

## GUÍAS DE NEUROGENÉTICA TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

CLAUDIA ARBERAS<sup>1</sup>, FLORENCIA AGUIRRE<sup>2</sup>, ANDRÉS BERARDO<sup>3</sup>, DOLORES GONZÁLEZ<sup>4</sup>,  
MARCELO KAUFFMAN<sup>5</sup>, RICARDO MAIOLA<sup>6</sup>, LUCIANA MELAMUD<sup>7</sup>, LAURA PIRRA<sup>8</sup>, GUSTAVO SEIFER<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Médica Genetista, Sección Genética médica Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; Ex becaria del Servicio de Genética de la Universidad Católica de Lovaina, Bruselas, Bélgica. <sup>2</sup>Médica, Residencia de Neurología Hospital J.M. Ramos Mejía, Buenos Aires. <sup>3</sup>Médico, Residencia de Neurología Hospital Francés, Buenos Aires. <sup>4</sup>Médica, Residencia de Neurología Hospital J.M. Ramos Mejía, Buenos Aires. <sup>5</sup>Médico, Magister en Biología Molecular Médica; Consultorio de Neurogenética, División Neurología, Hospital J.M. Ramos Mejía, Buenos Aires; Laboratorio de Neurogenética, Servicio de Neurología, Sanatorio V. Franchin. <sup>6</sup>Médico Neurólogo. Programa de Parkinson y Movimientos anormales, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. <sup>7</sup>Médica Neuróloga, Unidad de Stroke Neurología Hospital J.M. Ramos Mejía, Buenos Aires. <sup>8</sup>Médica Neuróloga, Instituto de Neurociencias-Fundación Favaloro, Área de Enfermedades Neuromusculares, Buenos Aires. <sup>9</sup>Médico Neurólogo, Sección Epilepsia, Htal. Ramos Mejía, Buenos Aires.  
Grupo de Neurogenética de la Sociedad Neurológica Argentina\*  
Buenos Aires, Año 2008

**Resumen** En las últimas décadas, el desarrollo de disciplinas científicas vinculadas al estudio de la biología molecular ha puesto al alcance de la ciencia médica elementos diagnósticos e incluso de tratamientos impensados hace un tiempo atrás. A pesar de ello, la vasta información disponible y el avance de los conocimientos en relación a la genética humana en la práctica neurológica existen pocas herramientas para realizar una correcta aproximación diagnóstica en esta área. El objetivo de la presente guía es acercar al neurólogo conceptos útiles vinculados a la neurogenética, describiendo las técnicas de diagnóstico molecular disponibles y la utilidad práctica de cada una de ellas. No de menor importancia, se describirán nociones relacionadas a la ética médica teniendo en cuenta que la genética permite predecir, en ciertos casos, la aparición de patologías. Por ende, el consejo genético se torna un elemento fundamental de conocimiento en esta área.

**Palabras clave:** bioethical aspects, citogenetical technics, DNA based technics, genetic resources on line.

**Summary** *Título traducción* ..... In the last decades, the development of scientific disciplines related to the study of molecular biology, has printed the medical science with diagnostic elements and even treatments unknown time ago. Despite the huge information available and the development of knowledge about human genetics in the neurologic practice, few tools exist to make a correct diagnostic approach on this area. The objective of this guide is to draw near the neurologist effective concepts aligned with neurogenetic, describing molecular diagnostic technics and the practical profit of each of them. Not least important, we will describe notions associated with ethical medicine, taking into account that genetics allows to predict -in some circumstances- the apparition of some pathologies, turning genetic counselling into an essential element of medical knowledge.

**Key words:** bioethical aspects, citogenetical technics, DNA based technics, genetic resources on line.

### Introducción

La genética es una especialidad médica que se ocupa de estudiar las patologías de causas cromosómicas, monogénicas y multifactoriales, brindando el

consejo genético pertinente. Si bien estas patologías suelen ser individualmente poco frecuentes, en conjunto ocupan un lugar relevante entre las causas de morbi-mortalidad, tanto en la infancia, como en la vida adulta.

Durante los últimos años avances en técnicas de laboratorio especializadas lograron una mayor comprensión de su etiopatogenia, reconociendo los genes responsables de buena parte de ellas y establecido, en muchos casos, una correlación entre el genotipo y fenotipo del paciente.

Recibido: x/x/x

Aceptado: x/x/x

**Dirección del autor y en caso de reimpressiones:** Dr. Andres Berardo  
aiberardo@yahoo.com.ar

No se recibió apoyo económico para la realización del presente trabajo.

Es sin duda la Neurología una de las ramas de la medicina que más se ha visto beneficiada por estos conocimientos, aunque, lamentablemente, aún tenemos pocos avances en áreas terapéuticas.

El diagnóstico de la *Patología Genética* depende de la evaluación en forma sistemática de:

1. Antecedentes personales.
2. Antecedentes genealógicos (mínimo tres generaciones).
3. Examen médico minucioso.

A partir de estos datos se establece un *diagnóstico semiológico* y se determinan cuales son las mejores técnicas que permitirán confirmarlo, arribando así a un *diagnóstico etiológico*.

