

Genética

## Enfermedades hereditarias y técnicas de detección preimplantacionales

### *Hereditary diseases and preimplantational detection techniques*

Muñoz-Nuñez M, Giron J, Molina L, Fernández L, Velarde P, Figueroa M.J, Aragon M.J, Vettori P, Lopez E, Gonzalez A.

Unidad de Reproducción Humana, Centro Avanzado de Fertilidad, Clinica Serman. Jerez de la Frontera. (Cádiz)

#### **Resumen**

*El Diagnóstico Genético Preimplantacional es una técnica novedosa, que no lleva muchos años en práctica pero muy eficiente en cuanto a la detección de algún tipo de anomalía o alteración genética en los embriones obtenidos previamente mediante técnicas de Reproducción Asistida. Veremos qué tipos de anomalías existen en los cromosomas, algunas de las distintas técnicas utilizadas, el protocolo clínico a seguir cuando llega una pareja pidiendo asesoramiento genético y nos meteremos un poco más en el modo de herencia y los métodos de Diagnóstico Genético Preimplantacional de algunas de las enfermedades hereditarias más comunes, como son la Fibrosis Quística, la Enfermedad de Huntington, el Síndrome de Marfan, el Síndrome del X-frágil y el Síndrome de Turner.*

**Palabras clave:** (DGP) Diagnóstico Genético Preimplantacional. Fibrosis quística (FQ). Enfermedad de Huntington (EH). Síndrome de Marfan. Síndrome del X-frágil. Síndrome de Turner.

#### **Summary**

*Preimplantational Genetics Diagnosis is an ongoing and efficient technique in genetics diseases detection. These diseases are detected on the embryos previously obtained by assisted reproduction techniques. Here we propose an overview on some of the kinds of chromosomal anomalies or cytogenetic abnormality and the different techniques that are applied. We also propose a clinical protocol for advising the couples. We deal with some advanced concepts like inheritance mode and Preimplantational Genetics Diagnosis methods in some of the common inherited diseases such as Cystic Fibrosis, Huntington Disease, Marfan Syndrome, Fragile-X Syndrome and Turner Syndrome.*

**Key words:** (PGD) Preimplantation Genetic Diagnosis. Cystic Fibrosis (CF). Huntington disease (HE). Marfan syndrome. Fragile X syndrome. Turner Syndrome.

---

**Correspondencia:** Alejandro Gonzalez.  
alejandro@caf-jerez.com

## INTRODUCCIÓN

Hay dos tipos de herencia, la Herencia autosómica y la Herencia ligada al sexo. La Herencia Autosómica es la referida a los cromosomas "autosomas" (22 pares) y la Herencia ligada al sexo es la referida a los "heterocromosomas" o "cromosomas sexuales" (X, Y).

Existen enfermedades genéticas que son hereditarias originadas o por genes autosómicos, que pueden ser dominantes o recesivos, o por genes ligados a los cromosomas sexuales.

La mayoría de enfermedades genéticas autosómicas parecen debidas a genes recesivos. Si es así, el carácter o enfermedad aparece en la descendencia de padres no afectados pero portadores; la descendencia de dos individuos afectados siempre lo estará; si sólo es uno de los parentales el afectado, la descendencia tendrá un 50% de estarlo; además, los individuos afectados generalmente pertenecen a generaciones alternas. Ej: Fibrosis quística.

Si la enfermedad está causada por genes autosómicos dominantes, lo normal es tener un alelo dominante, no es normal ser homocigoto para esa enfermedad. El carácter pasa directamente de individuos afectados a la descendencia, basta que uno de los padres esté afectado para que los hijos lo estén; el carácter está presente en todas las generaciones; cada descendiente de un parental afectado tiene un 50% de posibilidades para estar afectado; puede darse el caso de que dos individuos afectados tengan un hijo que no lo esté, pero en un porcentaje muy bajo. Ej: Enfermedad de Huntington, Síndrome de Marfan.

En cuanto a la Herencia ligada al sexo, es muy diferente el patrón de herencia. Para empezar, los cromosomas X e Y son distintos. El cromosoma X es de gran tamaño, y el cromosoma Y es mucho menor; durante la meiosis, en la mujer los dos cromosomas X aparean entre sí, pero en el hombre el cromosoma X aparean con el cromosoma Y en una zona muy pequeña donde hay homología entre ambos; ésta falta de homología es debido a que los genes que están en uno y otro cromosoma son distintos, la mayoría de los genes del cromosoma X no se encuentran en el cromosoma Y, por ello, la mayoría de enfermedades ligadas al sexo se refieren al cromosoma X.

La mujer puede ser homocigota o heterocigota para las enfermedades ligadas al cromosoma X al tener 2 alelos, (XX). El hombre es hemiciogótico, por eso, suele expresar con mucha mayor probabilidad estas enfermedades. Ocurre un fenómeno, la inactivación de uno de los 2 cromosomas X de la mujer. Hay una

hipótesis que lo explica, la Hipótesis de la inactivación de LYON: los cromosomas X condensados están inactivos, suele ocurrir en la fase de blastocisto, inactivándose al azar (puede ser el cromosoma X materno o el paterno). Una vez que una célula ha inactivado uno de estos cromosomas, las células que se formen a partir de ella tendrán siempre el mismo cromosoma inactivado. El objetivo de esta inactivación es la compensación de la dosis génica debido a que tienen 2 cromosomas X con los mismos genes cada uno. Es por esto que las mujeres sufren menos enfermedades de las llamadas ligadas al sexo que los hombres, ya que si el cromosoma X afectado es el que se inactiva, éstas mujeres no sufrirán la enfermedad o en menor grado.

Si la enfermedad está causada por genes dominantes ligados al cromosoma X: un padre afectado salen hijas afectadas e hijos sanos; una mujer heterocigota afectada transmite el carácter por igual a su descendencia con una probabilidad del 50%.

Si la enfermedad está causada por genes recesivos ligados al cromosoma X: un padre afectado tiene hijas portadoras (heterocigotas) que transmiten el carácter por igual a su descendencia con una probabilidad del 50%; nunca son transmitidos de padres a hijos, pero sí de abuelos a nietos; la expresión fenotípica es mucho más frecuente en los varones. Ej: Síndrome del X-frágil.

Y por último, existen enfermedades originadas por genes ligados totalmente al cromosoma Y, se llaman genes holándricos, que se encuentran en la región diferencial del cromosoma, y que sólo se transmiten de padres a hijos. Ej: crecimiento de pelo en la oreja.

Las enfermedades hereditarias se clasifican en distintos tipos:

### 1.-Anomalías cromosómicas autosómicas **numéricas**:

-Aneuploidías: se dividen en monoploidías (1 sólo juego de cromosomas) y poliploidías (más de 2 juegos de cromosomas), aunque no suelen ser viables, las más frecuentes son la trisomía 21 (S. Down), trisomía 18 (S. Edwards), trisomía 13 (S. Patau); pueden existir otras aunque son muy raras como la trisomía 22 y la mosomía 21. El resto son letales.

2.-Alteraciones (mutaciones) cromosómicas **estructurales**: las mutaciones pueden ser espontáneas o estar producidas por sustancias químicas o radiaciones. Se dan en un cromosoma pero no en su homólogo. Surgen debido a apareamientos extraños ocurridos durante la meiosis, donde ocurren:

- deleciones, la más frecuente la 5p- (S. cri-du-chat), otras están relacionadas con el cáncer;
- duplicaciones;
- inversiones;
- translocaciones como la translocación robertsoniana.

De todas estas mutaciones, no todas llegan a manifestarse. Hay varios tipos de mutaciones en relación a esto:

- silenciosas: el cambio es de una base en la cadena de ADN cuyo resultado no cambia el resultado ya que se ha originado un triplete sinónimo, es decir, un triplete que codifica para el mismo aminoácido a la hora de la traducción.
- sin sentido: el cambio de una base de un triplete da lugar a un triplete sin sentido, que no codifica para ningún aminoácido, también llamados codones de terminación.
- cambio de sentido: cuando el cambio de una base por otra codifica para un aminoácido distinto. La proteína mutada tiene un aminoácido distinto que puede dar lugar a una proteína normal, realiza la misma función, o afectarle de tal modo que deje de funcionar o lo haga de un modo incorrecto.

3.-Anomalías cromosómicas en los  **cromosomas X, Y**: Ej: 45,X; 47,XXY; 47,XXX.

- Estructurales
- Numéricas (Euploidías y Aneuploidías):

La mayoría de las euploidías no llegan a término; la más frecuente es la triploidía; es la causa más frecuente de abortos espontáneos en los primeros 3 meses del embarazo. Las Aneuploidías son el resultado de una no disyunción cromosómica.

A la hora de querer diagnosticar estas enfermedades, existen varias técnicas. El diagnóstico puede ser prenatal, postnatal o preimplantacional, éste último es el que nos interesa a la hora de querer tener un hijo sano si los padres son portadores de alguna de ellas o están afectados.

Las diversas técnicas utilizadas son: PCR; FISH; electroforesis; DHPLC; citometría de flujo; análisis de cariotipo

**PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos.

1°. Separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar la cadena complementaria.

2°. Se baja la temperatura para conseguir que cada

cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN.

