

## Revisión

# Técnicas para el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias

F. CLAVERIE MARTÍN, E. RAMOS TRUJILLO, F.J. GONZÁLEZ PAREDES

*Unidad de Investigación. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Santa Cruz de Tenerife.*

### RESUMEN

El diagnóstico de muchas enfermedades hereditarias necesita una confirmación a nivel molecular del defecto genético que presenta el paciente. Una vez detectada la mutación y confirmado el diagnóstico clínico, podemos determinar cuál es el efecto de dicha mutación en la proteína codificada (cambio de conformación, alteración o pérdida de función, localización errónea, disminución en su expresión, etc.), y así poder abrir puertas a nuevas terapias dirigidas al defecto específico. En esta revisión, primero consideraremos algunos conceptos básicos de genética molecular, incluyendo estructura y expresión del gen, intrones y exones, códigos genéticos, transcripción, traducción, procesamiento del RNA y mutaciones y sus tipos. También explicaremos algunos métodos para extraer DNA y RNA de sangre u otros tejidos del paciente. A continuación discutiremos los métodos que se emplean para detectar mutaciones en genes asociados a enfermedades hereditarias. El principio en el que se basa un ensayo de detección de mutaciones es que la secuencia de nucleótidos del gen de un individuo afecto será distinta de la secuencia de un individuo con fenotipo normal. Además, describiremos dos métodos para analizar el efecto de algunas mutaciones en la maduración del pre-mRNA (RT-PCR a partir de RNA de sangre

y análisis de minigenes). Por último, mencionaremos algunos métodos informáticos que sirven para determinar si las mutaciones detectadas son patológicas o no, y para predecir el efecto de mutaciones en la maduración del pre-mRNA.

**Palabras clave:** Enfermedades hereditarias; mutación; diagnóstico molecular; genes; mRNA; amplificación por PCR; transcripción inversa; minigenes.

### ABSTRACT

The diagnoses of many hereditary diseases must be confirmed on a molecular level of a genetic defect that the patient has. Once the mutation is detected and the clinical diagnoses confirmed, we can determine which is the effect of said mutation in the coded protein (changing shape, alteration or loss of function, erroneous location, decrease of its expression, etc.) and just be able to open the doors to new therapies aimed at the specific defect. In this article, we first consider some basic concepts of molecular genetics, including the gene structure and expression, introns and exons, genetic codes, transcription, translation, RNA processing, and mutations and its types. We will also give some explanations of methods to extract DNA and RNA from the blood and other tissues of the patient. After that, we will discuss

*Correspondencia:* Félix Claverie Martín. Unidad de Investigación. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Carretera del Rosario, 145. 38010 Santa Cruz de Tenerife  
*Correo electrónico:* fclamar@gobiernodecanarias.org

© 2008 Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León  
Éste es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Reconocimiento-No Comercial de Creative Commons (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/es/>), la cual permite su uso, distribución y reproducción por cualquier medio para fines no comerciales, siempre que se cite el trabajo original.

the methods used to detect mutations in genes associated to hereditary diseases. The principal on which a mutation detection trial is based is that this sequence of gene nucleotides of an individual affected will be different from the sequence of an individual with normal phenotype. In addition, we will describe two methods to analyze the effect of some mutations in the maturation of pre-mRNA (RT-PCR from RNA of the blood and analysis of minigenes). Finally, we will mention some computer methods that serve to determine if the mutations detected are pathological or not and to predict the effect of the mutations in the maturation of the pre-mRNA.

**Key words:** Hereditary diseases; mutation; molecular diagnosis; genes; mRNA; PCR amplification; inverse transcription; minigenes.

**Palabras clave:** Enfermedades hereditarias; mutación; diagnóstico molecular; genes; mRNA; amplificación por PCR; transcripción inversa; minigenes.