Una vez concluida la fase de diagnóstico esta información debe transmitirse al paciente y su familia, lo que constituye el "consejo genético"

Es necesario recalcar que:

- Proveer un diagnóstico genético definitivo muchas veces requiere tiempo.
- En ocasiones es necesario realizar numerosos estudios, y pruebas de laboratorio.
- Es importante que los laboratorios donde se realicen dichos estudios cuenten con respaldo científico, y experiencia suficiente, a fin de evitar errores diagnósticos. El ideal es que los mismos posean controles de calidad que acrediten sus prácticas.

La utilización de tests genéticos implica conocer principios básicos de genética y biología molecular que permitan una adecuada apreciación de sus limitaciones y una correcta interpretación de sus resultados.

## Técnicas de diagnóstico en neurogenética

Las técnicas de diagnóstico genético pueden dividirse en *tests citogenéticos* o *basados en el análisis de ADN*.

### Estudios citogenéticos

Son aquellos que permiten evaluar el número y forma de los cromosomas, y proteínas que se encuentran en el interior de los núcleos de células eucarióticas. Estas estructuras son observables mediante el microscopio óptico en células que se encuentran en proceso de división celular (durante la metafase de la mitosis).

El número normal de cromosomas en el hombre es de 46, reconociéndose 44 autosomas y 2 cromosomas sexuales (XX o XY). El cariotipo femenino normal será entonces 46XX y 46XY en caso de los varones.

Los autosomas se agrupan en pares del 1 al 22, siendo cada uno de los componentes del par de origen materno y paterno respectivamente. También se los denominan cromosomas homólogos.

Cada cromosoma cuenta con una estructura llamada centrómero, que separa el brazo corto o "p" (de petite) del brazo largo o "q".

En función de la ubicación del centrómero y de la simetría o no de los brazos p y q a los cromosomas se los denominan Metacéntricos (centrómero en el medio), acrocéntricos (centrómero en el extremo) y submetacéntrico cuando el centrómero se ubica en una posición intermedia entre los dos anteriores.

Las anomalías de los cromosomas son responsables de una gran cantidad de patologías, representan el 25-50% de los abortos espontáneos en el 2do y 1er trimestre respectivamente.

### A) Técnicas de estudio citogenético

Usualmente estas técnicas utilizan tejido vivo (sangre: linfocitos, médula ósea, células del corion veloso embrionario) que se cultivan durante 48-72 horas. La división celular se interrumpe mediante el agregado de colchicina, y luego de provocar la ruptura de la membrana nuclear mediante el agregado de una solución hipotónica se procede a la realización de extendidos en un portaobjetos que puede ser entonces observable y analizable mediante el microscopio óptico, con un aumento 1000 X.

Previo a la observación se debe procesar con tripsina (enzima que promueve la aparición de bandas), y luego se colorea con Giemsa, a esto se debe el nombre de bandeo G<sup>1</sup>.

Los cromosomas acrocéntricos presentan en el extremo proximal unas prolongaciones llamadas *satélites*, cuyo tamaño suele variar, de un modo polimórfico, sin valor patológico.

Lo mismo ocurre con regiones adyacentes al centrómero en los cromosomas 1, 9, 16 y en el cromosoma Y, en la región terminal del brazo largo. Éstas son denominadas regiones heterocromáticas y están formadas por material altamente repetitivo, no codificable, por lo que sus variaciones en tamaño no evidencian patología, sino modificaciones polimórficas, las que usualmente se heredan de padres a hijos.

Puede completarse la evaluación mediante otros tipos de bandeo como el *bandeo R* (Reverso), el *bandeo C* (marca selectivamente los centrómeros y las regiones heterocromáticas) y el *NOR* (Nucleolar Organizing Region)<sup>1, 2</sup>.

### Cariotipo de alta resolución

A los métodos tradicionales hoy se agregan nuevas técnicas que permiten evaluar cromosomas más largos, cuando se interrumpe la división mitótica en etapas más tempranas (prometafase), lo que obtiene mayor número de bandas (800 bandas).

**Utilidad:** La misma permite detectar defectos cromosómicos más pequeños, no observables con las técnicas convencionales, que ponen de manifiesto solo un total de 400 bandas, alcanzando mayor nivel de resolución. Esto contribuyó al reconocimiento de numerosos síndromes no identificables con anterioridad por ejemplo el Síndrome de Prader Willi, de DiGeorge, de Williams.

## FISH

La incorporación de principios de la biología molecular ha permitido optimizar la evaluación del material cromosómico con mayor detalle y precisión. Se puede por ejemplo, colorear con sustancias fluorescentes conocidas, partes de los cromosomas, de acuerdo al diagnóstico que se busca determinar<sup>3</sup>.

Se utilizan sondas o porciones de ADN fluorescentes que se hibridizan con el material genético del paciente a estudiar, por el principio de complementariedad propio del material genético. De este modo podemos establecer deleciones o duplicaciones en el material de estudio del paciente.

**Utilidad:** Esta técnica permite el estudio de regiones fluorescentes positivas o negativas en núcleos en interfase. Esta técnica permite detectar defectos que se hallan en mosaico (es decir que coexisten células normales con otras que portan el defecto a reconocer) y de esta manera pueda analizar una gran cantidad de núcleos. (Ej. Síndrome de Charcot Marie Tooth tipo I A, donde muestra usualmente una doble señal.)