3°. Este último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. Cada una de las moléculas de ADN hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN (Figura 1) (2).

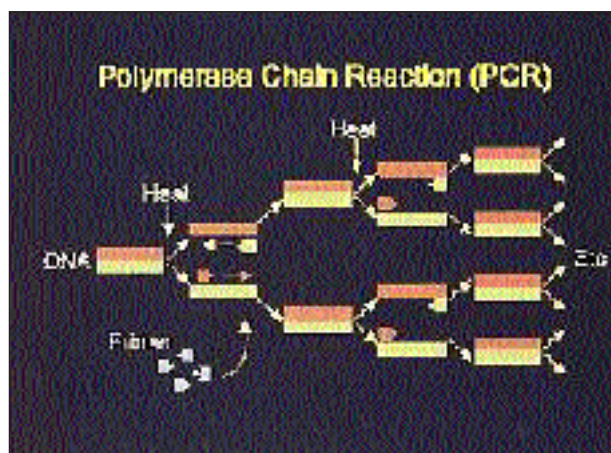


Figura 1

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa sino cualitativa, es decir, detecta presencia o ausencia de los cromosomas; y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa: para llevar a cabo esta técnica, existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia.

cia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

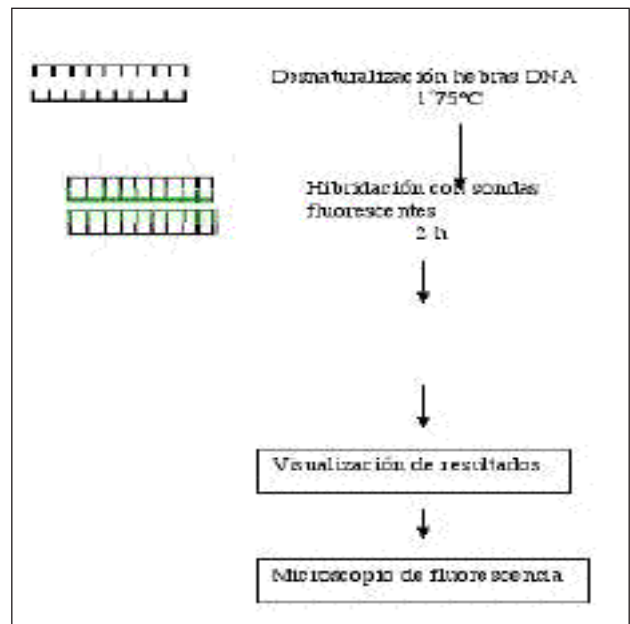
**FISH:** (Figura 2) (1). Esta técnica tiene como fin la identificación del sexo genético del embrión y la presencia o no de anomalías cromosómicas, principalmente aneuploidías se visualizan los cromosomas sexuales de la blastómera biopsiada mediante fluorescencia. Se lleva a cabo una desnaturalización del centrosoma de los cromosomas y posteriormente una hibridación con sondas específicas de cada tipo de cromosoma unidas a fluorocromos que se ponen de manifiesto al ser excitados en un microscopio de fluorescencia. Actualmente se dispone de sondas de ADN marcadas con fluorocromos de distintos espectros. Concretamente para la selección del sexo como es en este caso se dispone de dos sondas, una para cada cromosoma, para el cromosoma X la sonda está marcada en rojo y para el cromosoma Y la sonda está marcada en azul.

Se disponen también de sondas para varios cromosomas, por ejemplo, para analizar aneuploidías se dispone de una sonda marcada en verde para el cromosoma 13, en rojo para el cromosoma 21 y en azul para el cromosoma 18. Y para translocaciones se dispone de una sonda marcada en verde para el cromosoma 13 y otra, marcada en azul para el cromosoma 14.

En la actualidad es la técnica que más se utiliza, a pesar de que la tasa de error se ha estimado un poco más alta que con la PCR, alrededor del 5% (5). La ventaja del FISH frente a la PCR es que al mismo tiempo se pueden detectar aneuploidías, ya que se observan los cromosomas uno a uno. En cambio la PCR nos da tan solo información cualitativa (presencia/ausencia) (6).

**CITOMETRÍA DE FLUJO:** se basa en la separación de los espermatozoides según su diferencia en la cantidad de ADN total. En la especie humana concretamente, el espermatozoides X contiene un 2,8% más ADN que el cromosoma Y.

La muestra seminal se tiñe con una solución de Hoechst 33342 (bisbenzimidida), que es un fluorocromo que se une de manera no covalente a los pares de bases A-T (Adenina-Timina) y tiene una absorción máxima a 340 nm. Este espectro es diferente del de absorción del ADN (260 nm) por lo que la posterior excitación no afectaría a su estructura. En el citómetro se detecta la fluorescencia emitida por cada esper-



**Figura 2**

matozoide con un filtro de 400 nm de longitud de onda y los espermatozoides seleccionados son recogidos mediante un "sorter". Una parte de la muestra obtenida finalmente se analiza mediante FISH, y la otra es congelada para su posterior utilización, bien inseminación artificial (IA) o fecundación "in vitro" (FIV) (7).

Los resultados que se obtienen si se realiza FISH es que el 85% de los espermatozoides seleccionados son X. Las tasas de gestación en las técnicas de reproducción asistida son de un 10,6% en IA, y un 21,2% en FIV. Si nos referimos a los niños nacidos, el 92,9% de los nacimientos fueron niñas.

La principal crítica que ha recibido esta técnica es el uso de bisbenzimidida como fluorocromo, ya que es un agente potencialmente mutagénico. Fugger y colaboradores alegan que se ha visto que este producto no afecta al gen de la  $\alpha$ -globina (8). Los autores que llevan a cabo esta técnica responden con las evidencias clínicas de niños nacidos sanos.

#### **Protocolo Clínico: (4)**

Cuando llega una pareja para pedir consejo genético hay que seguir un protocolo. Lo primero es que la pareja firme un consentimiento informado para el DGP. Según lo que se quiera analizar se sigue un protocolo u otro.

#### **¿En qué consiste el DGP?**

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP)



es un nuevo método de diagnóstico prenatal que se realiza en el embrión antes de su implantación en el útero. En las parejas con riesgo de transmitir a la descendencia alteraciones cromosómicas, el DGP informa sobre el estado de cada uno de los embriones concebidos, y permite que únicamente los sanos sean transferidos al útero. La técnica del DGP es el resultado de la combinación de 1) la fecundación "in vitro", 2) la biopsia de células embrionarias por medio de micromanipulación, y 3) las técnicas de diagnóstico citogenético.

#### ¿Cuándo está indicado?

Cuando existen dudas fundadas sobre la viabilidad de los embriones o riesgo de que presenten alteraciones graves del número o la constitución de los cromosomas.

#### Procedimiento

1. **Obtención de los embriones.** Se trata de obtener los embriones que serán objeto del diagnóstico. Deben procederse "in vitro" mediante técnicas de reproducción asistida a pesar de que la pareja no presente ningún tipo de anomalía reproductiva que impida la procreación natural (según se especifica en la ley 35/1988 de 22 de Noviembre de 1988 sobre Técnicas de Reproducción Asistida, Art. 20.2 apartado Bb).
2. **Biopsia embrionaria.** La biopsia embrionaria se realiza a las 72-76 horas posteriores a la recuperación de los ovocitos (gametos), cuando el embrión se encuentra en el estadio de 6-8 células. Consiste en extraer una o dos células del embrión (según el número de células que tenga en total) sin que por ello se comprometa su desarrollo normal. Para ello se realiza un hueco en la zona pelúcida con ácido Tyrode (Figura 3) (3), para poder, posteriormente extraer la o las dos células a través de él (Figura 4) (3). Se realiza en un medio libre de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , que hay que suplementar con HSA. Una vez realizada la biopsia, el embrión es devuelto al incubador donde se mantendrá en cultivo "in vitro" hasta el momento de su transferencia al útero materno. Para fijar las células, cada una por separado se coloca en un porta desengrasado con alcohol:éter en una proporción 1:1 y se deja caer de 1-3 gotas de medio fijador (Carnoy, que se compone de metanol:ác. acético glacial en una proporción 3:1) (Figura 5) (3).
3. **Transferencia embrionaria.** El resultado del análisis genético se transmite al Centro mediante informe detallado y se decide, conjuntamente con la pareja consultante, qué embriones van a ser transferidos en función de la constitución cromosómica y las características morfológicas de viabilidad embrionaria.

