

Fundamentos del análisis genotípico. Sondas genéticas

ANTONIO MONTALVO CORREA*

El análisis genotípico, a diferencia del análisis fenotípico, nos va a permitir examinar el genotipo de un carácter de un individuo independientemente de su manifestación externa, o fenotípica. Por tanto, tanto en expresión dominante como regresiva, homo como heterocigótica, será posible detectar dicho rasgo o alteración.

Los primeros estudios del genoma humano con fines diagnósticos se realizaron en 1976, descubriéndose la primera deleción en un gen humano, concretamente en el de la α -talasemia, y en 1978 el mismo Y. W. Kan descubre el primer polimorfismo de restricción asociado a una enfermedad, que fue la drepanocitosis.

Desde entonces, aunque la metodología ha logrado importantes mejoras, el fundamento del análisis genotípico sigue basándose en los mismos principios. Independientemente del método en concreto aplicado, el análisis genotípico se basa en:

Las propiedades de asociación entre cadenas de DNA de hebra simple. En concreto, la asociación entre una cadena de DNA de hebra simple del sujeto en estudio y otra cadena de hebra simple conocida, con un tamaño mínimo de 20 nucleótidos, a la que llamamos *sonda*. Asociación que es debida al apareamiento entre las bases complementarias de estos ácidos nucleicos. Entre la Adenina y la Timina (o Uracilo en el caso del RNA) y la Guanina y la Citosina, apareamiento éste más estable que el anterior. Otros apareamientos entre

TABLA I
ESTABILIDAD EN LOS EMPAREJAMIENTOS
ERRONEOS DE NUCLEOTIDOS

EMPAREJAMIENTOS ESTABLES	EMPAREJAMIENTOS ERRONEOS		
	Muy inestable	Menos inestables	Estabilidad no conocida
A-T	A-C	A-G	
G-C	A-A	G-T	G-G
	T-C		C-C
	T-T		

estas bases resultan en formas de asociación mucho menos estables o completamente inestables (tabla I). ¿Porqué se asocian estas bases?. Sencillamente porque asociadas entre sí se encuentran en un nivel energético más estable. Ahora bien, en la asociación resultante entre las muchas bases de estas cadenas, de cientos o miles de nucleótidos, alcanzar ese nivel de máxima estabilidad o de máxima asociación, no sólo requiere una máxima complementariedad, sino que además, las condiciones químicas (de tipos y de concentración de iones, acidez, etc.) y físicas (temperatura, etc.) del medio han de ser lo más adecuadas posibles para permitir el encuentro «dándole tiempo» de las respectivas bases complementarias, y una vez encontradas entre sí, que les permitan permanecer «tranquilamente» asociadas mediante esos puentes de hidrógeno, dos para la pareja adenina-timina y tres para la pareja guanina-citosina.

Por el contrario, toda dificultad al emparejamiento de estas bases, debido a: poco tiempo de reacción, reaccionan-

* Profesor de Biología Molecular. Universidad de Cantabria.

* Conferencia pronunciada en el IV Memorial Profesor «Guillermo Arce».

tes en condiciones poco adecuadas por influencia de las propiedades químicas del medio o demasiado movimiento molecular debido a una temperatura inadecuada, dificultan el establecimiento y mantenimiento de los enlaces que hacen posible y estabilizan estas uniones. Todo esto puede producir interferencias en esta asociación y por tanto, errores.

De esto creo que queda muy claro que en la realización de estas técnicas, es muy importante para «poderse fiar» de los resultados, la precisión y rigor en el desarrollo de las mismas. Estos estudios pueden tener un margen de fiabilidad muy bajo cuando son realizados por quien no conoce bien esta problemática, o laboratorios insuficientemente preparados en material o personal para ello.

Además de esta asociación o «hibridación», como la denominamos técnicamente, entre el DNA del sujeto y la sonda, es también absolutamente preciso, disponer de un sistema de corte de gran precisión y especificidad en el sitio donde corta el DNA del sujeto; a lo cual sirven de forma muy eficaz los llamados enzimas (endonucleasas) de restricción. ENDONUCLEASAS porque son enzimas que cortan en el interior del ácido nucleico, en este caso DNA, y de RESTRICCIÓN porque proceden de un sistema de autodefensa de las bacterias frente a DNAs extraños a los que rompen con estos enzimas.

