su regulación (zona promotora, véase capítulo 1), y entender los mecanismos por los que se produce la expresión de determinados genes únicamente en ciertos tejidos, así como la regulación temporal de dicha expresión.

- **Alteración de la expresión de genes endógenos:** Es posible sustituir la región promotora de un gen con el propósito de modular (en sentido positivo o negativo) la producción de un determinado metabolito, y estudiar las alteraciones que dicho cambio acarrea en el animal.

- **Estudios de funciones celulares mediante eliminación de líneas celulares:** Esta estrategia permite analizar la función que desempeña un tipo celular determinado, así como las relaciones que se establecen entre diferentes líneas celulares de determinados tejidos. Se basa en la creación de animales transgénicos portadores de un gen construido con un promotor específico del tejido a estudiar y que expresa una sustancia tóxica para la propia célula productora. Así, cuando el promotor es activado, las células productoras son destruidas. Únicamente son eliminados determinados tipos celulares, ya que a pesar de que el gen está presente en todas las células del organismo, sólo se expresa en aquéllas en las que es activado el promotor elegido. Por ejemplo, podrían eliminarse selectivamente las células β del páncreas si se introduce un gen tóxico gobernado por el promotor del gen de la insulina.

- **Identificación de nuevos genes y proteínas mediante mutagénesis:** Cuando un fragmento de ADN se inserta en un gen endógeno del huésped, puede provocar la eliminación de su expresión. De esta forma, el investigador puede aislar, clonar y caracterizar el gen que ha dejado de funcionar. Si la pérdida de determinado gen se asocia con una alteración fisiológica característica, puede identificarse el gen humano equivalente y estudiar su papel en la alteración humana correspondiente.

La posibilidad de construir modelos animales por eliminación o modificación de la expresión de genes endógenos o por introducción de genes humanos defectuosos, puede utilizarse para comprender los mecanismos patogénicos moleculares de enfermedades humanas. El número de modelos transgénicos de enfermedades está en constante crecimiento, y entre ellos pueden citarse varios modelos de diabetes, osteogénesis imperfecta, anemia perniciosa, hepatitis neonatal, etc. Por otra parte, los animales transgénicos constituyen un marco ideal para el diseño y evaluación de nuevas terapias, incluyendo la emergente terapia génica, tanto desde el punto de vista de su efectividad, como de su toxicidad o posibles efectos secundarios. Pueden servir también como productores a gran escala de moléculas de actividad terapéutica ya conocida que no puedan ser fabricados en organismos más sencillos como bacterias o levaduras.

Las posibilidades de la metodología de producción de animales transgénicos, así como las aplicaciones de estas estrategias en la Medicina son amplias, y están en continuo desarrollo. La hipotética aplicación de estas tecnologías en el ser humano no está exenta de controversia y discusiones éticas, que tendrán que ser debidamente regularizadas.

En estos ocho capítulos, hemos pretendido revisar, junto con el lector, distintos aspectos de la Biología y Genética Moleculares, destacando su papel en la práctica clínica diaria. Nuestra aproximación ha sido siempre muy general, con la idea de que el lector interesado pueda ampliar sus conocimientos en manuales más especializados.

Glosario

CCM: véase **Chemical cleavage method**

CFLP: véase **Cleavage fragment length polymorphism**

Cleavage fragment length polymorphism: Polimorfismo del tamaño de los fragmentos de corte: Método de detección de mutaciones en ADN. Se basa en diferencias de bandas obtenidas por digestión con la enzima *cleavase I*.

Chemical cleavage method: Método de corte químico, para la detección de mutaciones en ADN. El fundamento de esta técnica es el corte químico de regiones con bases no apareadas (*mismatch*).

ddF: véase **dideoxy-fingerprinting**

dideoxy-fingerprinting: Huella dideoxi. Técnica de detección de mutaciones, es un *híbrido* entre la secuenciación y el SSCP, pero mucho más sensible que este último.

EMC: véase **Enzymatic mismatch cleavage**

Enzymatic mismatch cleavage: Método de corte enzimático. Técnica de detección de mutaciones en ADN. El fundamento de esta técnica es el corte enzimático de regiones con bases no apareadas (*mismatch*).

mismatch: palabra inglesa que define zonas no complementarias (de una o varias bases de longitud) entre las dos hebras de una molécula de ADN, que pueden formar bucles monocatenarios.

OLA: véase **Oligonucleotide ligation assay**

Oligonucleotide ligation assay: Ensayo de ligado de oligonucleótidos. Técnica para detectar mutaciones puntuales ya conocidas. Se basa en la capacidad de la ADN-ligasa de unir dos oligonucleótidos adyacentes sólo si son totalmente complementarios al ADN molde.

Protein truncation test: Test de proteína truncada. Método para la detección de mutaciones nonsense, mediante el análisis de los productos proteicos del gen a estudio.

PTT: véase **Protein truncation test**

RNase cleavage: Corte con RNasa. Método de detección de mutaciones, utilizando la enzima RNasa para el corte de regiones no apareadas en un híbrido ADN:ARN.

Single nucleotide primer extension: Extensión de un nucleótido. Método para detectar mutaciones ya conocidas, basado en la extensión de un solo nucleótido con la enzima ADN polimerasa.

transgén: gen ajeno, generalmente de otra especie, que ha sido introducido en un animal, que se dice **transgénico**.

transgénico: animal portador de un gen ajeno o **transgén**.

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 Castaño L, Bilbao JR. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (7): Conceptos de genética en la enfermedades hereditarias. Genotecas. *An. Esp. Pediatr.* 1997; **47**:437-442.
- 8 Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assesment. *Clin. Chem.* 1997; **43**:1114-1128.
- 9 Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA, 2ª ed. Scientific American Books, New York, 1992.
- 10 Mockrin SC, Dzau VJ, Gross KW, Horan MJ. Transgenic animals: new approaches to hypertension research. *Hypertension.* 1991; **17**:394-399.
- 11 Hypermutable myotonic dystrophy CTG repeats in transgenic mice. *Nat Genet.* 1997; **15**:193-196.