## Cariotipo Espectral o FISH múltiple / SKY

Esta técnica permite colorear de un modo diferente cada par cromosómico, y de ese modo identificar translocaciones entre distintos cromosomas, o inclusive ver trisomías o monosomías en escaso material de estudio. (Ej.; Diagnóstico preimplantatorio de anomalías cromosómicas frecuentes)<sup>4</sup>.

## b) Técnicas de estudios basadas en el ADN

### Electroforesis en gel

La electroforesis permite separar moléculas de acuerdo a su carga eléctrica y tamaño. El principio se basa en que las moléculas cargadas migran en un campo eléctrico hacia el polo opuesto a velocidades distintas según su tamaño<sup>5</sup>.

Esto se puede aplicar tanto al ADN como a proteínas<sup>6</sup>. En el caso de ADN la técnica es la siguiente:

- 1) Preparación del gel (generalmente de agarosa) y formación de cavidades para la siembra (calles).
- 2) Sembrado de la/s muestra/s (cada una contiene fragmentos de ADN de distintos tamaños) en las calles.

En caso de que los fragmentos de ADN a estudiar tengan tamaño desconocido, se siembra también un marcador (muestra con fragmentos de peso molecular conocido).

- 3) Conexión a una fuente de voltaje para generar un campo eléctrico.
- 4) Avance de la corrida hacia el cátodo ya que el ADN está cargado negativamente.
- 5) Visualización de la corrida con la tinción del gel con bromuro de etidio y colocación bajo luz UV. Comparación de tamaño con el marcador.

**Utilidad:** El uso de la electroforesis es muy amplio y su introducción fue crucial para la expansión de conocimientos en genética. La mayoría de los test diagnósticos de enfermedades genéticas, así como las publicaciones de biología molecular, utilizan procesos que involucran algún tipo de electroforesis, como por ejemplo en la separación de los fragmentos resultantes de PCR<sup>5,7</sup>.

### PAGE (electroforesis con gel de poliacridamida)

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio electroforético. La resolución de bandas y la sensibilidad de los medios de visualización son superiores a la técnica convencional en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El método de visualización más frecuente es el marcado radioactivo y posterior exposición a un film autoradiográfico o sistema de imágenes. Otros métodos son la tinción con plata o el marcado de los fragmentos de ADN con fluorocromos<sup>5</sup>.

### Southern Blot

El Southern Blot es una técnica que combina separación por enzimas de restricción (RFLP) con hibridación con sondas. El ADN clivado por RFLP es desnaturalizado, separado por tamaño y transferido a una membrana de nitrocelulosa o nylon. La transferencia a la membrana se realiza por capilaridad proceso que es conocido como blotting. Luego se hibridizan con sondas (complementarias) marcadas con radioisótopos o fluoresceína, para su visualización<sup>5</sup>.

La hibridación de los fragmentos generados por enzimas de restricción disminuye el número de bandas producidas, favoreciendo su interpretación<sup>8</sup>.

**Utilidad:** Se utiliza para detectar secuencias repetitivas largas, grandes deleciones, inserciones o rearrreglamiento, como por ejemplo en el síndrome de frágil X, en el que los genes de 200-1000 repeticiones no pueden ser expandidos por PCR y requieren del Southern Blot para su diagnóstico molecular<sup>5</sup>.

El Northern blot es una técnica análoga al Southern pero en la que se estudia RNA en lugar de DNA.

## Western Blot

El Western Blot (WB) se utiliza para la detección de proteínas a partir de extractos celulares. La técnica consiste en separar las proteínas por tamaño mediante SDS-PAGE, luego se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y se incuban con un anticuerpo primario (anticuerpo específico dirigido a la proteína a estudiar) de manera que se forma un complejo anticuerpo-proteína.

Posteriormente se incuban con un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se encuentra ligado a una enzima que catalizará la reacción que permitirá visualizar la banda en la que se encuentra la proteína en estudio.

*Utilidad:* El WB puede ser usado para determinación de los niveles relativos de expresión de diferentes formas de una proteína, identificación de modificaciones postranscripcionales o cambios en la expresión de una proteína bajo diferentes condiciones<sup>9</sup>.

## Reacción en cadena la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite copiar varias miles de veces, en relativamente corto tiempo, porciones específicas de ADN<sup>10</sup>.<sup>11</sup>. Es uno de los procedimientos standard sobre el que se basan la mayoría de los test de ADN.

El ADN que va a ser copiado (*templado*) se coloca en un tubo con los 4 desoxinucleótidos (dCTP, dATP, dGTP y dTTP) que se incorporarán al nuevo ADN. Se agrega una *ADN Polimerasa* termorresistente Taq<sup>12, 13</sup> (enzima *Thermus aquaticus* que sintetiza ADN) y dos pequeños oligonucleótidos (18-25 bases) que sirven como cebadores o *primers*, complementarios a cada una de las cadenas que crecen en sentidos opuestos (delantero y trasero). Esta mezcla es colocada en una máquina de PCR (termociclador). El método se basa en tres reacciones sucesivas que se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces<sup>14</sup>:

- *Desnaturalización:* El ADN obtenido de la muestra (sangre, células de la piel, pelo, músculo, etc.) es calentado aproximadamente a 90°-96° hasta lograr la separación de sus dos cadenas.
- *Apareamiento:* La temperatura se reduce permitiendo la unión de los *primers* a cada una de las cadenas de ADN. Éstos permitirán el acople de la ADN polimerasa a la cadena justo en el segmento que se desea copiar.
- *Extensión:* La *ADN polimerasa* inicia la síntesis de la cadena complementaria a partir de los primers.