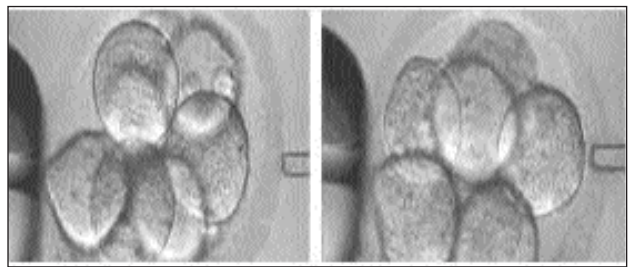


Figura 3

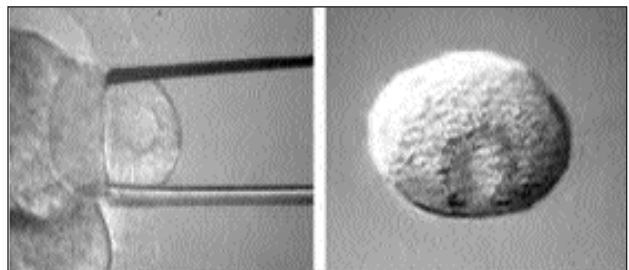


Figura 4

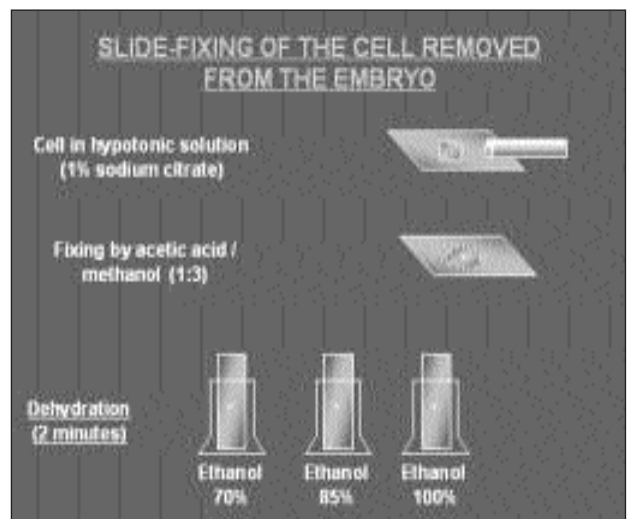


Figura 5

#### Resultados

La eficacia global del DGP depende del rendimiento del método de diagnóstico, del número de embriones disponibles y de su potencial de crecimiento. El registro de nacidos vivos después de la aplicación del DGP muestra que el procedimiento es eficaz y que no se asocian otras anomalías debidas a la técnica.

Este centro realiza el DGP para varias alteraciones como:

- Screening de Aneuploidías: Cromosomas X, Y, 18.

- Screening de Aneuploidías: Cromosomas X, Y, 13, 18, 21.
- Screening de Aneuploidías: Cromosomas X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22.
- Translocación Robertsoniana.
- Estudio de informatividad para una Translocación recíproca.
- Translocación Recíproca.

## FIBROSIS QUÍSTICA (FQ)

En España esta enfermedad es conocida como FIBROSIS QUÍSTICA, haciendo referencia al aspecto fibroso y quístico que adquieren los órganos afectados, como los pulmones y el páncreas; y como MUCOVISCIDOSIS, por la consistencia viscosa de las mucosidades que se secretan en las personas enfermas (11).

La fibrosis quística, es una enfermedad genética, hereditaria, no contagiosa (15). Afecta a muchos órganos del cuerpo, principalmente al aparato respiratorio y digestivo, aunque en cada paciente se puede manifestar de distintos modos y en distintos grados.

La afectación pulmonar es la más grave y determina el pronóstico, en ocasiones es necesario el trasplante.

Se manifiesta desde el momento del nacimiento. La mayoría de las personas afectadas vive hasta cerca de los 30 años, aunque algunas mueren durante la niñez y otros viven hasta los 40 años o incluso después. Se calcula que un(a) niño(a) de cada 16.000 recién nacidos puede estar afectado(a) por la enfermedad.

La fibrosis quística está causada por una proteína anormal (Figura 6, (11)) que no permite el ingreso y salida normales del cloruro (que, junto con el sodio, forman la sal) de ciertas células, incluidas las que revisten los pulmones y el páncreas. En consecuencia, estas células producen una secreción mucosa espesa y pegajosa y otras secreciones. La mucosidad obstruye los pulmones y causa problemas de respiración. Las personas afectadas también suelen tener infecciones en los pulmones, que terminan por dañarlos y contribuyen a una muerte prematura. Además, los líquidos digestivos espesos producidos por el páncreas no pueden llegar al intestino delgado, que los necesita para digerir los alimentos.

La FQ se diagnostica con una prueba sencilla e indolora que mide la cantidad de sal presente en el sudor. Los bebés, niños y adultos que tienen esta enfermedad tienen más sal en su sudor que las personas sanas. En muchos casos, la FQ se diagnostica cuando el niño tiene entre dos y cuatro años de edad, después

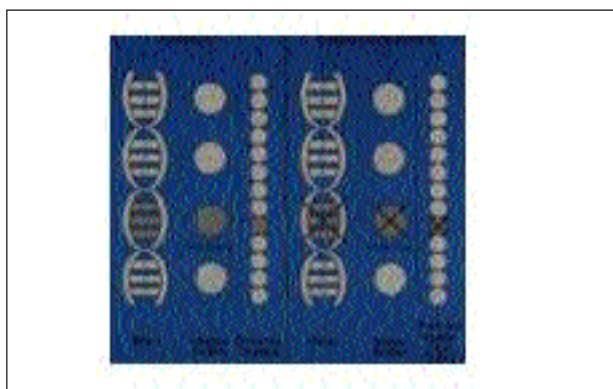


Figura 6

de infecciones pulmonares repetidas y/o problemas de crecimiento.

El gen causante de la enfermedad es el gen CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) que está situado en el brazo largo del cromosoma 7, concretamente en la posición 7q31-32 (Figura 7 (16)). Esta enfermedad presenta diferentes síntomas y variación en la gravedad dependiendo de la mutación que tenga el gen de la persona afectada. Se ha descubierto un gran número de mutaciones (>1.300) que afectan al gen. Estas mutaciones se presentan en diferentes frecuencias, dependiendo de la población estudiada. En Europa la incidencia de la

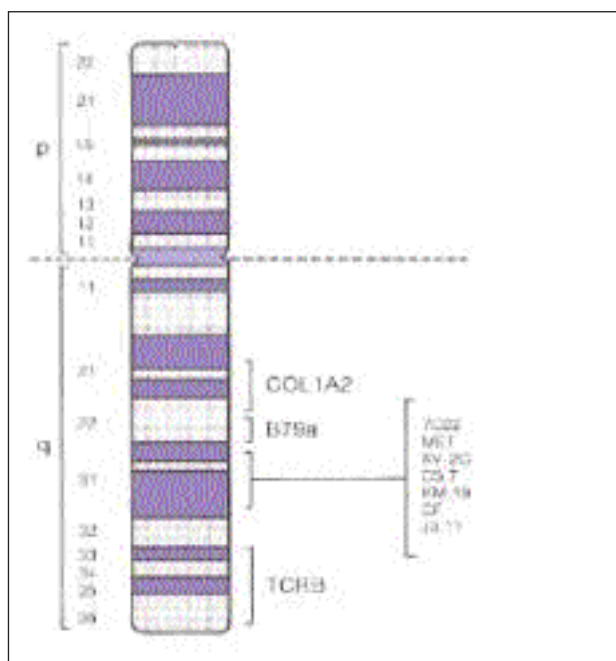


Figura 7

enfermedad es en promedio de 1 en 2.500 recién nacidos.

Respecto a las diversas mutaciones que se pueden dar, la más común es la denominada DF508, presente en un 57% de los cromosomas fibroquísticos en España. Consiste en una delección de 3 pb (CTT) en el exón 10, que conlleva la pérdida de un aminoácido (fenilalanina) en la posición 508 de la proteína.

En cuanto al modo de herencia, la fibrosis quística es una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva. Como los genes vienen en pares, para heredar la FQ, el niño debe recibir dos genes CFTR mutados, uno del padre y el otro de la madre, siendo ambos portadores del gen mutado. Las personas portadoras tienen un gen normal y uno anormal en el par, y son tan sanas como las personas normales. Cuando ambos padres son portadores de un gen FQ anormal, existe un 25% de probabilidades de que el niño padezca la FQ. Existe una probabilidad de un 50% de que el niño sea portador al igual que sus padres. También existe una probabilidad de un 25% de que el niño tenga el gen normal. Cada embarazo sucesivo tiene las mismas probabilidades. Si sólo uno de los padres es portador, no existe ninguna probabilidad de que los hijos tengan hereden la enfermedad. Además, en el caso de que un miembro de la pareja sea afecto, como mínimo todos los hijos serían portadores si el otro miembro fuera sano. Precisamente por esta razón el número de portadores es muy elevado, pero la mayoría de ellos no lo saben.

Mirando la frecuencia de embarazo de estas personas, el número de embarazos se ha ido incrementando de forma importante, calculándose que un 3% de las pacientes con FQ se quedan gestantes cada año (10).

### **“DGP” DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL**

La metodología utilizada se denomina mutagénesis dirigida mediante PCR (PSM).

El uso de kits comerciales, disponibles en nuestro país, permite el análisis simultáneo de varias mutaciones. Sin embargo, la tasa de detección depende de cuán frecuentes sean estas mutaciones en la población. Es así como el uso de uno de los paneles recomendados por The American College of Medical Genetics, que comprende las 25 mutaciones más comunes en la población caucásica, permite un nivel de detección promedio inferior a 60% de los alelos mutados en la población hispanoamericana. Por lo tanto, un resultado negativo en este análisis, no permite descartar la presencia de Fibrosis Quística. Es posible en

estos casos, aunque su costo es elevado, recurrir al servicio de empresas que cuentan con laboratorios especializados.

