



# Genes y enfermedad renal. Generalidades. Genes candidatos

J. C. Rodríguez Pérez<sup>\*,\*\*</sup>, F. Rodríguez Esparragón<sup>\*\*</sup>, M.<sup>a</sup> J. Torres<sup>\*\*</sup> y O. Hernández Perera<sup>\*\*</sup>

\*Nefrología y \*\*Unidad de Investigación. Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín.

## RESUMEN

*La biología molecular ha aportado importantes avances en el conocimiento del origen de enfermedades complejas, deducidas de lo aportado por los estudios epidemiológicos. La epidemiología genética nos permite detectar variantes genéticas relacionadas con la progresión de las enfermedades. En las enfermedades cardiovasculares y renales ésta relación de los factores de riesgo clásicos con los nuevos y las variantes alélicas de aquellos genes candidatos nos va a permitir igualmente identificar la susceptibilidad de cada individuo a una determinada enfermedad. Esto normalmente se realiza a través de estudios casos-controles. Damos más valor a los estudios de asociación que a los estudios de desequilibrio de ligamiento. Se presenta en este trabajo las técnicas más básicas de biología molecular y ejemplos de enfermedades renales monogénicas.*

Palabras clave: **Biología molecular. Gen. Enfermedad renal.**

## SUMMARY

### GENES AND RENAL DISEASE

*Molecular biology techniques have provided important advances in the search for causal relationships in complex diseases supporting traditional epidemiologic studies. Genetic epidemiology allows us to detect genetic variants that could be related to the onset and progression of different diseases. In cardiovascular and renal diseases, this approach linking traditional risk factors to new described ones and those allelic variants, which contribute to the development of these manifestations permits a better understanding of individual disease susceptibility. This is usually afforded through case-control studies evaluating allelic variants of candidate genes previously associated with the disease. Even in this candidate gene search, association-based methods are more powerful than linkage studies in complex traits if we assume that some of the typed polymorphisms are causative although with subtle phenotypic effects. Some brief examples may illustrate the progress in the understanding of renal and cardiovascular diseases.*

Key words: **Molecular biology. Gene. Renal disease.**

**Correspondencia:** Dr. José Carlos Rodríguez Pérez  
Unidad de Investigación  
Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín  
Bco. La Ballena, s/n.  
35020 Las Palmas de Gran Canaria  
E-mail: jcrodrig@invest.hpino.rcanaria.es

## EL GENOMA HUMANO

El genoma es el material genético característico de una especie. El genoma humano se compone de 23 pares de moléculas de DNA, que conforman las estructuras que denominamos cromosomas, localizadas en el núcleo celular. Además, existe una pequeña molécula de DNA en las mitocondrias, que contiene algunos genes esenciales, relacionados con el metabolismo oxidativo. Este DNA mitocondrial tiene un origen evolutivo y una forma de herencia muy distintos a los del nuclear. Se ha calculado que el genoma humano (constituido por el conjunto del ADN localizado en los 23 cromosomas de cada célula) consta de 3.000 millones de bases y que codifica entre 30.000 y 100.000 productos génicos.

### El gen

La palabra genoma contiene la raíz griega «gen», que significa origen. El término «gen» aplicado a la herencia fue acuñado en 1909 para designar a las unidades de herencia asociadas a un carácter transmisible específico. Previamente, los genes habían recibido varios nombres como «elementos» (Mendel, 1866), «unidades fisiológicas» o «factor unidad».

El concepto de gen ha ido cambiando a medida que se ha ido avanzando en su conocimiento. Una definición actual y amplia sería «secuencia de información que da lugar a un producto funcional». Normalmente se sobreentiende por gen una secuencia de DNA, con todos sus elementos reguladores, que da lugar a una proteína o un RNA. Puede existir en formas alternativas que determinan la expresión de características distintas. Estas formas se denominan alelos.

El gen es una entidad estable, pero sujeta a cambios ocasionales en la secuencia llamados mutaciones. Cuando tiene lugar una mutación, la nueva forma del gen continúa heredándose de forma estable. Las mutaciones pueden producirse debido a radiaciones (la UV y las radiaciones ionizantes) o a sustancias como colorantes o drogas. Este tipo de daño en el DNA puede producir transformación de células en cultivo y cáncer en los animales.