## CONCEPTOS BÁSICOS

Los genes eucariotas están formados por regiones codificantes o exones que son "leídas" por la maquinaria celular para la síntesis proteica y regiones no codificantes o intrones. Durante la expresión génica, lo primero que ocurre en el núcleo celular es el proceso de transcripción, por el cual se realiza una copia de RNA del gen de interés de forma íntegra. Esta copia, que incluye los exones e intrones del gen, se conoce como RNA inmaduro o pre-RNA mensajero. Seguidamente, el RNA inmaduro sufre un procesamiento específico, llevado a cabo por un complejo enzimático llamado espliceosoma, que consiste en una serie de reacciones de "corte y empalme" (*splicing* o maduración del pre-mRNA) por medio de las cuales los intrones son eliminados, generando una molécula madura que incluye únicamente los exones (RNA mensajero maduro, mRNA). Este mRNA contiene la información que codifica a la proteína.

Las uniones entre exones e intrones están definidas por secuencias conservadas denominadas sitios de *splicing*, (sitio aceptor o 5', donador o 3', tracto de pirimidinas y *branch site*). Sin embargo, estos sitios por sí solos no son suficientes para definir correctamente la secuencia exónica, por lo que dentro de los exones e intrones existen secuencias menos

conservadas que son reconocidas por proteínas reguladoras del *splicing*. Estas proteínas reguladoras pueden potenciar o inhibir el reconocimiento de un exón y su incorporación en el mRNA maduro. Por tanto, el mRNA contiene un segundo código genético que especifica cómo se procesan los mensajes.

Tras el proceso de maduración, el mRNA sale por los poros nucleares al citoplasma donde es utilizado por los ribosomas como molde para su traducción en proteína. El código genético en el mRNA se lee en grupos de tres nucleótidos o tripletes, y cada grupo representa un aminoácido. Cada secuencia de tres nucleótidos se denomina codón. La lectura comienza en un codón de inicio (AUG), el cual marca la pauta de lectura, continúa con los siguientes trinucleótidos y termina en un codón de parada (UGA, UAA o UAG).

La correcta expresión de un gen puede verse afectada por modificaciones locales (mutaciones o polimorfismos) en la secuencia de DNA del mismo. Podemos diferenciar distintos tipos de mutaciones, según sus efectos sobre los diferentes pasos que conforman la expresión génica. Cuando el cambio ocurre en la región codificante del gen, podemos hablar, de forma general, de tres tipos de mutaciones: silentes, de cambio de sentido y sin sentido. Se denominan mutaciones silentes a aquellas donde, a pesar de que ocurra un cambio de un nucleótido por otro, el cambio no supone una alteración en el mensaje codificado por el RNA mensajero, de forma que la secuencia final de la proteína no se ve alterada. Por otro lado, cuando ese cambio nucleotídico sí afecta al mensaje codificado por la molécula de RNA haciendo que se sustituya un aminoácido por otro en la cadena polipeptídica, estamos ante una mutación de cambio de sentido. Este tipo de mutaciones puede afectar gravemente a la conformación de la proteína resultante y, por consiguiente, a su actividad o función. Las mutaciones sin sentido son aquellas en las que el cambio introducido hace que en el mRNA aparezca una señal de parada prematura de la síntesis proteica, generando de este modo una proteína truncada, más corta que la normal y carente de regiones que pudiesen ser importantes para su función o localización. Por otra parte, existe un mecanismo celular por el cual los mRNA que contienen un codón de parada prematuro son degradados rápidamente y, por tanto, no son utilizados para la síntesis de proteína.

Existen otro tipo de mutaciones que pueden afectar de forma más severa a un gen, y en las que el cambio no es pun-

TABLA I. EJEMPLOS DE ALGUNAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR DEFECTOS GENÉTICOS QUE SE IDENTIFICAN MEDIANTE ANÁLISIS MOLECULAR