Existen unos kits llamados Elucigene (12) desarrollados por Cellmark Diagnostics, disponibles en Francia. Concretamente, en la actualidad existe el kit “Elucigene CF20kit” que usa múltiples brazos que permite el screening de 20 de las mutaciones de la FQ (DF508, G542X, N1303K, 1717-1G>A, G551D, W1282X, R553X, DI507, 1078delT, 2183AA>G, 3849+10kbC>T, R1162X, 621+1G>T, R334W, R347P, 3659delC, R117H, S1251N, E60X, A455E) sin instrumentación específica. El kit distingue entre homocigotos y heterocigotos para el DF508, pero no para otras mutaciones más raras, menos frecuentes. Detecta del 68-92% de los alelos defectuosos.

Treinta muestras de sangre y treinta de mucosa bucal fueron analizadas con el kit. Todas las muestras fueron previamente desnaturalizadas en electroforesis en gel de agarosa (con gradiente) y secuenciadas. El kit consiste en tres múltiplex. Cada uno contiene primers específicos para 6-8 mutaciones y dos reacciones control. La ausencia o la presencia de demasiados fragmentos control significa que hay que repetir el test. El porcentaje de amplificación es del 98,3%: de 60 ejemplos testados, 1 requería reamplificación. Este kit es útil para el estudio de la identificación en primera línea de los pacientes y portadores.

Otro método es mediante la técnica DHPLC (análisis en cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante), sirve para separar los heterodúplex de los homodúplex mediante desnaturalización para poder detectar así los mutantes. Estos dúplex de ADN se diferencian en 1 o más pares de bases.

Mediante **PCR**: (9) para realizar esta técnica usamos marcadores polimórficos, concretamente tres marcadores polimórficos intragénicos: IVS8CA, IVS17BTA, IVS17BCA; y cuatro marcadores polimórficos extragénicos: D7S490, D7S486, D7S480 y D7S523. Tabla 1 (9) (secuencia de los primers usados) (13).

-IVS8CA: (CA)<sub>n</sub> (repetición de CA) en el intrón 8 del gen CFTR con unas 12-24 repeticiones y una heterocigosidad del 48%.

-IVS17BCA: (CA)<sub>n</sub> en el intrón 17B con 11-20 repeticiones y heterocigosidad del 39%.

-IVS17BTA: (TA)<sub>n</sub> en el intrón 17B con 7-54 repeticiones y heterocigosidad del 87%.

Los marcadores extragénicos son (CA)<sub>n</sub> con un porcentaje de heterocigosidad del 80, 77, 87 y 81% respectivamente (14).

Se realizan dúplex de PCR que amplifican dos



**Tabla 1**  
*Secuencias de los Primers*

	<b>Primers</b>	<b>Sequences</b>
qF508	KSCF1 CF2	5'Cy5-AATTGGAGGCAAGTGAATCC-3' 5'-GTTGGCATGCTTTGATGACGCCTC-3'
IVS8CA	CFTR8.1 8.8.18.1 CFTR8.2	5'-Cy5-ACTAAGATATTTGCCATTATCAAGT-3' 5'-TCTATCTCATGTAAATGCTG-3'
IVS17BTA	CFTR 1 CFTR 5	5'-GCTGCATTCTATAGGTTATC-3' 5'Cy5-GACAATCTCGTGTGCATCG-3'
D7S486	D7S486F D7S486R	5'Cy5-AAAGGCCAATGGTATATCCC-3' 5'-GCCCAGGTGATTGATTGATAGTGC-3'
D7S490	D7S490F D7S490R	5'Cy5-CCTTGGGGCCAATAAGGTAAG-3' 5'-AGCTACTTGCAGTGTAACAGCATTT-3'

marcadores o uno combinado con DF508, que es la mutación más común.

Esta técnica permite ofrecer a parejas con mutaciones desconocidas o de baja frecuencia el DGP. Además esta técnica es eficiente ya que los dúplex se hacen una vez y pueden ofrecerse a todas las parejas informativas (Informatividad: los cromosomas que llevan la mutación puedan ser identificados). También se suele hacer un análisis de los miembros de la familia, lo cual es útil para estudiar la segregación de los distintos alelos con la enfermedad. Los dúplex sirven como herramienta de trabajo además de ser útiles como control de los alelos ADO (alelo drop-out) (la no amplificación de una de las moléculas de ADN) y de la contaminación.

Normalmente se realiza el estudio para la informatividad parejas con una o dos mutaciones o con una sola pero desconocida. Se usa PCR fluorescente para el ADN genómico de la sangre periférica.

El porcentaje de amplificación para todos los dúplex de PCR suele ser del 92-98%, con un margen de error debido a la presencia de algún alelo ADO.

### **ENFERMEDAD DE HUNTINGTON O COREA (EH)**

A ésta enfermedad se la conoce también por el nombre de Corea, (en griego danza) debido al movimiento característico de las personas que la padecen. Durante mucho tiempo se la denominó "el mal de San Vito". Se presenta en ambos sexos, manifestándose la enfermedad en general a partir de los 40 años, aunque puede aparecer antes, siendo entonces de curso más rápido. Afecta entre 7-10 de cada 100.000 nacidos en Europa y Estados Unidos de América.

La Enfermedad de Huntington, es una enfermedad

degenerativa neurológica (pues afecta al cerebro, a áreas determinadas de éste, donde las neuronas, van degenerándose y finalmente mueren.

Ésta enfermedad se caracteriza por una tríada de signos y síntomas (19):

- (1) trastornos del movimiento incluyendo distonía y parkinsonismo así como corea,
- (2) trastornos psiquiátricos y de la personalidad,
- (3) demencia.

La anormalidad genética reside en el cromosoma 4 en el brazo corto, concretamente en la posición 4p16.3 (Figura 8 (31)). El gen implicado es el gen "IT15", que se compone de un segmento de DNA que contiene una expansión de repeticiones de nucleótidos. El patrón implicado es un trinucleótido repetido, expandido e inestable (unstable expanded trinucleotide repeat), formado por la citosina, adenina y guanina (CAG).

El que una persona desarrolle o no la Enfermedad de Huntington está determinado por el número de repeticiones del triplete (CAG) que contenga dicho gen. Las personas que han heredado el gen tienen un número más alto de repeticiones, normalmente por encima de 38, 40. Aquellos cuyo número esté por debajo de 35 no desarrollarán la enfermedad. (Tabla 2) (18).

El test que se realiza para esta enfermedad sirve para determinar el número de repeticiones que posee esa persona en dicho gen. Hoy en día hay estudios encaminados a determinar si las personas cuyas repeticiones de CAG son intermedias, entre 35 y 38-40, (las cuales constituyen un 1% de las personas testadas), desarrollarán o no la enfermedad.

Aunque el intervalo del número de repeticiones no es fijo, ya que los distintos laboratorios consideran rangos diferentes.

En cuanto al modo de herencia, la enfermedad de Huntington es una enfermedad hereditaria, autosómi-

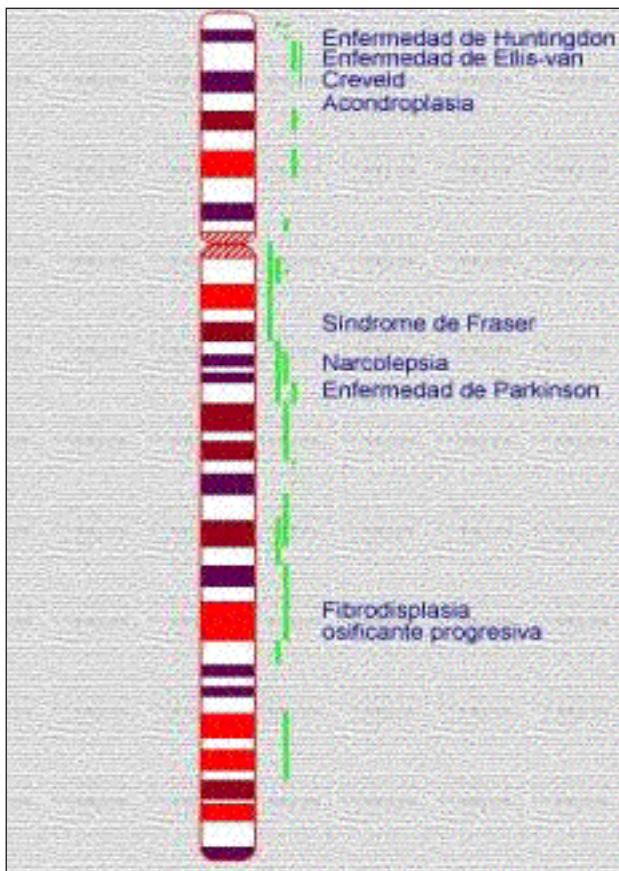


Figura 8

ca y dominante. Cada hijo/a de un padre o madre con la enfermedad tiene una probabilidad del 50% de heredarla, independientemente de si sus hermanos/as la han heredado o no. Si el hijo/a no hereda de sus padres el gen causante de la enfermedad, no tendrá la EH y tampoco se dará el caso de que la transmita a sus descendientes.

Esta enfermedad tiene una “penetrancia” completa, es decir, no hay distintos grados de afectación.