Estos enzimas tienen la propiedad de cortar el DNA en puntos muy precisos, que van a ser secuencias de tres, cuatro, cinco o más nucleótidos. Lógicamente, cuanto mayor sea el número de bases de la secuencia que precisan reconocer, menos frecuente será dicho sitio y por tanto los fragmentos que produzca al corte serán mayores al producirse menos cortes de un DNA. De este modo se puede elegir el tamaño de los fragmentos que se quiere obtener

del DNA del sujeto. También se deduce que si los cortes de la fragmentación han tenido lugar en secuencias precisas de nucleótidos, como hemos dicho, dos DNAs exactamente iguales serán cortados en fragmentos exactamente iguales en tamaño y contenido, y por tanto cuanto más semejantes sean un DNA a otro, cabe esperar que tendrán más fragmentos iguales. Otros criterios se suman en la elección de los enzimas adecuados en cada caso.

El análisis genotípico, en líneas generales, nos va a permitir estudiar la patología de los DNAs alterados, por delección, reordenamiento o mutaciones puntuales, tanto de origen hereditario o genético, como adquirido o somático como es el caso del cáncer.

Otros objetivos más a largo plazo serán el estudio completo del mapa genético humano, los llamados proyectos genoma humano, del que se conoce menos del 10 % de sus genes, sus enfermedades, o sencillamente estudiar en más profundidad los mecanismos de la regulación de la expresión de esos genes, conocimiento clave para comprender la morfogénesis, la diferenciación, el envejecimiento, el cáncer o la neurobiología.

El análisis genotípico, se va a llevar a cabo sobre el DNA de cualquier célula nucleada donde permanece invariable, si exceptuamos los genes de la inmunidad, pudiendo resolver numerosas dificultades del análisis fenotípico (Tabla II).

Una vez establecidos los fundamentos teóricos del análisis genotípico, hemos de entrar en más detalles respecto a sus características y desarrollo.

Lo primero que es importante, es conocer ¿qué enfermedades son accesibles al estudio con estos métodos? El primer límite que se establece es de orden técnico, aparte de los generales antes citados de tipo metodológico, es

TABLA II
VENTAJAS DEL DIAGNOSTICO GENOTIPICO

<i>Dificultad a superar</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Diagnóstico Fenotípico</i>	<i>Diagnóstico Genotípico</i>
Diferenciación y accesibilidad	Hemoglobinopatías Hemofilias Fenilcetonuria	Glóbulos rojos solamente Sólo plasma Plasma (Hiperfenilalanina)	Posible a partir de cualquier célula nucleada en período prenatal (amniocitos trofoblastos)
Ontogénesis	Drepanocitosis	Glóbulos rojos a partir de la 18ª semana de gestación	Diagnóstico prenatal posible desde la 10ª semana de gestación (trofoblastos)
Lyonización	Diagnóstico de las hembras portadoras para la enf. ligadas al cromosoma X	Inconstante a causa de la lyonización	Los dos cromosomas X son analizados simultáneamente en cada célula.
Penetración variable	Retinoplastoma	Cáncer retiniano	Predisposición: Delección del DNA en el locus RB1
Expresividad variable	Distrofia muscular de Steinert	Mal definida	Diagnóstico por RFLP ligados (1)
Por expresión biológica característica	Corea de Huntigton	Síntomas neurológicos	Diagnóstico precoz por RFLP ligados (1)
Latencia de un genoma extraño	Hepato-carcinoma	Marcadores serológicos inconstantes	Integración HBV directamente incluido en el DNA de los hepatocitos.

(1) Los RFLP, polimorfismos de restricción, son marcadores genotípicos.

preciso disponer de unas sondas adecuadas que permitan reconocer tanto al gen en estudio como a marcadores genotípicos próximos a él, reconocimiento basado en la hibridación entre sus nucleótidos y los de la sonda.

Se denomina SONDA genética, a todo fragmento de DNA (o RNA), homólogo a una secuencia celular de DNA (o RNA), que es capaz de unirse por hibridación con esa secuencia celular de forma estable y altamente especí-

fica por reasociación entre bases complementarias independientemente de la concentración o abundancia de esa secuencia de ácido nucleico que se busca, de la célula; en la muestra en estudio una sola sonda puede reconocer su homólogo único entre millones. La sonda precisa como se ha dicho anteriormente un mínimo de 20 nucleótidos.