Enfermedad	Gen o genes	Cromosoma	Herencia	OMIM*
Síndrome de Marfan	<i>FBN1</i>	15q21.1	Autosómica dominante	154700
Neurofibromatosis tipo 1	<i>NF1</i>	17q11.2	Autosómica dominante	162200
Síndrome de X frágil	<i>FMR1</i>	Xq27.3	Ligada al X	300624
Fibrosis quística	<i>CFTR</i>	7q31.2	Autosómica recesiva	219700
Distrofia muscular de Duchenne	<i>DMD</i>	Xp21.2	Ligada al X	310200
Cistinosis	<i>CTNS</i>	17p13	Autosómica recesiva	219900
Enfermedad de Fabry	<i>GLA</i>	Xq22	Ligada al X	301500
Poliquistosis renal autosómica dominante	<i>PKD1</i> <i>PKD2</i>	16p13.3-p13.12 4q21-q23	Autosómica dominante	173900
Enfermedad de Dent	<i>CLCN5</i>	Xp11.22	Ligada al X	300009
	<i>OCRL1</i>	Xq26.1		300555
Síndrome de Bartter tipo I, II, IV	<i>SLC12A1</i>	15q15-q21.1	Autosómica recesiva	601678
	<i>KCNJ1</i>	11q24		241200
	<i>BSND</i>	1p31		602522
Hipomagnesemia familiar con hipercalcemia y nefrocalcinosis	<i>CLDN16</i>	3q27	Autosómica recesiva	248250
	<i>CLDN19</i>	1p34.2		248190
Nefronoptosis	<i>NPHP1</i>	2q13	Autosómica recesiva	256100
	<i>NPHP2</i>	9q31		602088

\*Ver base de datos OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>)

tual sino que implica a regiones mayores del mismo. Es el caso de las deleciones (donde una región del gen se elimina completamente), inserciones (donde ocurre la incorporación de fragmentos de DNA dentro del mismo gen) y duplicaciones (cuando una región del gen se incluye varias veces seguidas en la región del mismo, afectando a su estructura normal).

Finalmente, hay otro tipo de mutaciones cuyo efecto se traduce en un incorrecto procesamiento del RNA mensajero, de forma que la reacción de *splicing* no sucede tal cual debería, pudiendo tener efectos drásticos en la proteína resultante. Estas mutaciones pueden conllevar la pérdida completa de secuencias exónicas en el RNA mensajero o, de forma más drástica, pueden eliminar indirectamente uno o más exones de la molécula resultante. Asimismo, existen mutaciones de *splicing* que generan la inclusión de regiones intrónicas (no codificantes) en la molécula de RNA mensajero. Este tipo de mutaciones suelen traducirse en una pérdida de la pauta de lectura en el RNA mensajero y a la aparición y detección, por parte de los ribosomas, de secuen-

cias de parada de la síntesis proteica prematuras. Normalmente, estas mutaciones se localizan en los nucleótidos de unión de intrones y exones en el DNA, o bien en regiones importantes para el reconocimiento de los intrones y exones, en lugares de unión de las proteínas encargadas del procesamiento de RNA inmaduro (amplificadores o inhibidores del *splicing*).

Generalmente se asume que las mutaciones puntuales causantes de enfermedad dan lugar al cambio de un aminoácido por otro en la proteína codificada por el gen, o a un codón de parada prematuro. Sin embargo, debemos tener en cuenta que algunas mutaciones puntuales tienen su efecto en el paso anterior alterando el *splicing* del pre-mRNA, bien sea inactivando o creando un sitio de *splicing*, activando un sitio de *splicing* críptico o alterando un elemento regulador de *splicing* (un amplificador o un inhibidor). En este caso, el efecto de la mutación podría ser la pérdida completa de un exón, produciéndose un cambio mucho más drástico en la estructura de la proteína que el que cabría esperar como resultado del cambio de un aminoácido por otro.

## MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA Y RNA

Mediante distintas técnicas podemos purificar, con relativa facilidad, el DNA o RNA de diversas muestras biológicas, entre ellas la sangre de nuestros pacientes. De entre los distintos métodos a utilizar, el más sencillo, rápido y limpio es el uso de columnas que capturan de forma específica el ácido nucleico de interés para nuestro estudio. Para ello se procede a la lisis controlada de las células sanguíneas nucleadas (linfocitos) con el fin de liberar el contenido celular al medio. Seguidamente, los extractos celulares se hacen pasar, mediante centrifugación, por las columnas específicas que capturan el DNA o RNA. Una vez adheridos a la superficie de estas columnas, se llevan a cabo diversos pasos de lavado para eliminar el resto de sustancias no deseadas. Finalmente, se lleva a cabo la elución de la columna del DNA o RNA y su recogida para posteriores procesos analíticos.