El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los *primers*.

Finalmente el producto de PCR puede ser corrido en un gel de agarosa para su visualización y así, una pe-

queña delección resultará en un producto el cual es más pequeño que el correspondiente al alelo normal. Una pequeña inserción o expansión de triplete repetido generará un producto más grande que el del alelo normal. El producto de PCR también puede ser procesado para secuenciación, para análisis de fragmentos o para experimentos de clonación.

*Utilidad:* La versatilidad del método ha vuelto a esta técnica una herramienta indispensable en la investigación médica sobre todo en el área dedicada a la detección de organismos infectantes (Herpes Virus, HIV)<sup>15</sup> de difícil cultivo y en el estudio de la variabilidad y mutación de genes. Asimismo se ha constituido en una técnica basal sobre la que se apoyan otras de mayor complejidad. (Ej. PCR-SSCP, MLPA).

## PCR Multiplex

La PCR puede ser modificada para amplificar varias secuencias de ADN simultáneamente en una sola reacción. Esta técnica modificada es conocida como PCR múltiplex. Se utilizan varios pares de primers simultáneamente, cada uno específico para cada fragmento de ADN que se desea amplificar. Los primers son diseñados para asegurar que los productos amplificados sean de diferente tamaño de manera tal que puedan ser separados claramente por electroforesis en gel o capilar.

*Utilidad:* Esta técnica tiene múltiples aplicaciones pero es especialmente útil para identificar delecciones en la Distrofia muscular de Duchenne/Becker<sup>16, 17</sup>.

## Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)

La reacción Multiple Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) permite estudiar hasta 45 secuencias de ADN simultáneamente en una sola reacción de PCR, cuantificando cambios en el número copias<sup>18, 19</sup>.

Este método puede ser utilizado actualmente para el diagnóstico de múltiples patologías como Distrofia Muscular de Duchenne /Becker (DMD/B)<sup>20</sup>, Atrofia muscular espinal<sup>21</sup>, Neurofibromatosis tipo 1, algunos tipos de Distrofia muscular de cintura, epilepsia mioclónica, enfermedad de Fabry<sup>22</sup> y muchas patologías mas como cáncer de mama y colon.

*Utilidad:* En la DMD/B es especialmente útil dado que permite la detección de delecciones y duplicaciones de todos los exones del gen de la Distrofina<sup>23</sup>, a diferencia de la PCR multiplex que investiga sólo 18<sup>16, 17</sup> de los 79 exones<sup>24</sup>. Además al ser un método que permite cuantificar, posibilita el estudio de mujeres haciendo posible la detección portadoras de la patología sin necesidad de estudiar a otros familiares afectados en la familia<sup>25</sup>.

## Técnicas de secuenciación de ADN

El método de secuenciación más utilizado es el desarrollado por Sanger<sup>26, 27</sup> que deriva del uso de *dideoxynucleótidos (ddNPT)*. Estos compuestos tienen la particularidad de carecer de un grupo hidroxilo (OH-) en su carbono 3' lo que produce la interrupción de la síntesis de la cadena complementaria en crecimiento, una vez incorporado. Esto se explica ya que estos compuestos al no contar con su grupo OH-, impiden la formación de grupos fosfodiéster con nuevas bases<sup>28</sup>.

Se utilizan cuatro dideoxynucleótidos, uno por cada nucleótido conocido (C, G, T, A). Se preparan cuatro tubos que contienen DNA monocatenario a secuenciar, ADN polimerasa que incorporará nucleótidos a la cadena, primers marcados radioactivamente, nucleótidos ordinarios y un sólo tipo de dideoxynucleótido por tubo.

En cada uno de los cuatro tubos la reacción será *parcial*, con la terminación aleatoria de acuerdo a si el nucleótido incorporado corresponde a uno ordinario o al dideoxynucleótido.

Como resultado cada una de las reacciones de bases específicas se generará *una colección de fragmentos de ADN marcados de diferente tamaño, con un terminal C'5 común (definido por el primer secuenciante), y un terminal C'3 variable (por la inserción de ddNPT variable)*.

Posterior a esto se realiza una corrida electroforética para cada uno de los tubos<sup>29</sup>. Cada una de las calles producirá bandas marcadas que diferirán entre sí, en una sola base. La secuencia puede ser leída desde la base hasta el tope del gel, una dirección que da la secuencia de 5' a 3' de la cadena complementaria de ADN templado.

*Utilidad:* Esta técnica es utilizada para la detección de deleciones, inserciones, mutaciones puntuales o reordenamientos de alguna porción de ADN (ej. patología mitocondrial)<sup>30, 31</sup>.