Un cambio en la secuencia del DNA implica otro en la proteína, y los efectos van a depender de la función de dicha proteína en el organismo: pueden variar desde ser indetectables a ser letales, dependiendo de la parte de la molécula que resulte afectada. Un ejemplo clásico de mutación que produce una interferencia considerable en una vía metabólica es la fenilcetonuria, debido a la ausencia de la enzima que convierte la fenilalanina en tirosina. La

consecuencia es la conversión de la fenilalanina acumulada a ácido fenil-pirúvico, tóxico.

## LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

A nivel químico, el genoma está constituido por el tipo de macromolécula que llamamos ácido nucleico, compuesto de cuatro subunidades distintas, que se unen entre sí para formar secuencias lineales o cadenas. Estas subunidades, los nucleótidos, están formados a su vez por tres tipos de moléculas: una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. Un nucleósido es un nucleótido sin el grupo fosfato.

La pentosa (un azúcar de cinco carbonos) puede ser ribosa o desoxiribosa. La diferencia está en el grupo hidroxilo del C'2. Las bases nitrogenadas son adenina (A), timina (T), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U).

Los nucleótidos también se encuentran como moléculas independientes en la célula, funcionando como «monedas energéticas», ya que los enlaces de los grupos fosfato liberan mucha energía al romperse. Pueden presentar uno, dos o tres grupos fosfato. Se nombran atendiendo a la pentosa, la base nitrogenada y el número de grupos fosfato que presentan, por ejemplo: adenosina trifosfato (ATP), deoxicitosina monofosfato (dCMP), etc.

En los ácidos nucleicos, la base nitrogenada se une a la pentosa por el C1' de ésta, mientras que el grupo fosfato se une al C5'. Un nucleótido se une al otro al conectar su C5' con el C3' del siguiente, a través del grupo fosfato. De esta forma, en una cadena queda un nucleótido a un extremo con su C5' libre, mientras que en el otro extremo el último nucleótido tiene libre su C3'. Por convenio, la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico se da siempre en dirección 5' a 3'.

### Estructura del ADN

Es la molécula que contiene toda la información necesaria para la vida de un organismo. Su pentosa es desoxiribosa, y las bases nitrogenadas son A, T, G y C. Está constituido por dos cadenas de nucleótidos antiparalelas (una en dirección 5' a 3' y otra en dirección 3' a 5'), unidas entre sí a través de los puentes de hidrógeno que se establecen entre las bases nitrogenadas, que son complementarias dos a dos (A-T y G-C). El emparejamiento de bases es específico, por motivos de forma y tamaño. La molécula de DNA presenta normalmente una estructura típica de doble hélice, además de diversos grados de compactamiento.

En términos generales, se conoce como exón una región del DNA que «sale» del núcleo al citoplasma como parte de una molécula de RNA, es decir, una secuencia codificadora, ya sea de una proteína o de un RNA no mensajero. Por contra, un intrón es una secuencia que no va a ser transcrita. Puede contener secuencias reguladoras como promotores de transcripción, etc.

La secuencia de nucleótidos en el DNA especifica el orden de los aminoácidos en las proteínas celulares. Un aminoácido está codificado por tres nucleótidos adyacentes. A estas tripletas de nucleótidos se las denomina codones. Otras regiones del DNA contienen la información necesaria para regular la síntesis de los productos génicos.

Watson y Crick avanzaron hace cuarenta años que las dos cadenas que constituyen cada molécula de ADN se enrollan entre sí adquiriendo una configuración final de doble hélice.

Ello es posible porque entre las bases de cada polímero se forman parejas de bases complementarias. Cada pareja está constituida por la unión, a través de puentes de hidrógeno, de la adenina de un polímero con la timina del otro y de la guanina de un polímero con la citosina del otro.

Un gen representa la secuencia completa de bases de ADN que especifica la secuencia de aminoácidos de una única cadena polipeptídica o de una molécula proteica. Ello significa que en el ADN un gen consiste en un número variable de exones y de los intrones entre ellos intercalados.

### El ácido ribonucleico (RNA)

Se diferencia del anterior en la pentosa, que en este caso es ribosa, y en una de las bases nitrogenadas: U en lugar de T. Además, consta normalmente de una sola hebra. Hay varios tipos de RNA, con distintas estructuras y funciones.