En la EH hay más de 40 repeticiones. Las repeticiones entre 35 y 40 están de momento indeterminadas en cuanto a si están enfermos o no. En series grandes de pacientes con EH, el número de repeticiones está inversamente relacionado con la edad de comienzo, si es mayor de 60 significa que hay una relación con el comienzo juvenil. La inestabilidad en esta área del genoma lleva a cambios frecuentes en la extensión de los (CAG)<sub>n</sub> con el proceso de la oogénesis. Hay una particular tendencia a aumentar el número de (CAG)<sub>n</sub> con la espermatogénesis. A esto se debe que la “anticipación” ocurra con la transmisión paterna de la anomalía genética.

Tabla 2

Nº de repeticiones CAG	Resultado
<28 (rango normal)	No desarrollo de EH.
29-34	El individuo no desarrollará la EH, pero la generación siguiente tiene riesgo.
35-39	Algunos, pero no todos, desarrollarán la EH. La siguiente generación también tiene riesgo.
>40	Desarrollarán la EH.

### “DGP” DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

La técnica que se emplea aún la técnica de fertilización in vitro con el diagnóstico genético de preimplantación.

En el caso de que la Enfermedad de Huntington sea por vía materna se puede realizar también el test preconcepcional. En la primera división meiótica femenina se origina el ovocito secundario (que constituirá posteriormente el gameto femenino) y el primer corpúsculo polar. El diagnóstico preconcepcional se realiza sobre éste primer corpúsculo polar, el cual es aspirado por micromanipulación (Figura 9) (19) y posteriormente se lleva a cabo una amplificación de su ADN mediante la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para analizar su contenido genético, de cuyo análisis podrá deducirse cómo es el ovocito secundario correspondiente y, por tanto, ser aceptado o rechazado en el proceso de FIV en el caso de que pudiera dar lugar a un gameto portador del gen enfermo. La ventaja de esta técnica es que, al realizar la selección en el estadio de ovocito y no de embrión, se evita cualquier reparo ético que pudiera tener la pareja portadora del defecto genético frente a la eliminación de embriones.

El objetivo es la estandarización de un método de diagnóstico molecular para la enfermedad de Corea de Huntington (17), mediante la técnica de la PCR utilizando ADN modificado por el método del Bisulfito de Sodio y un sistema especial para regiones ricas en CG's (kit comercial).

Se identificaron cinco pacientes previamente diagnosticados con Corea de Huntington. Se obtuvo el DNA de estos cinco pacientes y tres personas sanas (controles) a partir de sangre periférica. Utilizamos dos técnicas de amplificación para estas regiones ricas en CG's: la primera se basa en la modificación del ADN utilizando bisulfito de sodio, en donde las citosinas no metiladas se desaminan y cambian a ura-

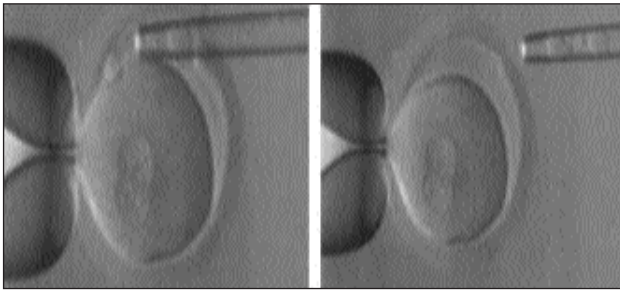


Figura 9

cilo, facilitando la amplificación de estas regiones. Se utilizaron oligos específicos, que amplifican una región que contiene los tripletes CAG, y su tamaño es de 260 pb en individuos control. La segunda técnica consiste en la utilización de un kit comercial, aquí la región que se amplifica en individuos control, es de menor tamaño, de 110 pb y contiene también los tripletes CAG.

Tras la amplificación mediante PCR de la zona que contiene los (CAG)<sub>n</sub>, el posterior estudio de las repeticiones se puede realizar por electroforesis en gel de agarosa o por DHPLC (mediante la formación de dúplex y PCR).

Con ambas técnicas utilizadas se logró obtener la amplificación de ambos alelos tanto en los pacientes como en las personas control.

1- Mediante el método del Bisulfito, el tamaño del producto amplificado fue de 260pb (alelo normal) y un rango entre 330 y 360pb para el alelo afectado en los pacientes.

2- Con el kit comercial, el tamaño de los alelos fue de 110 pb (alelo normal) y 180 pb (alelo afectado).

**CONCLUSIONES:** Ambas técnicas moleculares permiten la detección de la Enfermedad de Huntington, lo cual representa una gran ventaja para establecer un diagnóstico temprano y con ello canalizar al paciente a un consejo genético.

## SÍNDROME DE MARFAN

El síndrome lleva el nombre del Dr. Antoine Marfan, quien en 1896 describió a un paciente de cinco años de edad que tenía los dedos y las extremidades más largos y delgados de lo normal, además de otras anomalías en el esqueleto.

El síndrome de Marfan es un trastorno hereditario que puede afectar al corazón, los vasos sanguíneos, los pulmones, los ojos, los huesos y los ligamentos.

Es uno de los más comunes entre los más de cien trastornos hereditarios del tejido conectivo (el material que conecta y mantiene unidos los distintos tejidos del cuerpo).

Afecta a hombres y mujeres de todos los grupos raciales y étnicos, entre 2-3 de cada 10.000 nacidos vivos.

Los síntomas del síndrome de Marfan son muy variados, pueden ser desde leves hasta graves, y pueden estar presentes desde el nacimiento o aparecer durante la edad adulta.

El gen causante de este síndrome es el gen "FB1" (fibrilina-1) (Figura 11) (20) que se encuentra en un estado anormal en el brazo largo del cromosoma 15, concretamente en la posición 15q21.1 (Figura 10) (21). Normalmente, éste es el gen que se ocupa de la producción de una proteína llamada "fibrilina", un componente esencial del tejido conectivo que, contribuye a su fortaleza y elasticidad. Por lo general, esta proteína es abundante en la aorta, en los ligamentos que mantienen el cristalino del ojo en su sitio y en los

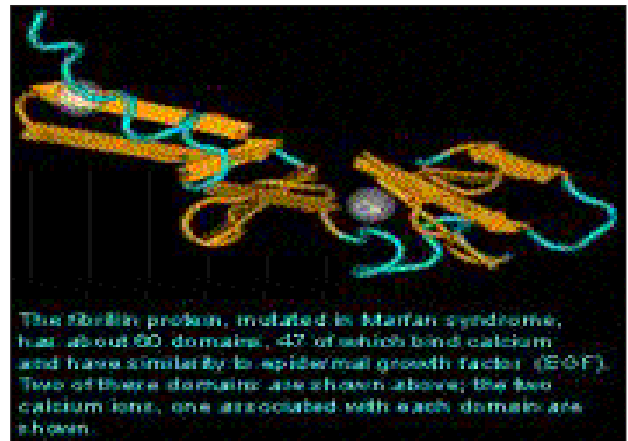


Figura 11

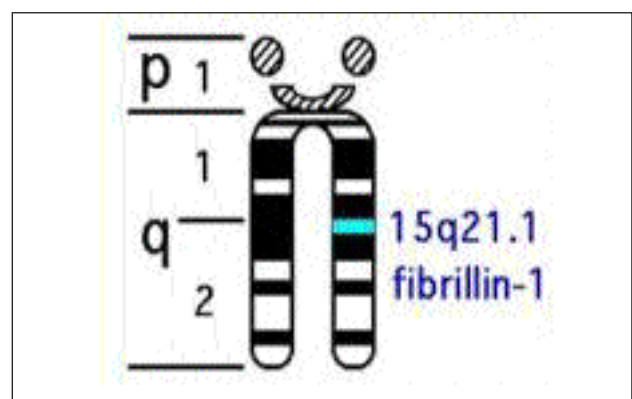


Figura 10

huesos. Aparentemente la fibrilina que se encuentra en los tejidos conectivos de las personas con síndrome de Marfan es escasa o defectuosa, lo cual puede causar el estiramiento anormal de estos tejidos al no poder tolerar cantidades normales de tensión.

En cuanto al modo de herencia, el síndrome de Marfan es un síndrome autosómico dominante. Habitualmente, las personas con síndrome de Marfan heredan este gen anormal de uno de sus padres, quien también padece el síndrome (afectado). Al ser un rasgo genético "dominante" significa que todos los hijos de una persona que tiene este gen tienen un 50 por ciento de probabilidades de heredarlo. No existe la posibilidad de personas portadoras, o estás afectado o eres una persona sana.

Alrededor del 25-30% de los casos en los que aparece una persona afectada se produce por accidente genético (una nueva mutación "espontánea") en un espermatozoide o un óvulo de un padre o una madre que no tiene el síndrome, (no hay historial familiar). A estos casos se les denomina casos "esporádicos", en los que además el riesgo de recurrencia en los hijos que siguen es impredecible, pero por lo general es muy bajo.

### **"DGP" DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL**

Se han encontrado alrededor de unas 600 mutaciones posibles que se clasifican en cinco grupos: mutaciones con cambio de sentido, mutaciones que introducen un codón de terminación prematura, mutaciones que afectan a los sitios en ensamblaje, deleciones multiexónicas y pequeñas deleciones o inserciones que no afectan el marco de lectura. Debido a esta gran variedad de mutaciones, actualmente los investigadores están tratando de determinarlas con el propósito de desarrollar una prueba definitiva mediante PCR para diagnosticar la presencia de este trastorno, es decir, detectar mediante una sola prueba la posibilidad de tener una de esas mutaciones.