La obtención de sondas está condicionada al conocimiento del gen en

estudio y la posibilidad de clonar dicho gen. Clonar es separar el DNA de ese gen del resto de todo el DNA humano, inmensamente mayoritario, e introducirlo en uno mucho más pequeño y controlable, denominado vector, que suele ser el DNA de un minicromosoma llamado plásmido, de bacterias «domesticadas» como el *Escherichia Coli*. El DNA con el gen que interesa para el estudio, se obtiene del total del DNA celular con una endonucleasa de restricción, que le va a cortar en secuencias específicas y posterior purificación del fragmento. Para su conservación y replicación se introduce habitualmente en ese plásmido o minicromosoma al que también se ha cortado con esa misma endonucleasa para dejar los extremos del corte en modo tal que «encajen» perfectamente con los de la sonda; se une con una ligasa y allí queda disponible para recuperarlo cuando sea necesario, cortando el plásmido de nuevo con la misma endonucleasa usada anteriormente, se obtiene el fragmento tal y como fue insertado. Además, en este plásmido se puede replicar aparte de que haya plásmidos que se repliquen ellos solos muchas veces en la bacteria portadora, estas bacterias, *E. coli*, pueden duplicarse, en condiciones óptimas de crecimiento cada 20 minutos, lo cual significa que en 12 horas una bacteria podría dar lugar a casi un billón de nuevas bacterias y por tanto de copias de la sonda.

De esta manera, se tiene aislada y disponible la sonda (con la secuencia de DNA que interesa). Es como si revisando y hojeando libros, desordenados, en una biblioteca de miles de volúmenes en la que han desaparecido los ficheros, encontramos el que buscamos, sacamos una copia, y nos la llevamos en una cartera, y una vez separado del resto hacemos tantas fotocopias de la página que nos interesa para trabajar con ella cada vez que lo necesitamos, en vez de tener que ir a la difícil biblioteca y volver a

buscar cada vez la página que nos interesa, entre tantos libros desordenados y tan difíciles de encontrar.

Las sondas que se usan en la práctica son de dos tipos, a las que se denominan:

– **SONDAS DIRECTAS** que corresponden al gen que se quiere estudiar.

– **SONDAS INDIRECTAS** que son secuencias en las cuales no hay localizado ningún gen conocido, que reconocen polimorfismos de restricción genéticamente ligados a locus mórbidos o rasgos conocidos y que van a servir como marcadores genéticos.

Para caracterizar a cada una de estas ondas se emplea una nomenclatura. La Conferencia sobre el Mapeo de los Genes Humanos «Human Gene Mapping», que se suele reunir cada 2 años, ha establecido esta nomenclatura y la revisa y clarifica. Siguiendo estas normas «bautizan» a la sonda según el locus al que corresponde; cuando el locus corresponde a un gen identificado toma el nombre abreviado de este gen. Independientemente, las sondas son nombradas también por el laboratorio que las ha preparado y toman el nombre del vector que las contiene. Así es frecuente que cuando están en un plásmido, tomen el nombre de éste el cual viene indicado por una «p» (plásmido) y unas mayúsculas a continuación, con siglas del investigador o del laboratorio y un número que las clasifica en el archivo del investigador o laboratorio que suele ser cronológico según el orden de aislamiento de la sonda u otros códigos internos del laboratorio. Por ejemplo, la sonda llamada según el laboratorio pJW101, corresponde al gen de la α -globina, y la nomenclatura oficial la denomina HBA. Aparte de esto, existe una caracterización, algo más compleja para la nomenclatura de las sondas anónimas o indirectas, sondas que en principio carecen de contenido de informa-

ción genética o expresan un gen no identificado.

Una vez que se dispone de sondas, ya clonadas en un vector y guardadas en un tubo con bacterias que contienen dicho vector, ¿cómo se utiliza esta sonda para el diagnóstico genotípico, cómo se interpretan estos estudios del DNA genómico humano y qué aplicaciones tiene su estudio?

Cuando se habla de DNA genómico humano, se hace referencia al DNA nuclear, el cual puede extraerse de cualquier célula a excepción de los hematíes y de las plaquetas porque ninguno de los dos tiene núcleo.