## Técnicas de Tamizaje Mutacional

Existen técnicas que permiten discriminar con alto grado de sensibilidad entre muestras que carecen de mutaciones y otras que sí las tienen. Estas técnicas moleculares son conocidas como de *screening o tamizaje mutacional*. Debe considerarse que siempre deben ser seguidas por una técnica de secuenciación u otra metodología que permita confirmar y/o identificar la mutación subyacente. Las más frecuentemente utilizadas hacen uso de la investigación del patrón de motilidad electroforética de las cadenas de ADN. Su fundamento reside en que los cambios en la secuencia (mutaciones puntuales, inserciones o deleciones) alteran la motilidad de la cadena de ADN<sup>32</sup>.

La metodología más frecuentemente utilizada, tanto en el diagnóstico como en la investigación, es la denominada *PCR-SSCP (Siglas en Inglés de Polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism)*. PCR-

SSCP es un proceso donde los productos de PCR son desnaturalizados en cadena simples de ADN, luego renaturalizados para favorecer los apareamientos intracatenarios y finalmente analizados en un gel de poliacrilamida. Con esto, la estructura de cada hebra de ADN de un producto de la PCR adoptará una conformación dada, dependiente de la secuencia nucleotídica, que afectará su migración en el gel. Así dos productos de PCR con diferencias puntuales en su secuencias presentarán distintos patrones electroforéticos de los fragmentos de ADN monocatenarios. La sensibilidad de esta técnica es cercana al 100% cuando se realiza en condiciones técnicas debidamente optimizadas<sup>33, 34</sup>.

Otras técnicas que se basan en principios similares a los de SSCP, pero que contienen variaciones metodológicas son: PCR-DHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*), PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y PCR-TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*)<sup>35</sup>.

*Utilidad:* Estas técnicas permiten discriminar con alto grado de sensibilidad entre muestras que carecen de mutaciones y otras que sí las tienen. Se las utiliza en distintas enfermedades neurológicas monogénicas como el parkinsonismo secundario a mutaciones en el gen de la parkina.

## Microarrays

La palabra *Microarray* deriva del griego *mikro* (pequeño) y del inglés *array* (distribución ordenada). El término *Microarray* define a una herramienta de estudio de la biología molecular, que combina las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia, consistente en un soporte sólido en el que están representados miles de secuencias nucleotídicas con utilidad para el estudio de la expresión génica, la variabilidad genética y las alteraciones genéticas estructurales<sup>36</sup>.

Es así como hay distintos tipos de *microarrays*, de cDNA y oligonucleótidos para el estudio de la expresión génica, de polimorfismos de nucleótidos únicos o SNPs para el estudio de la variabilidad genética<sup>37</sup> y los denominados de hibridación genómica comparativa (CGH, por su nombre en inglés) para el estudio de las alteraciones genómicas estructurales<sup>38</sup>. El aspecto distintivo de esta tecnología está dado por su capacidad de investigar en simultáneo la expresión, la secuencia o la estructura de un genoma completo.

*Utilidad:* Su mayor uso ha estado dado en la investigación de la expresión génica de un tejido en una condición y un tiempo determinado<sup>39</sup>. El vasto caudal de información que la experimentación con esta tecnología produce obliga a la convergencia de varias disciplinas paralelas como la bioinformática y la estadística genética<sup>40</sup>. Esta tecnología ha sido utilizada mayoritariamente en la investigación de las enfermedades neurológicas, aunque

recientes desarrollos posibilitan su uso como herramienta diagnóstica<sup>41</sup>. Su utilización permite la identificación de trastornos genéticos presentes en pacientes con retraso mental de etiología previamente no identificada.

#### Análisis de Ligamiento (*linkage analysis*)

El análisis de ligamiento es una metodología que combina a la biología molecular con la estadística para investigar y determinar la localización cromosómica de los genes alterados en una enfermedad hereditaria. Su fundamento está basado en la observación biológica del ligamiento durante la meiosis (la no recombinación o transmisión alélica conjunta) de aquellos genes que residen físicamente cercanos en los cromosomas<sup>42</sup>. Haciendo uso de marcadores genéticos polimórficos (con alta variabilidad alélica en la población) y de localización cromosómica conocida en familias con varios sujetos afectados y en diferentes generaciones (denominadas informativas) es posible estadísticamente inferir en que región cromosómica puede encontrarse el gen de interés mediante la comparación de cada uno de los alelos en cada uno de los miembros de la familia investigados (afectados y no).

El *LOD SCORE* es la medida utilizada para determinar si un ligamiento es real o producto del azar. Un *LOD SCORE* de 3 es aceptado como evidencia de ligamiento e implica que es 1000 veces más probable la existencia de ligamiento que lo contrario<sup>43</sup>.

*Utilidad:* El análisis de ligamiento fue de gran utilidad para la identificación de los genes afectados en múltiples patologías neurológicas hereditarias (Enfermedad de Huntington, ataxias espino-cerebelosas y neuropatías hereditarias), para el diagnóstico genético indirecto (determinación del riesgo de padecer una patología hereditaria presente en una familia) y en la selección de genes candidatos en patologías complejas<sup>42, 44</sup>.