Hay dos formas de realizar el diagnóstico del síndrome (22), una es mediante la técnica de "ligado" (linkage), cuando la mutación no es conocida y otra mediante caracterización de las mutaciones. Un dato importante es estudiar la segregación de la mutación correspondiente de la familia a la que pertenece la persona afectada, debe haber informatividad (cuando la mutación puede ser claramente distinguida). Para ello se extrae DNA genómico de leucocitos de sangre periférica mediante un kit (QIAGEN-blood mini-prep), de la amniocentesis y vellosidades coriónicas.

El DGP está basado en el estudio de la segregación de los marcadores polimórficos específicos en el gen FBN1, tanto intragénicos como extragénicos. Estos marcadores estudiados son: intragénicos (mts-1, mts-2, mts-3, mts-4) y extragénicos (D15S994, D15S103, D15S123, D15S161) (24). Pero no se pueden detectar las mutaciones al 100%, es efectiva la técnica en un 65-70% (23), debido a que existen alelos ADO (alelo drop-out) (la no amplificación de una de las moléculas de ADN) y contaminación, que puede dar lugar a errores.

El estudio de los fragmentos que resultan de la PCR se puede realizar mediante dos técnicas: CSGE (conformation-sensitive gel electrophoresis) y SSCP (single-strand conformation polymorphism). Hay fragmentos que tienen una migración aberrante, éstos son analizados con un "ALF automated DNA sequencer". Posteriormente las secuencias resultantes se comparan con la secuencia de ADNc del tipo silvestre para detectar posibles diferencias, las mutaciones.

### **X - FRÁGIL**

También llamado Síndrome de Martin-Bell.

Es un síndrome ligado al sexo, concretamente al cromosoma sexual X, siendo recesivo en la mujer por ser homocigota (XX) y dominante en el hombre por ser hemicigótico (XY).

Es la causa más común de retraso mental hereditario. Afecta a 1 de cada 4000 varones y 1 de cada 6000 mujeres, aunque las mujeres se afectan en menor grado (Hipótesis de la inactivación de LYON, como se explicó anteriormente) (27).

Hay que distinguir entre personas mutadas y portadoras de la premutación. Los portadores, 1 de cada 250 mujeres y 1 de cada 650 varones, presentan síntomas más inespecíficos y sutiles. En este caso los varones también pueden ser portadores ya que la condición de ser portador o de estar enfermo depende del número de repeticiones (CGG) que posea en el cromosoma X. El 85% de las mujeres portadoras no presentan sintomatología, aunque es frecuente que tengan trastornos en el aprendizaje y dificultades para las relaciones interpersonales. Se ha visto que existe una correlación entre mujer portadora y la menopausia precoz, sin embargo no se ha observado en las mujeres enfermas (26). El grado de afectación cognitiva es similar a la que se puede presentar en otros síndromes o trastornos generalizados del desarrollo, lo que produce una gran confusión a la hora del diagnóstico.

Este síndrome es llamado así porque en el cromosoma



soma X se forma una constricción secundaria que no tendría que estar (a esta constricción se le llama sitio frágil porque es un sitio de rotura cromosómica), aunque no suele haber tal rotura.

El gen responsable es el gen "FMR-1", que está localizado en la posición Xq27.3 (Figura 12), es una zona compuesta por intrones y exones, dentro de la cual hay expansión o repetición de un triplete de bases (CGG)<sub>n</sub>. Esta expansión coincide con un sitio frágil del cromosoma X conocido por la citogenética como sitio "FRAXA".

El número de repeticiones (CGG)<sub>n</sub> define el estado: mutación; premutación; sana.

- \* Hasta 50 repeticiones \_ persona normal, sana.
- \* De 50 - 200 repeticiones \_ persona portadora de la premutación, fenotípicamente normal.

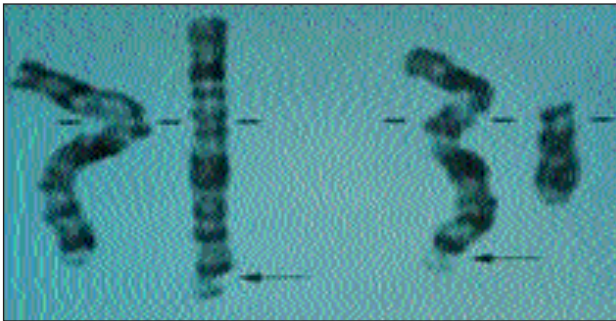


Figura 12

- \* Más de 200 repeticiones \_ persona poseedora de la mutación FRAXA o "frágil A".

El gen FMR-1, que participa en el desarrollo neurológico se traduce en una proteína, la proteína "FMRP" ("fragile X mental retardation protein"), la cual parece participa en el transporte del ARNm desde el núcleo al citoplasma. Ésta proteína se expresa en el hígado, testículos cerebro... Las últimas investigaciones apuntan a que es un gen "llave" para la expresión de otros genes.

Dependiendo de si los padres tienen la mutación o son portadores de ella, y de si es el padre o la madre quién la posee, son posibles distintos casos de patrón de la herencia:

- \* Padre XY - Madre XPFX = XX, XXF, XY, XFY — 50% afectados.
- \* Padre XY - Madre XXF = XX, XXF, XY, XFY — 50% afectados.
- \* Padre XPFY - Madre XX = XX, XXPF, XY, XPFY — 50% premutación.
- \* Padre XFY - Madre XX = XX, XXF, XY, XFY — 50% afectados.

- \* Padre XPFY - Madre XXPF = XPFX, XPFXF, XY, XFY

50% afectados, 25% premutación, 25% sanos.

- \* Padre XPFY - Madre XXF = XPFX, XPFXF, XY, XFY

50% afectados, 25% premutación, 25% sanos.

- \* Padre XFY - Madre XXP = XFX, XFXF, XY, XFY

75% afectados, 25% sanos.

- \* Padre XFY - Madre XXF = XFX, XFXF, XY, XFY

75% afectados, 25% sanos.

En cuanto al modo de herencia, éste síndrome se salta las leyes de Mendel, ya que, cuando el padre tiene la premutación, la descendencia la hereda, pero cuando es la madre la que la tiene, la descendencia hereda directamente la mutación. Esto es debido al fenómeno de **Expansión**: se cree que las repeticiones se expanden (aumentan en número) por el "slippage" (resbalón) de la ADNpolimerasa. Este fenómeno es más acusado en zonas de ADN repetitivas, la ADNpolimerasa al copiar resbala y hace varias copias de una misma secuencia. Parece un mecanismo exclusivo en humanos. Esto ocurre en las mujeres (en la oogénesis aumenta el número de repeticiones), en los varones no (el número de repeticiones en la espermatogénesis se mantiene), aunque aún no se conoce bien la causa de esta selección.

Otros dos fenómenos se dan en la herencia de este síndrome:

la **Anticipación**: con el paso de las generaciones la expansión de los CGG va aumentando, lo que conlleva a un aumento de la gravedad; y

la **Penetrancia**: porcentaje de individuos con un genotipo mutante que muestran algún grado de fenotipo mutante, 80% en hombres y 35% en mujeres. Esa variedad en el grado de afectación es debido a la inactivación que sufren ciertos genes en uno de los cromosomas X de la mujer, por lo que los varones suelen estar más afectados.

### "DGP" DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

Hay tres tipos de diagnóstico de la enfermedad:

- \* Postnatal: mediante el uso de células sanguíneas, del bulbo pilosos o mucosa; del tejido.
- \* Prenatal: vellosidades coriales, líquido amniótico, sangre fetal.
- \* Preimplantacional.

El Diagnóstico Genético Preimplantacional de este síndrome se realiza mediante la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Dicha técnica consiste en amplificar un fragmento de la región 5'UTR (no traducida) del gen FMR-1, la cual contiene la región de repetidos CGG y que a su vez coincide con un sitio frágil.

El test permite identificar el número de repetidos en el rango de la normalidad.

\* En varones el test tiene 100% de sensibilidad (sólo tienen un cromosoma X).

\* En las mujeres no es posible distinguir entre una homocigota normal (el mismo número de repetidos en ambos alelos) respecto a una mujer con un alelo normal y uno X-frágil.

Por eso se dice que el test no permite el diagnóstico de X-frágil (es decir, la detección de más de 200 repeticiones), sino la confirmación de la normalidad.

Existe un kit para realizar ésta técnica, el kit Pre-FRAXA, con el cual se calcula el número de repetidos a partir del tamaño del producto de amplificación. En paralelo se amplifica un fragmento del extremo 5' de la región repetida como control de la amplificación en el gen FMR-1.

Presentación del kit Pre-FRAXA: (de los laboratorios ATGen) (25).

El color que identifica al kit es el naranja; el cual incluye:

- 1 tubo Mezcla de Reacción Pre-FRAXA.
- 1 tubo Mezcla de Reacción C+ Pre-FRAXA.
- 1 tubo DNA control Pre-FRAXA conteniendo ADN control heterocigota (una vez descongelado se recomienda guardar a 4 °C).
- 1 tubo Taq ADN polimerasa Pre-FRAXA .
- 1 tubo Taq ADN polimerasa C+ Pre-FRAXA .
- 1 tubo Enzima de Restricción Pre-FRAXA .