El núcleo de cada célula humana, que es diploide, contiene una cantidad constante de DNA = 6 picogramos (6×10^{-12} g). Como normalmente se suelen utilizar leucocitos de sangre periférica heparinizada (no coagulada), ya que son las células más fáciles de obtener, esto supone que 1 ml. (1 centímetro cúbico) de sangre total, con métodos bien establecidos, se pueden obtener de 30 a 50 microgramos ($30 - 50 \times 10^{-6}$ g.) de una buena muestra. También puede obtenerse de células en cultivo, biopsias, etc., y puede conservarse a -70° C indefinidamente, hasta la extracción del DNA. Alternativamente, se puede extraer inmediatamente el DNA y conservarlo, siempre con EDTA, durante largo tiempo hasta su análisis.

Como este DNA es idéntico al DNA del cigoto formado por la fusión de los gametos paternos (óvulo y espermatozoide), a veces se le denomina también DNA germinal, siendo importante no confundirlo con el obtenido directamente de las células germinales del individuo, mucho más raramente utilizado.

Considerando que es frecuente trabajar con leucocitos, conviene recordar que muchos de ellos son linfocitos, con genes de la inmunidad con un reordenamiento específico de los mismos,

diferente según la función de ese linfocito, pero que en principio en los estudios sobre genes no relacionados con la inmunidad no van a interferir.

Al extraer este DNA, nos vamos a encontrar, inevitablemente, con trozos o fragmentos raramente mayores de 50.000 pares de bases (pb), pues las manipulaciones de la extracción van a romperlo, lo cual no constituye un problema, ya que después, va a ser siempre necesario fragmentar el DNA con un enzima (endonucleasa) de restricción, en fragmentos menores de 20.000 pares de bases. Una vez obtenidos estos fragmentos, será preciso separarlos de forma ordenada y reproducible.

Es importante recordar que el DNA es un ácido, y que los ácidos en un medio o solución acuosa de pH neutro o alcalino (alto), presentan cargas negativas por haber soltado su H. En el caso del DNA estas cargas están en los ácidos fosfóricos que forman su esqueleto y que a este pH serán fosfatos cargados negativamente. Por eso, el DNA estará cargado con una carga netamente negativa. Aprovechando esta carga negativa, se van a separar los fragmentos del DNA por electroforesis en gel, la cual se utiliza habitualmente tanto como técnica analítica o como preparativa. La discriminación de los fragmentos se realiza en base al efecto de filtración del gel. Estos geles, son como una inmensa red en tres dimensiones de esas macromoléculas, como son la agarosa o la poliacrilamida, las cuales en la formación del gel, han creado múltiples uniones, incluso covalentes, e interacciones entre esas inmensas cadenas moleculares, formando una inmensa red tridimensional de inmensos poros llenada por el agua con las sales, es decir el tampón, y los fragmentos del DNA, que se desplazarán como a través de inmensos andamiajes, que dan consistencia sólida a ese medio fluido del agua y moléculas en solución. La velocidad de migración de los frag-

mentos será en función de dos parámetros, su masa molecular, la cual es debida al tamaño según el número de pares de bases que forman el fragmento y la concentración del gel de separación, tanto de agarosa (el más usado) del 0.6 - 1.5 %, como de poliacrilamida del 4 - 11 % (de acrilamida). La elección del gel será en función del tamaño de los fragmentos que interesa separar; la agarosa discrimina bien fragmentos de un tamaño entre 500 y 20.000 pares de bases, mientras que la acrilamida discrimina fragmentos de menos de 1.000 pares de bases.

En este complejo, tampón-soporte, es donde se van a separar los fragmentos de DNA sometidos a un campo eléctrico de corriente continua, es decir, una electroforesis, ordenadamente en función de su tamaño por el entramado del gel, atraídas sus cargas negativas por el polo positivo, y algo repelidas por el negativo. Por eso, en un tiempo dado, los fragmentos estarán más lejos del punto de partida, que es el de aplicación de la muestra, cuanto más pequeños sean y más cerca cuanto mayores sean y siempre en las mismas condiciones experimentales, la separación será la misma.

El tiempo de duración de la electroforesis se establece en base al desplazamiento de los fragmentos que nos interesa en función de su tamaño, tipo de gel, tampón y condiciones eléctricas.