### Aspectos bioéticos en genética

Los mismos principios éticos que guían la práctica médica deben aplicarse en el contexto de los servicios de Genética Médica. El ideal alcanzable por los servicios de Genética es el respeto por la autonomía del paciente sólo obtenible en la medida que los informes del profesional sean lo menos directivos posibles.

El consejo genético es crucial, siendo importante recordar que la comunicación de la información genética debe hacerse al mismo tiempo que se transfiere la responsabilidad sobre cómo esta información será usada<sup>45, 46</sup>.

En 1997 la asamblea general de la ONU promulgó la Declaración Universal sobre Genoma Humano y los Derechos Humanos. Éste constituye un instrumento internacional, con principios universales. (Véase Anexo)

En todos estos documentos existe acuerdo sobre los siguientes tópicos:

- Respeto por el derecho a saber o no saber.
- Confidencialidad.
- Privacidad.
- Oportunidad.
- Reconocimiento de los individuos “capaces” de ser testeados.

#### *Medicina predictiva*

Es una parte de la genética médica que se ocupa del diagnóstico presintomático de patologías monogénicas (ej.: Corea de Huntington) y de patologías de origen multifactorial o poligénico (ej.: predisposición a ciertos tumores malignos, enfermedades psiquiátricas, afecciones autoinmunes, etc.).

*Test predictivos:* se utilizan en individuos en apariencia sanos. Se establece su potencial de riesgo. Es imperativo el cuidado extremo en el procesamiento de las muestras y en la interpretación de los resultados. Requiere uso de normas y procedimientos no siempre en práctica en la medicina tradicional.

Todo estudio debe realizarse con el *consentimiento expreso del paciente*, luego de procurarle información de alta calidad. Ésta debe ser provista por personal entrenado en técnicas de comunicación y con conocimientos científicos actualizados, además de ser transmitida en circunstancias adecuadas (“teachable moment”) y en relación al nivel de comprensión del interlocutor<sup>47, 48</sup>.

#### *Consentimiento informado*

“Es un acuerdo por el cual el sujeto de investigación o estudio, autoriza su participación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios, y riesgos a los que será sometido, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna, reservándose el derecho de revocar lo autorizado, cuando así lo juzgue, sin necesidad de expresar la causa de tal revocación, y sin por ello sufrir ningún cambio de tratamiento o atención<sup>49</sup>.”

Se deben tener como premisas del Consentimiento Informado: Información, Competencia y Voluntad.

1. *Información:* esta debe ser completa, entendible, sin equivocaciones ni omisiones.
2. *Competencia:* es fundamental que tengamos presente el grado de competencia de la persona a estudiar. No se deben realizar estudios presintomáticos en menores de 18 años de edad ya que se priva a la persona del derecho a libre elección.

Sólo se podrán hacer en menores de edad cuando existan tratamientos que permitan modificar el curso de

la enfermedad. En ningún caso los padres son subrogantes de este derecho.

3. *Voluntad*: Toda persona debe hacer uso del derecho a saber o no saber

El conocimiento en estos principios nos permite un ejercicio profesional en concordancia con aquellos principios hipocráticos tendientes al buen obrar, evitando generar con nuestra acción médica un daño<sup>50</sup>.

## Recursos on line en el diagnóstico genético

Existen numerosas bases online con información genética. Algunas sólo almacenan información de secuencias de ADN, otras, guardan información acerca de las mutaciones presentes en estas secuencias de ADN, la frecuencia con la que ocurren en distintas poblaciones, localización de estas secuencias de ADN en cromosomas, así como también la información sobre marcadores cercanos que pueden ser de utilidad para el diagnóstico. Citas bibliográficas acerca de estas secuencias o de las enfermedades derivadas de mutaciones también están compiladas en bases de datos.

Algunas bases de datos están relacionadas, de manera que es fácil moverse de una a otra siguiendo links, obteniendo siempre información sobre el gen, la enfermedad o la región del cromosoma que nos interesa. En muchos casos, varias bases de datos están alojadas en un mismo sitio, por ejemplo NCBI.

Alternativamente, uno puede realizar búsquedas en cada una de las bases de datos por separado. Para esto, es necesario conocer qué tipo de información tiene cada base de datos y qué tipo de 'palabras' uno puede usar en las búsquedas. Algunas bases de datos sólo aceptan códigos de referencia o "accession numbers" (Por ejemplo el accession number NM\_000492 es el código de acceso para el gen responsable de la fibrosis quística en Entrez). Otras bases de datos permiten utilizar palabras como 'huntington' o nombres de alelos.

*Links de bases de datos de genes, proteínas y ciencias básicas*

### OMIM (On line Mendelian Inheritance in Man)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)

La más grande base datos clínica y básica en Internet relacionada con la genética. Se trata del catálogo "Mendelian inheritance in man" de Mc Kusick actualizado en forma permanente por el John Hopkins Hospital y The National Center for Biotechnology Information)

### GeneTests

(<http://www.genetests.org>)

Aquí se encontrará revisiones hechas por expertos calificados, como así una gran base de datos sobre genética, técnicas de laboratorio y diagnóstico prenatal. Presenta un completo glosario ilustrado.