El Kit se conserva a -20 °C y se comercializa en formato de 10 y 20 reacciones.

La muestra de prueba contiene reactivos para realizar 5 reacciones y se entrega por única vez.

### PROTOCOLO

Descongelar ambas mezclas de reacción y luego agitar vigorosamente en un vórtex. Si es posible realizar todas las manipulaciones en frío.

### Preparación de la mezcla para la amplificación:

1. Utilizar por cada muestra a analizar 18 µl de la mezcla de reacción.
2. Agregar 0,3 µl de Taq ADN polimerasa a la mezcla de reacción por cada muestra a analizar.
3. Agitar moderadamente en vortex o pipetear (homogeneizar correctamente). Se recomienda para los pasos 1, 2 y 3 realizar una sola mezcla para amplificación que contenga las cantidades necesarias de mezcla de reacción y de Taq ADN polimerasa, según el número de muestras a analizar. A este volumen agregar un 10% más debido a errores posteriores que puedan surgir en el pipeteo (este 10% está contemplado en los volúmenes que vienen con el kit). Tener en cuenta que es necesario sumar 2 reacciones, una para el control positivo y otra para el control negativo. Realizar esta etapa permite que el control positivo del kit tenga validez. La preparación de la mezcla para amplificación se realiza de la misma forma para las dos mezclas de reacción que componen el kit.

### Amplificación :

4. Alicuotar cada mezcla para amplificación en tubos de PCR diferentes debidamente rotulados colocando 18 µl en cada uno.
5. En cada tubo agregar 2 µl de muestra.

Las muestras deben contener entre 150 y 200 ng de ADN (se recomienda realizar la extracción de ADN de las muestras con el kit ADN fácil de ATGen). Agregar de la misma forma 2 µl de ADN control Pre-FRAXA en el tubo control positivo y 2 µl del agua utilizada para disolver el ADN de las muestras en el tubo control negativo.

6. Iniciar el programa para Pre-FRAXA y para C+.
- Programa Pre-FRAXA: 30 ciclos de 95°C/1:00', 65°C/2:00'; una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Programa C+: 35 ciclos de 94°C/1:00', 68°C/1:00', 72°C/1:00'; una desnaturalización inicial de 7 minutos a 94°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

7. Colocar los tubos en el termociclador cuando alcance los 94°C.

De no proseguir con el paso 8 conservar los tubos a 4°C hasta su digestión una vez que termina el programa.

**Digestión :**

8. Luego de terminado el ciclado, permitir que la temperatura descienda hasta la temperatura ambiente. En otro tubo para PCR colocar 10 µl del tubo de Pre-FRAXA de amplificación (para los tubos C+ seguir con obtención de resultados) y agregar 1 µl de la enzima de restricción.
9. Homogeneizar utilizando la pipeta.
10. Incubar 2:30 hs a 37°C (se puede incubar O.N.) y luego 10 minutos a 65°C.

**Obtención de los resultados:**

- Cargar 5 µl de cada producto de amplificación digerido y sin digerir y un marcador de peso molecular en gel de acrilamida al 10%.
- Migrar hasta que el colorante azul de bromofenol esté saliendo del gel.

**Estrategia experimental (figura 13):**

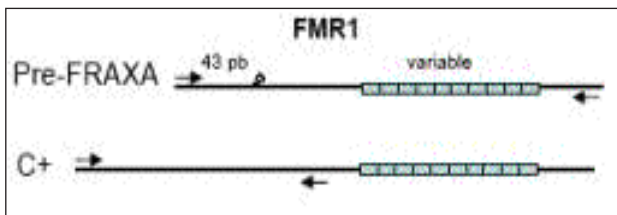


Figura 13

**Interpretación de los resultados :**

- Producto de PCR Pre-FRAXA 221 pb + n° rep. x 3.
- Producto de PCR Pre-FRAXA digerido 178 pb + n° rep. x 3.
- Producto de PCR C+ 301 pb.
- La digestión de 43 pb permite verificar que el

fragmento amplificado es el deseado. A partir del perfil electroforético, se puede calcular aproximadamente el tamaño del fragmento amplificado digerido o sin digerir lo cual permite deducir aproximadamente el n° de repetidos de cada alelo amplificado. Se pueden obtener los siguientes resultados (Tabla 3).

Cuando el resultado es incierto el kit no permite concluir y será necesario el empleo de una técnica alternativa (Figura 14).

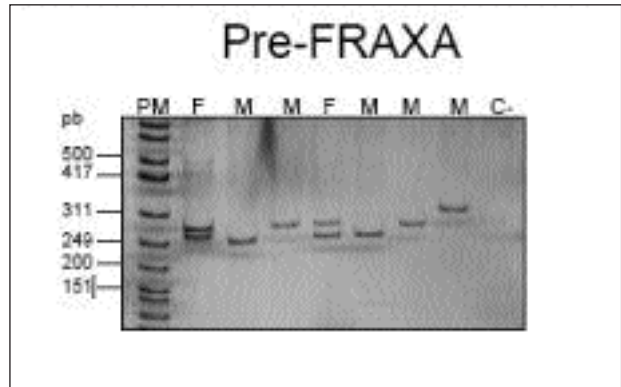


Figura 14

Gel de acrilamida 10% teñido con nitrato de plata mostrando la variabilidad del número de repetidos CGG en el gen FMR-1 en muestras de ADN femeninas (F) y masculinas (M) utilizando el kit Pre-FRAXA de ATGen.

**SÍNDROME DE TURNER (TS)**

Tiene varios nombres alternativos: Síndrome de Bonnevie-Ullrich; disgenesia gonadal; monosomía X. Fue descrito en 1938 por Henry Turner (30).

Tabla 3

Hombre	N° < 50 Normal	50 < n° < 200 Premutado	No hay amplificación Incierto
	(n°1 ≠ n°2) < 50	N°1 < 50	Un solo alelo o sin amplificación
Mujer	Normal	50 < n°2 < 200 Portadora premutada	Incierto

Las personas afectadas por este síndrome son mujeres, esto es debido a la carga genética. Las mujeres con Turner, aproximadamente la mitad, tienen una falta total del cromosoma sexual X (con frecuencia el cromosoma perdido es el del padre), y su fórmula cromosómica es 45XO (Figura 15) (29). En segundo lugar lo más frecuente es la pérdida parcial de trozos de cromosomas (deleciones), incluso llegando a faltar un brazo completo del cromosoma X, o una mezcla de varios de éstos mecanismos en diferentes células (mosaicismo). En muy raras ocasiones, el cariotipo lleva parte del cromosoma Y (aproximadamente en un 5%), éste es el único caso en el que conviene extirpar las gónadas, por la mayor probabilidad de desarrollar en los restos ováricos (cintillas) un tumor llamado gonadoblastoma.

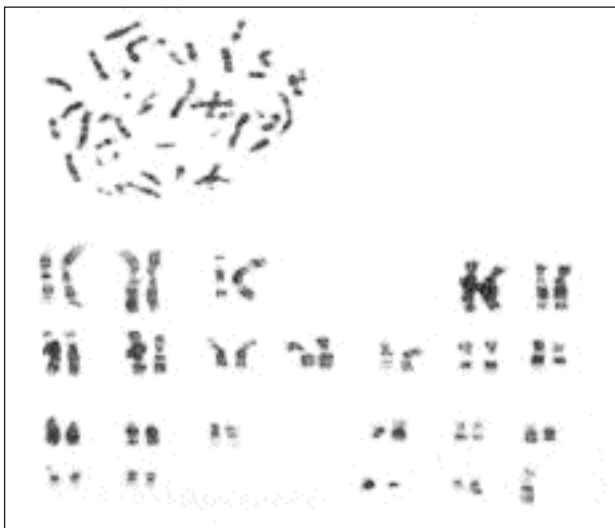


Figura 15

Hay varias fórmulas cromosómicas posibles en el síndrome de Turner (Tabla 4) (28).

Actualmente se cree que nace una niña con Turner por cada 2.500 niñas que nacen.

No se puede dar en varones, ya que éstos únicamente poseen un cromosoma X y si les falta todo o parte de éste cromosoma X, sólo con el cromosoma Y no podrían vivir.

En cuanto al tema del embarazo, en raras ocasiones tienen hijos de forma espontánea. En las pacientes con síndrome de Turner se observa una hipoplasia del ovario. Las células de estas pacientes, como ya hemos visto, se caracterizan por tener 45 cromosomas, 44 autosomas y un cromosoma X. Cuando hay embarazo es porque se trata de un caso de mosaicis-

Tabla 4

<b>monosomía completa</b>	45 X
<b>Monosomía parcial</b>	66Xi (Xq)
Isocromosomas	46,Xi(Xp)
Anillos	46,Xr(X)
Delección	46,X del (Xp)
	66,X del (Xq)
<b>Mosaico</b>	45,X/46/XX
	45X/46,Xi(Xq)
	45,X/46,Xi(Xp)
	45,X/46,Xr(X)
	45,X/46,Xi(Xp)/47, Xi(Xp)i(Xq)
	45,X/46,Xx/27,XXX
	45,X/46,Xr( ) etc

mo cromosómico o líneas celulares 46 XX. Las posibilidades de embarazos de estas mujeres oscila desde el 1% para las que presentan 45 X0 en todas sus células, a un 25% para las que tienen una línea celular 46 XX, a pesar de tener periodos fértiles cortos. De manera global en las mujeres con síndrome de Turner las posibilidades de embarazo se sitúan alrededor del 5%.