## MÉTODOS PARA DETECTAR MUTACIONES EN DNA

En todos ellos el DNA que se va a analizar es primero amplificado mediante la *reacción en cadena de la DNA polimerasa* (PCR), que a su vez ya es un método de detección si la mutación afecta al tamaño del fragmento (inserción o delección).

### Reacción en cadena de la polimerasa

Utilizando la reacción en cadena de la DNA polimerasa podemos obtener cantidades adecuadas de un fragmento de DNA para poder analizarlo. Este procedimiento ha revolucionado el diagnóstico molecular ya que, partiendo de una cantidad pequeña de DNA genómico del paciente, podemos amplificar distintas partes de genes en un par de horas. Primero tenemos que sintetizar un par de cebadores (oligonucleótidos de 15-25 nucleótidos) que reconocen los extremos del fragmento que queremos amplificar. Luego tenemos que favorecer que ocurra la síntesis de DNA. Para ello, lo primero que debemos hacer es facilitar la separación de las cadenas (desnaturalización) del DNA molde. A continuación, permitir el apareamiento de los cebadores a su región complementaria en el DNA molde y, por último, facilitar que una DNA polimerasa resistente a altas temperaturas (como la

DNA polimerasa Taq) lleve a cabo la síntesis (extensión) de DNA a partir de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosforados (dATP, dGTP, dTTP y dCTP). Estos tres pasos constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 40 veces permite obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés. Todo esto se realiza de forma automatizada. Para ello, los tubos de reacción se introducen en un termociclador que de forma automática realiza los 40 ciclos de amplificación.

### Secuenciación del DNA

La secuenciación del DNA consiste en determinar el orden exacto de los nucleótidos (bases, G, A, T y C) a lo largo de un segmento de DNA. De esta secuencia se deduce la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. El método que más se utiliza es el de Sanger de síntesis de DNA. El DNA que se va a secuenciar se desnaturaliza y se mezcla con un cebador (complementario a un sitio en una de las hebras), polimerasa de DNA y los cuatro nucleótidos (dNTPs). También se añaden pequeñas cantidades de los cuatro terminadores de la síntesis (ddNTPs) marcados cada uno con un fluoróforo distinto. Cada vez que uno de ellos se incorpora previene la incorporación de otros nucleótidos a la cadena. De esa manera se genera un conjunto de fragmentos de DNA marcados con fluorescencia que difieren en tamaño solo en un nucleótido. Los fragmentos se separan mediante electroforesis en un capilar de un analizador automático. Cuando los fragmentos van migrando por el capilar pasan por un rayo láser que los hace fluorescer. Un detector de fluorescencia graba el orden del color de las bandas que luego se traduce en la secuencia. Finalmente, la secuencia de los fragmentos del gen de pacientes se compara con la secuencia normal para determinar la presencia de mutaciones.

### Análisis de conformación de cadenas sencillas de DNA (SSCP)

Es uno de los procedimientos que más se ha utilizado para detectar mutaciones. Los exones y parte de los intrones flanqueantes del gen se amplifican por PCR a partir de DNA de pacientes e individuos sanos. Para obtener resultados óptimos, los fragmentos amplificados deben ser de unos 200 pares de bases. Después de la amplificación los fragmentos se desnaturalizan, se enfrían y se someten a electroforesis. Cada molécula de DNA de cadena sencilla asume una conformación tridimensional que depende de su secuencia de

nucleótidos. Las diferentes conformaciones migran con velocidades distintas durante la electroforesis en gel. Por lo tanto, por cada fragmento amplificado se visualizarán dos bandas después de teñir el gel. Un cambio de un solo nucleótido hará que los fragmentos adquieran una conformación distinta y por tanto una movilidad diferente en el gel.

#### **Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)**

Los productos intactos de la PCR de exones u otras regiones del gen de individuos afectados y sanos se someten a electroforesis en un gel que contiene un gradiente ascendente de un agente desnaturizante del DNA (urea o formamida). A una concentración determinada del agente desnaturizante a lo largo del gradiente la molécula de DNA empezará a desnaturizarse. Al separarse las hebras del DNA la migración por el gel se retarda. Un cambio de un solo nucleótido en la molécula de DNA puede cambiar el punto en el gradiente en el que ésta se empieza a desnaturizar.