Una vez finalizada la separación de los fragmentos de DNA (o RNA) en el campo eléctrico, conviene disponer de una referencia. Actualmente, se incluye en el tampón de preparación del gel, es decir en el propio gel, una pequeña cantidad de bromuro de etidio que, bajo luz ultravioleta produce una intensa fluorescencia rosa-anaranjada, previamente nos ha podido servir para controlar la emigración de los fragmentos, y que al final de la electroforesis, nos va a permitir obtener una fotografía que nos

servirá de registro, con la posición de las diferentes bandas correspondientes a los fragmentos del DNA, ordenados según su tamaño, los mayores próximos al punto de partida y cuanto más pequeños más alejados. Ciertamente, con un número tan alto de fragmentos —en torno al millón—, es prácticamente imposible verlos separados, apareciendo una línea continua de DNA, aunque sí podemos valorar la calidad de la electroforesis, la cantidad de DNA que tenemos en las diferentes regiones del gel y cómo ha sido la fragmentación del DNA, a la que llamamos digestión, por los diferentes enzimas (endonucleasas) de restricción que hemos usado. Parámetros de enorme importancia para un buen resultado analítico.

El reconocimiento del fragmento portador de la secuencia génica busca entre el millón de fragmentos también presente, se va a realizar gracias a la sonda a la que se ha hecho referencia, la cual sabemos que es portadora de dicha secuencia génica y a la que marcamos previamente con radiactividad, es decir, sustituyendo (o añadiendo) alguno de los átomos que la forman con sus isótopos radiactivos, de tal modo que la sonda emitirá radiaciones (beta y/o gamma). La cadena de una sola hebra de esta sonda será capaz de reconocer la secuencia del DNA genómico, complementaria a ella, por hibridación y allí donde se encuentre este híbrido se emitirá radiactividad, que nos permitirá localizarlo por autorradiografía.

Esta hibridación no es posible en el gel de agarosa, sobre todo por las temperaturas necesarias para realizarla. E. Southern, de Edimburgo, tuvo la idea de transferir todos los fragmentos de DNA separados en el gel, tras la electroforesis, a un soporte sólido capaz de sufrir el tratamiento necesario para la hibridación. Esta transferencia está basada en el fenómeno de la capilaridad, de

donde le viene el término inglés de **BLOTTING** tan usado.

Esta operación combinada de transferencia e hibridación a continuación, se realiza en varias etapas:

En primer lugar, es preciso llevar a cabo la **DESNATURALIZACIÓN** de los fragmentos de DNA atrapados en el interior del gel, en la posición en que quedaron al finalizar la electroforesis. Esta desnaturalización se realiza durante una hora con NaOH diluida (0,5 M), al penetrar en el interior del gel la sosa, con objeto de separar las dobles cadenas del DNA y romper en trozos más pequeños los fragmentos; lo cual es importante para lograr una buena transferencia después y necesario para poder hibridarlo con la sonda. Posteriormente, se neutraliza la desnaturalización llevando el gel a pH neutro.

A continuación se realiza la transferencia del DNA al soporte sólido para la hibridación, que es una membrana de nylon o de nitrocelulosa. Para lograr esta transferencia, se coloca primero un papel muy absorbente, de dimensiones semejantes a las del gel, para que haga de mecha de absorción del tampón. Inmediatamente encima de este primer papel se coloca el gel (invertido para compensar, pues la transferencia dará una imagen especular invertida), inmediatamente a continuación del gel, la membrana de nylon (a la que hemos llamado soporte), y encima de ésta, nuevas hojas de papel absorbente semejante al primero (un papel de filtro grueso) y finalmente sobre ello numerosas toallas de papel para que, por capilaridad, vayan absorbiendo el tampón que hará el recorrido ascendente a través de la mecha y primer papel. Sobre todo ello, se coloca una placa con peso para facilitar la absorción. Al subir el líquido, por absorción arrastra los fragmentos de DNA desnaturalizados que en su movimiento, exclusivamente de ascensión sin desplazamientos laterales,

quedarán atrapados en la membrana de nylon (el soporte) exactamente en la misma posición en la que se encontraban en el gel.

La transferencia del DNA al soporte finaliza al consumirse el tampón, por absorción del mismo por el sistema. Se toma la membrana y se realiza la fijación del DNA al nylon irradiado con luz ultravioleta para formar uniones, incluso de tipo covalente.

Una vez que tenemos los fragmentos separados, fijados en la membrana de nylon, conviene saturar la membrana con DNA inespecífico (sin ninguna relación con la especie en estudio), en un proceso que se denomina **PREHIBRIDACIÓN**. Para ello, se emplea DNA de esperma de salmón, fragmentado por ultrasonidos en trozos muy pequeños, con objeto de saturar toda la membrana, ya que el nylon tiene gran tendencia a fijar el DNA y, de este modo, evitar que se fije de forma inespecífica a la membrana el DNA radiactivo de la sonda.