### The Biology Project: Molecular Biology

([http://www.biology.arizona.edu/molecular\\_bio/molecular\\_bio.html](http://www.biology.arizona.edu/molecular_bio/molecular_bio.html))

La Universidad de Arizona presenta un tutorial interactivo sobre Biología Molecular.

### National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Un amplio archivo de software y bases de datos relacionadas con la Biología Molecular.

### Japanese GenomeNet

(<http://www.genome.ad.jp/>)

Este sitio contiene además un extenso directorio de sitios sobre proyectos de genoma.

### ExpASy Molecular Biology Server

(<http://www.expasy.org/>)

El servidor ExpASy (Expert Protein Analysis System) del Swiss Institute of Bioinformatics es uno de los más conocidos a nivel mundial. Es una Base de Datos de Proteínas, con descripción de la secuencia y función.

(<http://www.uic.edu/classes/bms/bms655/>)

Interesante curso teórico brindado por la Universidad de Illinois.

(<http://www.ornl.gov/hgmis/>)

Página oficial del Proyecto Genoma Humano donde se presentan los últimos avances y herramientas didácticas para entender el proyecto)

(<http://www.gdb.org/>)

Base de Datos en genética.

(<http://www.kumc.edu/gec/>)

Genetic Education Center - La Universidad de Kansas ofrece este directorio de sitios relacionados con la Genética Humana y el Proyecto Genoma Humano.

(<http://anthro.palomar.edu/mendel/default.htm>)

Principios básicos de Genética Mendeliana

(<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/animations.html>)

Animaciones sobre técnicas de laboratorio.

(<http://www.genome.gov/>)

Instituto de investigación del Genoma Humano.

(<http://www.genome.gov/Pages/Hyperion/educationkit/index.html>)

Animaciones y tutoriales sobre el genoma Humano.

(<http://psyche.uthct.edu/shaun/SBlack/geneticd.html>)

Código genético.

(<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/>)

Galería de gráficas en biología y genética básica.

(<http://www.genome.gov/glossary.cfm>)

Glosario de términos genéticos.

## Conclusiones finales

El objetivo del presente trabajo fue acercar información complementaria que permita guiar al médico especialista al momento de enfrentarse al desafío de diagnosticar y tratar una patología vinculada a la genética. Por tal motivo, creímos importante describir brevemente las técnicas moleculares frecuentemente utilizadas en el diagnóstico genético a fin de ahondar el conocimiento del médico solicitante y de esa manera interpretar mejor los

resultados. Seguidamente resumimos conceptos básicos de la ética aplicada a este campo ya que es de capital importancia entender las repercusiones que conllevan realizar un diagnóstico genético para el paciente y su familia. Concluimos el trabajo con información complementaria acerca de las bases de datos y sitios en Internet existentes que pueden ser de utilidad en la búsqueda de determinada patología genética.

El descubrimiento de los genes implicados en ciertas patologías neurológicas, el avance a partir de ello permitiendo interpretar el comportamiento de las mismas y el vislumbramiento de incipientes tratamientos diseñados por la biología molecular hace a la genética una rama biológica que tiñe las distintas disciplinas médicas y las enriquece. Es por ello la necesidad y el deber del médico neurólogo actual considerar a ésta como un elemento fundamental en su constante formación. Esperamos con este trabajo, haber contribuido a ello.

## Referencias bibliográficas

### Citogenética

1. Therman E. Human Chromosomes: Structure, behavior, effects. Springer-Verlag 1993, New York.
2. Hassold T, Hunt PA, Sherman S. Trisomy in human incidence, origin and etiology. *Curr Opin Genet Dev.* 1993; 398-403.
3. Heng HHQ, Spyropoulos B, Moens PB, FISH technology in chromosome and genome research. *BioEssays* 1997; 19: 75-84.
4. Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Weinberg J, Ferguson-Smith Ma, Ning Y, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-497.

### Electroforesis, PAGE, Southern Blot, Western Blot

5. Gödde R, Akkad D, Arning L, Dekomien G, Herchenbach J, Kunstmann E, et al. Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics -state-of-the-art, alternatives and future prospects. *Electrophoresis* 2006; 27 (5-6): 939-946.
6. Isaac H, Veenstra T. The role of electrophoresis in disease biomarker discovery. *Electrophoresis* 2007; 28: 1980-1988.
7. Brody JR, Kern SE. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Anal Biochem.* 2004; 333 (1): 1-13.
8. Trindade PA. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7 (1): 32-43.
9. Duerr JS. Immunohistochemistry WormBook, ed.2006 The C.elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.105.1, <http://www.wormbook.org>

### Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

10. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51 (1): 263-273.
11. Templeton NS. The polymerase chain reaction-History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol.* 1992; 1 (1): 58-72.

12. Watson JD, Gilman M, Witkowski J y Zoller M. Recombinant DNA, 2da Edición, 1992. Scientific American Books Freeman New York.
13. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239 (4839): 487-491.
14. Handyside A, Kontogianni E, Hardy Y y Winston RML. "Pregnancies from biopsed human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification", *Nature* 1990, vol. 344: 768-770.
15. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reactions to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 475-488.