#### **Análisis de heterodúplex**

Un heterodúplex es una molécula de DNA de doble cadena con uno o más pares de nucleótidos desapareados. Una molécula de DNA sin bases desapareadas es un homodúplex. El desapareamiento de un solo par de bases cambia la conformación de la molécula y retarda su movilidad electroforética. En este análisis, las muestras de DNA del paciente y del control sano se combinan y se amplifican por PCR. Si hay alguna diferencia en la secuencia de nucleótidos, se formará un heterodúplex. Las muestras de DNA se separan por electroforesis en un gel especial que aumenta la diferencia en movilidad entre el homodúplex y el heterodúplex.

#### **Análisis por rotura química de bases desapareadas.**

Esta prueba es una variante de la anterior. Las muestras de DNA de pacientes y controles se amplifican por PCR. Una de las muestras se marca con fluorescencia o radioactividad durante la amplificación. A continuación los productos de la reacción se mezclan, se desnaturizan y se dejan enfriar. Si hay diferencias en las secuencias se formará un heterodúplex. Las muestras luego se dividen en dos alícuotas. Una se trata con hidroxilamina, que modifica las citosinas no apareadas. La otra se trata con tetraóxido de osmio, que modifica las timinas no apareadas. Seguidamente ambas se tratan con piperidina, que rompe los residuos modifica-

dos. El DNA se separa por electroforesis en gel desnaturizante. Si se produjo una rotura en la hebra del DNA aparecerán dos fragmentos. Por tanto, la rotura de productos indica la presencia de bases desapareadas, es decir, diferencia de un nucleótido entre las muestras de DNA.

#### **Micromatrices de oligonucleótidos**

Las micromatrices (“*microarrays*”) permiten el análisis en paralelo de más de cien mil biomoléculas en volúmenes de reacción muy pequeños. Una de sus aplicaciones es la detección de mutaciones causantes de enfermedad o mutaciones que predisponen a enfermedad para diagnóstico. Sobre la superficie de una placa de cristal se sintetizan en un orden determinado miles de oligonucleótidos (fragmentos cortos de DNA, 20-50 nucleótidos) que contienen todas las mutaciones conocidas de un gen o todas las variaciones posibles en la región codificante del gen. El DNA de los pacientes y controles sanos se amplifica y se marca con fluorescencia utilizando PCR, y luego se añade a la micromatriz. La fluorescencia en una posición determinada indica que el DNA se ha unido al oligonucleótido.

#### **Cromatografía líquida desnaturizante de alto rendimiento (DHPLC)**

El análisis de fragmentos de DNA mediante DHPLC es un método eficiente de detección de mutaciones de un solo o pocos nucleótidos, y se ha utilizado con éxito en la detección de mutaciones en genes asociados con enfermedades. Los fragmentos de DNA se separan según su tamaño o según la presencia de heterodúplex durante su tránsito por un gradiente en una columna. En el DNA amplificado de cadena doble, los nucleótidos que se asocian erróneamente a causa de mutaciones se hacen evidentes después de la formación de heterodúplex. La presencia de estas mutaciones crea una mezcla de heterodúplex y homodúplex durante la reasociación del DNA normal y del mutante. Si esta mezcla de fragmentos se hace migrar, mediante HPLC en condiciones parcialmente desnaturizantes, los heterodúplex fluyen de la columna antes que los homodúplex debido a su temperatura de fusión más baja.