Finalizada la prehibridación, se realiza la **HIBRIDACIÓN** con la sonda, marcada con radiactividad, en condiciones de temperatura y química idóneas durante unas 15 horas. A continuación, se realiza un **LAVADO** de forma progresiva de la membrana a fin de eliminar todo el DNA de la sonda que no esté unido específicamente y que produciría interferencias. Al término de este lavado se deben encontrar en la membrana de nylon, todos los fragmentos del primitivo DNA fijados y en forma de hebra única y solamente aquel complementario a la sonda en forma de híbrido de cadena doble.

Para localizar el fragmento hibridado, se hace una **AUTORADIOGRAFÍA** del soporte con los fragmentos transferidos y el híbrido con la sonda, usando pantallas que amplifican la ganancia de la radiactividad, de modo tal que, sólo

donde esté localizada la sonda radiactiva, que corresponde al sitio donde se encuentra hibridada al DNA, objeto del estudio, se emitirá radiación que se detecta al impresionar la placa radiográfica (una placa de las usadas habitualmente para radiografías), es decir, por autorradiografía. De este modo, mediante estas sondas, podemos detectar esa región del genotipo complementaria a la sonda.

En base a este proceso, ¿qué información se puede obtener en la exploración genotípica por medio de esta hibridación de fragmentos con sonda según el método de Southern?

El uso de este método para el análisis genotípico, sólo será posible en casos en los que la distribución electroforética de los fragmentos de restricción, es decir, el mapa de restricción, de la región genómica en estudio sea previamente conocido y en base a ello se seleccionarán la sonda y enzimas a emplear.

Las variaciones susceptibles de ser estudiadas mediante este método, podrán ser tanto de orden semicuantitativo, es decir, variaciones del número de copias (fiable sólo cuando es realizada por laboratorios de experiencia), o cualitativo, variación en la distribución de los fragmentos separados reconocidos por la sonda. No hay que olvidar que la sonda suele ser más pequeña que los fragmentos, pudiendo encontrarse la región complementaria a la sonda en extremos partidos de dos fragmentos contiguos, con el sitio de corte del enzima en la región complementaria a la sonda, la cual se uniría a ambos fragmentos.

La interpretación de estos resultados, aparte de errores experimentales, puede ser muy variable según las situaciones:

– Las deleciones completas, en homocigosis o en heterocigosis, son fáciles de poner de relieve pues desapa-

rece la señal completamente. En los casos de deleciones heterocigóticas, la señal es más difícil de interpretar y conviene realizar además una dosificación génica, determinando cuantitativamente por densitometría la señal autorradiográfica, frente a un control negativo. En estos casos, para genes autosómicos únicos, cabría esperar detectar el 50 % para cada copia delecionada.

– Las deleciones parciales deben ser confirmadas con otros enzimas, es decir, realizando cortes de esa región génica con otros enzimas que reconozcan secuencias diversas, para descartar que sea solamente una mutación puntual creando un nuevo sitio de corte suplementario.

Pese a su aparente limitación (señal presente o ausente, sitio presente o ausente, este análisis con el método de Southern, sigue siendo de enorme utilidad pues las variaciones observadas son codominantes. Toda variación alélica se detecta perfectamente en heterocigosis aunque haya sufrido una modificación cualitativa o cuantitativa. Esto es especialmente en casos como la lyonización (en el cromosoma X).

Es importante tener en cuenta que en algunos casos se producen metilaciones en el DNA que afectarán a los sitios de corte por los enzimas de restricción y que son debidas a modificaciones sométicas en la diferenciación de ciertas células.

Los inconvenientes en el método de Southern son, pese a todo, numerosos, pues se trata de un método largo, complicado, caro en reactivos y personal y poco susceptible de automatización. Independientemente de esto, las dificultades de su interpretación y la posible aparición de artefactos son aún numerosas.

Alternativamente al método de Southern, existe la posibilidad de estudiar las mutaciones puntuales (que afectan a una sola base) en un gen, sin ser

necesaria una previa separación de los fragmentos. Para ello es necesario, no sólo conocer el gen, sino también su secuencia en la región en la que se ha llevado a cabo la mutación puntual, al menos 10 nucleótidos antes y 10 nucleótidos después de la base mutada. Con la secuencia conocida, se sintetiza en el laboratorio, con un sintetizador de nucleótido, una sonda con la secuencia normal del gen y otra con la mutada, ambas con una longitud total de 19 nucleótidos (longitud óptima de la sonda) cada una, con 9 nucleótidos antes de la base afectada y 9 después.