La mayor parte de las mujeres con este síndrome, no presentan óvulos en sus ovarios. Por este motivo, en los programas de fecundación "in vitro" debe recurrirse habitualmente a la donación de ovocitos por parte de otra paciente. Adecuadamente preparadas con terapia hormonal sustitutiva, pueden recibir los embriones y llevar a término un embarazo.

Refiriéndonos al modo de herencia, no es un síndrome hereditario. Así, en un próximo embarazo tendremos la misma probabilidad de tener una niña con Turner que la primera vez.

En principio o se tiene Turner o no se tiene.

#### "DGP" DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIM-PLANTACIONAL

**Diagnóstico Prenatal:** si se hace un análisis de cariotipo en células recogidas mediante una amniocentesis o muestras de vellosidades coriales (CVS). Con frecuencia estos estudios son ordenados porque la madre es mayor (lo cual NO es un factor de riesgo para este síndrome). También puede ser descubierto mediante ultrasonografía, si se observan ciertas características como higroma cístico (una acumulación de fluido linfa alrededor del cuello) o defectos del corazón, y un análisis cariotipo prenatal lo confirma. Un aborto espontáneo puede ocurrir si los problemas son severos.



**El Diagnóstico Genético Preimplantacional** que se realiza en estos casos es la selección del sexo, más concretamente una selección de varones, ya que las mujeres son las que padecen el síndrome. En el caso de seleccionar una niña no habría seguridad de que estuviera sana, es decir, que no padezca el síndrome debido a los casos de mosaicismo (unas células son 45X0 y otras normales, 46XX). Esta selección se puede hacer de varias formas, una es por citometría de flujo, que consiste en separar los espermatozoides X de los Y debido a la diferencia en el tamaño de ADN que contienen; la otra técnica es mediante FISH de una de las blastómeras del embrión previamente biopsiada, por fluorescencia, o realizando un análisis de la blastómera mediante PCR. Aconsejan realizar ambas técnicas a la vez, la PCR y el FISH para tener menor margen de error. Todas estas técnicas ya han sido explicadas anteriormente.

Mediante la **PCR** se amplifica el ADN de la blastómera que hemos biopsiado del embrión que queremos analizar. Y consiste en averiguar la presencia o ausencia de, en este caso, los cromosomas X e Y.

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta, pero tiene una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos.

**FISH:** se visualizan los cromosomas sexuales de la blastómera biopsiada mediante fluorescencia. Se lleva a cabo una desnaturalización del centrosoma de los cromosomas y posteriormente una hibridación con sondas específicas de cada tipo de cromosoma unidas a fluorocromos que se ponen de manifiesto al ser excitados en un microscopio de fluorescencia. Actualmente se dispone de sondas de ADN marcadas con fluorocromos de distintos espectros. Concretamente para la selección del sexo como es en este caso se dispone de dos sondas, una para cada cromosoma, para el cromosoma X la sonda está marcada en rojo y para el cromosoma Y la sonda está marcada en azul.

**CITOMETRÍA DE FLUJO:** se basa en la separación de los espermatozoides según su diferencia en la cantidad de ADN total. El cromosoma X contiene un 2,8% más ADN que el cromosoma Y.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Tabitha M. Powledge.:** The Polymerase Chain Reaction.
2. **Cuevas I1, Llácer J1, Ten J2, Mendiola J2, Bernabeu R2.:** 1Instituto Bernabeu. Elche. España. 2Instituto Bernabeu. Alicante. España: "Situación actual de la selección de sexo". Revista Iberoamericana de Fertilidad, Coordinadora Científica de Reproducción Humana.
3. **Harper JC, Coonen E, Ramaekers FC, et al.:** "Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes". Hum Reprod 1994 Apr; 9 (4):721-4.
4. **Munne S, Tang YX, Grifo J, Rosenwaks Z, Cohen J.:** "Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence in situ hybridization". Fertil Steril 1994 Jan; 61(1):111-7.
5. **Fugger EF.:** "Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm". Theriogenology 1999 Dec; 52 (8):1435-40.
6. **Fugger EF, Black SH, Keyvanfar K, Schulman JD.:** "Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection". Hum Reprod 1998 Sep; 13(9):2367-70.
7. **Servicio de Diagnóstico Preimplantacional.:** Protocolo general de DGPI. Instituto Marqués.
8. **SISMER:** "Oocyte and embryo biopsy" Società Italiana Study di Medicina della Riproduzione.
9. Federación Española contra la Fibrosis Quística.
10. **MedlinePlus:** fibrosis quística.
11. <http://www.famma.org/discapacidades/fq.htm>
12. **Dr. A. Bahamonde.:** "Fibrosis quística y embarazo". Jefe clínico. Hospital Maternal Hospital Universitario "La Fe" Valencia.
13. **Feldmann D, Guittard C, Georges MD, Houdayer C, Magnier C, Claustres M, Couderc R.:** "Genetic testing for cystic fibrosis: evaluation of the Elucigene CF20 kit in blood and buccal cells". Laboratoire de biochimie, Hopital A.-Trousseau, 26, avenue du Dr-A.-Netter, 75571 Paris cedex 12.
14. **Goosens V, Sermon K, Lissens W, Rijke M, Saerens B, De De Vos A, Henderix P, Van de Velde H, Platteau P, Van Steirteghem A, Devroey, P and Liebaers, I.:** (2000) "Improving clinical preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis by duplex PCR using two polymorphic markers or one polymorphic marker in combination with the detection of the DeltaF508 mutation". Centre for Medical Genetics and Centre for Reproductive Medicine, University Hospital and Medical School, Dutch-speaking Brussels Free University, Laarbeeklaan 101, 1090 Brussels, Belgium.

15. **Zielenski J, Markiewicz D, Rininsland F, Rommens J. and Tsui L.:** "A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene". *Am. J. Hum. Genet.* 1991 49, 1256-1262.
16. **Dreesen J.C.F.M, Jacobs L.J.A.M, Bras M, Herbergs J, Dumoulin J.C.M, Geraedts J.P.M, Evers J.L.H. and Smeets, H.J.M.:** "Multiplex PCR of polymorphic markers flanking the CFTR gene; a general approach for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis". *Mol. Hum. Reprod* 2000, 6, 391-396.
17. **Jaime Kulisevsky.:** Enfermedad de Huntington y Otras Coreas. Enfermedad de Huntington.
18. **<http://www.iqb.es/cromosomas/cromosoma04.htm>**
19. **Sonia Fuentes Luri y Carmen Beviá González.:** Enfermedad de Huntington. Médicos Residentes de 2º año de Medicina Familiar y Comunitaria. Hospital General de Elda (Alicante, ESPAÑA-UE).
20. **Martínez Ibarra Mario G., Herrera Díaz Areli, Martínez Rodríguez Héctor R., et al.:** "Estandarización de un método de diagnóstico molecular para la enfermedad de core de Huntington". 1Departamento de Genética Molecular, CIBIN IMSS. 2Unidad de manipulación Genética, FCB. UANL. 3Servicio de Neurología, Hospital Universitario UANL. 4Unidad de Genética, Facultad de Medicina UANL. 5HGZ No.17 IMSS.
21. **Genes and disease. NCBI.**
22. **Hironao NUBAME, M.D.:** Tokyo Medical University Department of Paediatrics Genetics Study Group.
23. **B. Loeys1, L. Nuytinck1, P. Van Acker1, et al.:** Strategies for prenatal and preimplantation genetic diagnosis in Marfan Syndrome (MFS).
24. **Malcolm S, Donlon T.:** Report on the second international workshop on human chromosome 15 mapping. 1994. *Cytogenet Cell Genet* 67: 2-14.
25. **Loeys B, Nuytinck L, Delvaux I, De Bie S, De Paepe A.:** Genotype/phenotype analysis in 171 patients referred for molecular analysis of the fibrillin-1 gene (FBN1) because of suspected Marfan syndrome (MFS). *Arch Intern Med* (in press).
26. **MedlinePlus: síndrome X frágil.**
27. **Mila M, Mallotas J.:** Fragile X síndrome: premature ovarian failure. Preimplantation and preconcepción genetic diagnosis. Servicio de Genética, Hospital Clínico, Barcelona, Spain.
28. **Protocolo pre-fraxa de laboratorios ATGen.**
29. **Web de Endocrinología pediátrica. Síndrome de Turner preguntas y respuestas.**
30. **Lic. Marlén Quesada Dorta, Lic. Daisy Bello Álvarez, Dr. Pedro González Fernández y Dr. Eduardo Cabrera Rode.:** Frecuencia de aberraciones cromosómicas en sujetos con gonosomopatías. Experiencia en 19 años de trabajo. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras"
31. **<http://www.tusalud.com.mx/121204.htm>**