#### **Análisis mediante RFLP**

Una vez identificada una mutación específica, ésta puede detectarse en otras muestras de DNA mediante una técnica

sencilla conocida como RFLP (del inglés *Restriction Fragment length Polymorphism*). Para poder llevar a cabo esta técnica, el cambio puntual generado por la mutación a estudio debe generar o destruir una diana de reconocimiento de una enzima de restricción específica. En el caso en que la mutación genere un sitio de restricción, el enzima producirá un corte en las moléculas de DNA que contengan dicha mutación, dejando intactas aquellas donde no esté presente la mutación y, por consiguiente, presenten el alelo normal (no mutado). Mientras que si la mutación destruye un sitio de restricción, ocurrirá lo opuesto, es decir, el corte se producirá en las moléculas que presentan la secuencia normal y no en las que tienen la mutación. De esta forma, tras una amplificación por PCR de la región de interés del gen que sabemos que contiene dicha mutación, someteremos al producto a la digestión con una enzima de corte específico. Seguidamente, haciendo uso de geles de agarosa o acrilamida, se llevará a cabo una separación de los distintos fragmentos de corte (fragmentos de restricción) que variarán según el genotipo de cada paciente. Siguiendo esta metodología, podemos analizar una cantidad importante de pacientes para una o varias mutaciones de una forma sencilla, rápida y fiable, sin necesidad de secuenciar el DNA.

## DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE MUTACIONES EN RNA

### Transcripción inversa seguida de amplificación por PCR (RT-PCR)

La presencia de mutaciones puede también detectarse en el RNA de los pacientes. Una vez aislado este RNA de sangre u otros tejidos, se emplea la técnica de transcripción inversa seguida de amplificación mediante PCR. Posteriormente, los productos de la reacción son analizados mediante secuenciación de DNA para determinar si existen mutaciones en la región codificante del gen. La transcripción inversa utiliza el mRNA como molde para sintetizar una hebra de DNA complementaria (denominada cDNA). Dicha molécula es idéntica a la hebra de DNA del correspondiente gen pero carente de los intrones presentes en el DNA genómico. Seguidamente, se usa el cDNA como molde para una PCR convencional. Mediante esta técnica, se pueden distinguir alteraciones en el procesamiento de RNA durante su maduración, presencia de transcritos alternativos del gen, etc.

### Sistemas de minigenes

La manera idónea de determinar el verdadero efecto de una mutación causante de enfermedad sobre el procesamiento del pre-RNA mensajero es el análisis directo del RNA procedente de tejido del individuo afectado mediante RT-PCR. Sin embargo, no siempre es posible obtener la muestra de tejido y su RNA correspondiente. La solución en estos casos es construir en un vector plasmídico parte de un gen con algunos de sus exones e intrones (sistemas de minigenes). Estos minigenes se introducen en líneas celulares, donde se expresarán de manera transitoria. El RNA procedente de cultivos celulares es extraído y analizado mediante RT-PCR.

La comparación de los patrones de *splicing* resultantes de un minigén con la secuencia normal del exón de interés con el de un minigén portador de la secuencia exónica mutada permitirá detectar el efecto de esta mutación a nivel del procesamiento del pre-RNA mensajero.

## HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS PARA ANALIZAR EL EFECTO DE LAS MUTACIONES

### Análisis informático de mutaciones con cambio de sentido

Existen diversos programas informáticos, disponibles de forma gratuita en la red que, mediante estudios comparativos de las secuencias, permiten predecir si un cambio de aminoácido por otro afecta a la función de la proteína y, por tanto, si es potencialmente patogénico. Estas herramientas son fáciles de utilizar y solo requieren el introducir la secuencia normal de la proteína y el cambio de aminoácido que predice la mutación. Ejemplos de este tipo de herramientas son PMUT (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>), PolyPhen (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>), SIFT (<http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>) y SNPs3D (<http://www.snps3d.org/>).

### Análisis informático de mutaciones que afectan al *splicing*

Como discutimos anteriormente, los minigenes son herramientas muy útiles para el estudio de mutaciones que afectan al correcto procesamiento del RNA mensajero. Sin embargo, realizar el análisis rutinario *in vivo* de un elevado número de variantes genómicas susceptibles de afectar al proceso de *splicing* no resulta viable. En los últimos años se han desarrollado diversos algoritmos que permiten realizar predic-

ciones fiables del efecto de mutaciones en el *splicing*. La mayoría de los mismos analizan mutaciones que afectan a los sitios aceptor, donador y *branch site*, y también aquellas que puedan afectar a aquellos sitios que permiten a la célula distinguir entre exones verdaderos y pseudoexones. Estos elementos se dividen en cuatro categorías simplemente en base a su localización y su efecto: sitios exónicos que incrementan la selección de un exón (*Exonic Splicing Enhancers*, ESEs) o lo silencian (*Exonic Splicing Silencers*, ESSs), y sitios análogos intrónicos (*Intronic Splicing Enhancers*, ISEs, e *Intronic Splicing Silencers*, ISSs). De todos ellos los más estudiados y conocidos son los ESEs, por lo que la mayoría de las herramientas disponibles en la actualidad han sido diseñadas para su estudio.