Con estas sondas preparadas se realiza una hibridación en condiciones de reacción muy restringidas, en la que sólo la total identidad de los 19 nucleótidos establecerá y mantendrá la hibridación al término de la prueba mientras que la variación de un solo nucleótido será suficiente para desestabilizar al híbrido, el cual no aparecerá al final de la prueba. Por ello, el DNA normal sólo formará híbrido estable con la sonda correspondiente a la secuencia normal y no lo formará con la sonda correspondiente con la secuencia mutada. Por el contrario, el DNA mutado no formará el híbrido con la sonda de la secuencia normal y sí lo formará con la sonda de la secuencia mutada.

Este análisis es el que solamente se empleará, por tanto, en los casos en los que se conoce la secuencia y la mutación, como es el caso de la drepanocitosis, otras hemoglobinopatías, mucoviscidosis, déficit de α -1-antitripsina, enfermedad de Duchenne, fenilcetonuria, etc., enfermedades relativamente frecuentes y bien conocidas.

Existen otros métodos de análisis genotípico de un ámbito de explicación más restringido y cuya menor utilización y diversidad extendería innecesariamente esta exposición orientada a los métodos más habituales y de mayor aplicación a la genética médica.

Como complemento a los métodos expuestos, es frecuente en la actualidad, enriquecer las muestras en estudio de DNA, cuando se trata de regiones o fragmentos bien conocidos y de los que se sabe al menos la secuencia de los 20-30 nucleótidos presentes en sus extremos. Este DNA puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa, más conocida por sus siglas en inglés, PCR (polymerase chain reaction). En esta técnica se usan unas pequeñas sondas de unos 20-25 nucleótidos de largo, complementarias a cada uno de los extremos conocidos del DNA que se quiere amplificar, sondas a las que se denominan fragmentos cebadores y que, tras unirse a sus regiones complementarias en los extremos de las cadenas de DNA separado (monohebra) van a servir como iniciadores de la copia de cada una de las cadenas del DNA separadas por medio del sistema de reacción del enzima DNA-polimerasa, responsable de la replicación del DNA. Esta reacción se lleva a cabo en un solo tubo en el que se han incluido aparte del DNA que se quiere amplificar (se suele partir de 1 μ g de DNA genómico), los fragmentos cebadores, sintetizados en el laboratorio con un sintetizador programable de oligonucleótidos, nucleótidos y reactivos necesarios para la síntesis (replicación) del nuevo DNA, junto al enzima Taqpolimerasa, que es una DNA polimerasa termorresistente y que no se alterará en las diferentes etapas de calentamiento necesarias en este método. Una vez presentes los componentes citados, se llevan a cabo tres pasos por cada ciclo de amplificación: en un primer paso, se desnaturaliza el DNA a 95° C durante 2 minutos para realizar la SEPARACION de las dos cadenas del DNA nativo, a continuación se lleva el tubo a 37° C durante 2 minutos para que pueda realizarse la HIBRIDACION de los fragmentos cebadores a las regiones complementarias de las cadenas de DNA separadas en el paso

anterior; finalmente, se calienta a 70° C durante 2 minutos para que se realice la REPLICACION del DNA a partir de los cebadores hasta completar la copia total de la cadena. Una vez finalizados estos pasos, se repite el ciclo de nuevo sin más operaciones que las incubaciones de 2 minutos a cada una de las temperaturas citadas siempre siguiendo el orden establecido; duplicándose la cantidad de DNA presente al comienzo de cada ciclo, al completar los tres pasos. De este modo después de 20 ciclos (poco más de una hora de reacción) se ha amplificado la secuencia inicial, en principio, un millón de veces, es decir

se obtiene casi 1 mg por cada μg de DNA de partida.

Una inmensa ventaja de esta técnica revolucionaria es que por su simplicidad es perfectamente automatizable, existiendo ya aparatos que permiten efectuar las variaciones de temperatura de manera automática y programada.

Esta amplificación será rigurosamente específica, si los cebadores corresponden a secuencias únicas.

Su principal indicación será la detección de secuencias muy poco representadas en una muestra biológica.