### PCR múltiplex

16. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* 1988; 16 (23): 11141-11156.
17. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Human Genetics* 1990; 86: 45-48.

### Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)

18. Schouten J, Cathal J, Elgunn M, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 2002; 30: 12-57.
19. Sellnern L N, Taylor G R. MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. *Human Mutation* 2004; 23: 413-419.
20. Kesari A, Pirra LN, Bremadesam L, McIntyre O, Gordon E, Dubrovsky AL, Viswanathan V, Hoffman EP. Integrated DNA, cDNA, and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule. *Human Mutation* 2008; 29 (5): 728-737.
21. Arkblad EL, Dari N, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, Holmberg E, et al. Multiple ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscular Disorders* 2006; 16 (12): 830-838.
22. Schirinzi A, Centra M, Prattichizzo C, Gigante M, De Fabritiis M, Giancaspro V, et al. Identification of GLA gene deletions in Fabry patients by Multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Molecular genetics and metabolism* 2008; May 8.
23. Lalic T, Vossen RH, Coffa J, Schouten JP, Guc-Scekic M, Radivojevic D, Djuricic M, Breuning MH, White SJ, den Dunnen JT. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur. J Hum Genet* 2005; 13 (11): 1231-1234.
24. Lai K, Lo I, Tong T, Cheng L, Lam S. Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Clinical Biochemistry* 2006; 39: 367-372.
25. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari A R, De Angelis C P, Guanciali-Franchi A, Calabrese G, et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Human Genetics* 2005; 117: 92-98.

### Secuenciación

26. Sanger F, Coulson AR. "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase" *J Mol Biol.* 1975 Mayo 25; 94 (3): 441-448.
27. Sanger F, Nicklen S, y Coulson AR, DNA sequencing

- with chain-terminating inhibitors, Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Diciembre; 74 (12): 5463-5467.
28. Maxam AM, Gilbert W: A new method for sequencing DNA, Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Feb; 74 (2): 560-570.
  29. Smith, Lloyd M., Luckey JA, Drossman H, Kostichka AJ, Mead DA, D'Cunha J, Norris TB (1990-08-11). "High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis.". Nucleic Acids Research 18: 4417-4421.
  30. Venter, J. C., et al "The sequence of the human genome.". Science 2001, 291 (5507): 1304-1351.
  31. Neil Hall "Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology". The Journal of Experimental Biology 2007, 209: 1518-1525.

#### *Técnicas de Tamizaje mutacional*

32. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 2766-2770.
33. Jaeckel, S., Epplen, J. T., Kauth, M., Mitterski, B. *et al.*, Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism or how to detect reliably and efficiently each sequence variation in many samples and many genes. Electrophoresis 1998; 19: 3055-3061.
34. Hayashi, K., Yandell, D. W., How sensitive is OCR-SSCP?. Hum. Mutat. 1993; 2: 338-346.
35. Gödde R, Akkad D et al. Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics – state of the art, alternatives and future prospects. Electrophoresis 2006; 27: 939-946.

#### *Microarrays*

36. Allison, D.B., et al., Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. Nat Rev Genet 2006; 7: 55-65.
37. Haffler DA, Compston A, Sawcer S et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. N Eng J Med 2007; 357: 851-862.
38. Engels H, Brockschmidst A, Hoischen A et al. DNA microarray analysis identifies candidate regions and

genes in unexplained mental retardation. Neurology 2007; 68: 743-750.

39. Dahl, E., et al., Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer. Clin Cancer Res, 2006; 12: 3950-3960.
40. Michelson, S., The impact of systems biology and biosimulation on drug discovery and development. Mol Biosyst, 2006; 2: 288-291.
41. Bridgewater J, van Laar R, Floore A et al. Gene expression profiling may improve diagnosis in patients with carcinoma of unknown primary. Br J Cancer 2008; 98: 1425-1430.

#### *Linkage analysis*

42. Pulst S. Genetic Linkage Analysis. Arch Neurol, 1999; 56: 667-672.
43. Morton NE. Sequential tests for the detection of linkage. Am J Hum Genet. 1955; 7: 277-318.
44. Baser ME, Mautner VF, Ragge et al. Presymptomatic diagnosis of neurofibromatosis 2 using linked genetic markers, neuroimaging and ocular examinations. Neurology 1996, 47: 1269-1277.

#### *Aspectos bioéticos en genética*

45. Clayton EW. Ethical, legal, and social implications of genomic medicine. N Engl J Med (2003) 349: 562-569.
46. O'Brien J, Chantler C (2003). Confidentiality and the duties of care. J Med Ethics (2003); 29: 36-40.
47. Carlson R, Boyd K, Webb D. The revision of the Declaration of Helsinki: past, present and future. Br J Clin Pharmacol. (2004) 57: 695-713.
48. Harper PS. Research samples from families with genetic diseases: a propose code of conduct. BMJ (1993); 306: 1391-1394.
49. Baty BJ, Baker DL. Seminars in Medical Genetics. The Evolving practice of Genetic Counseling. Am J, Med Genet (2001) Special Issue.
50. Arberas C. Ética y genética. Bioética y genética. Ed. Ciudad argentina. Cátedra UNESCO de Bioética UBA. (2000): 11-18.