El análisis informático permite realizar un estudio preliminar de las mutaciones o variantes de interés. Entre ellos, cabe destacar ESE Finder y RESCUE-ESE. Ambas herramientas permiten identificar sitios ESEs. ESE Finder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>) otorga un valor a posibles ESEs según su probabilidad de ser sitios de unión a un subgrupo de proteínas conocidas como proteínas SR, caracterizadas por un dominio de unión al RNA rico en serinas y argininas. RESCUE-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>) asigna como posibles ESEs hexanucleótidos significativamente abundantes en exones humanos y/o localizados con frecuencia significativa cercanos a sitios 5' o 3' débiles.

Otras herramientas son de gran utilidad para identificar sitios aceptores, donadores y *branch site* dentro de un segmento genómico. Es el caso de Splice-Site Prediction by Neural Network (NNSplice), ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) y el Splice-Site Finder (SSF) (<http://violin.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html>). Ambos algoritmos asignan un valor a cada sitio identificado en función de su fuerza. Además existen páginas que aúnan algunas de estas herramientas, lo que permite realizar diferentes tipos de análisis de forma simultánea, como Human Splicing Finder Version 2.3 (<http://www.umd.be/HSF/>).

## BASES DE DATOS DE MUTACIONES HUMANAS

En los últimos años, el conocimiento de la secuencia completa del genoma humano ha permitido desarrollar nuevos métodos para la búsqueda y detección de mutaciones pun-

tuales, lo que nos ha llevado a un enorme incremento en el conocimiento de genes implicados en diferentes enfermedades y sus mutaciones asociadas. La correcta recopilación y clasificación de todas estas mutaciones es vital, y es sumamente importante la creación de bases de datos dinámicas que permitan la consulta y el uso de los datos por parte de investigadores y clínicos de todo el mundo, y que además estén asequibles en la red para poder fácilmente realizar diferentes tipos de análisis mediante herramientas informáticas de distinta naturaleza. Dentro de estas bases de datos cabe destacar la Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), que recopila las diferentes mutaciones caracterizadas para cada gen, y MutDB (<http://www.mutdb.org/>), una base de datos de mutaciones que incluye información estructural y funcional, también en función de cada gen. Por otra parte, existen otras bases de mutaciones específicas de cada enfermedad como, por ejemplo, la ADPKD Mutation Database (<http://pkdb.mayo.edu>) y la ARPKD Mutation Database (<http://www.humgen.rwth-aachen.de>), que recopilan todas las mutaciones asociadas con la enfermedad poliquística renal.

## BIBLIOGRAFÍA DE INTERÉS

- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; 3:285-298.
- Dracopoli N C, Haines J L, Korf B R, Morton C C, Seidman, C E, Rosenzweig A, Seidman J G, Smith D R. *Short Protocols in Human Genetics*. New Jersey, EE.UU: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.
- Elles R. *Molecular diagnosis of genetic diseases*. New Jersey: Humana Press; 1996.
- Glavac D, Dean M. Applications of heteroduplex analysis for mutation detection in disease genes. *Hum Mutat* 1995; 6:281-287.
- Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T, Kremensky I. SSCP analysis: a blind sensitivity trial. *Hum Mutat* 1997; 10:65-70.
- Lewis R. *Human genetics. Concepts and Applications*. Octava edición. New York: McGraw-Hill; 2007.
- Ng PC, Henikoff S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; 7:61-80.
- Pasternak J.J. *An introduction to human molecular genetics. Mechanisms of inherited diseases*. New Jersey, EE.UU: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
- Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001; 17:439-474.