El denominado RNA mensajero (mRNA), es uno de los intermediarios en la síntesis de proteínas. Esta molécula, monocatenaria y lineal, se sintetiza a partir de una de las hebras del DNA. Es, por tanto una copia de la información contenida en el genoma, que va a ser utilizada como «molde» para la «fabricación» de la proteína correspondiente.

### Del gen a la proteína

Para que la información contenida en el DNA pueda dar lugar a una proteína, es decir, para que un gen se exprese, es preciso pasarla en primer lugar

a RNA. A este proceso se le llama transcripción, y tiene lugar a partir de la cadena de DNA con orientación 3' a 5'.

El RNA así obtenido, denominado heterogéneo nuclear, ha de ser modificado para llegar al mRNA que servirá de molde en la síntesis proteica: eliminación de intrones («splicing») y adenilación del extremo 3'. Este mRNA pasa al citoplasma, concretamente a los ribosomas, donde tendrá lugar el proceso de traducción, es decir, la síntesis de la proteína.

Durante la transcripción, los nucleótidos del ARN se van alineando a lo largo de uno de los polímeros del ADN que sirve como molde del ARN siguiendo las reglas del emparejamiento de las bases. Así, la adenina del ADN se empareja con la uridina del ARN, la citosina se empareja con la guanina, la timina con la adenina y la guanina con la citosina. Los nucleótidos se unen entre sí por acción de una enzima con varios componentes: la ARN polimerasa de tipo II. Un componente inicia la transcripción cuando reconoce en el ADN una secuencia específica de nucleótidos (denominada señal de iniciación), otro componente realiza la adición sucesiva de nucleótidos (elongación de la cadena de ARN) y otro componente finaliza la transcripción cuando reconoce otra secuencia específica en el ADN (denominada señal de terminación). Finalmente, el ARN transcrito y la ARN polimerasa se separan del ADN.

Hay que señalar que la transcripción del ADN da lugar a una copia fiel de toda la secuencia génica; así, en el ARN transcrito también alternan los exones y los intrones. Pero el ARN transcrito, antes de salir al citoplasma es sometido en el núcleo a un procesamiento que elimina los intrones y posibilita que los exones se agrupen para formar un solo gen continuo. De esta manera, el ARN transcrito resultante constituye el molde necesario para la traducción en forma de secuencia de aminoácidos de una proteína. Este es el ARN denominado ARN mensajero.

El ARN mensajero abandona el núcleo y penetra en el citoplasma, donde se asocia a los ribosomas, que son grandes complejos de ARN (ARN ribosómico) y proteínas. Una vez en ellos, la síntesis tiene lugar mediante la participación de otro tipo de ARN, (denominado ARN de transferencia o translación) unido específicamente a cada uno de los 20 aminoácidos existentes en las células. Cada ARN de transferencia contiene un triplete de bases complementarias de las existentes en un codón específico del ARN mensajero. Las moléculas del ARN de transferencia, con su aminoácido correspondiente se alinean a lo largo de la molécula del

ARN mensajero en el orden preciso dictado por la secuencia de codones de éste. Por la acción de ciertas enzimas citoplásmicas (aminoacil transferasas) se forman enlaces peptídicos entre los diversos aminoácidos, y la cadena polipeptídica o la proteína completa así formadas se desprenden del ribosoma.

## AISLAMIENTO DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

### Extracción de DNA

El aislamiento de DNA total se realiza por una lisis previa con ayuda de EDTA (quelante de cationes divalentes), para desestabilizar las membranas e inhibir las DNAsas, y un detergente que produce finalmente la lisis de la membrana citoplasmática (SDS).

El lisado resultante, además de DNA, contiene otras muchas moléculas que deben ser eliminadas. Generalmente se comienza por una digestión de las proteínas con proteinasa k, seguida de un paso de purificación con fenol-cloroformo: los lípidos quedan en el fenol, los ácidos nucleicos en la fase acuosa y las proteínas en la interfase. El cloroformo contribuye a retirar todo el fenol de la fase acuosa. El RNA se elimina con ribonucleasa, y finalmente se precipita el DNA con etanol.

Existen métodos rápidos de extracción de DNA que pueden ser utilizados si no se requiere un DNA de gran pureza, por ejemplo, para amplificar. Estos protocolos suelen basarse en una lisis y digestión de proteínas..., sin pasos de purificación.

El producto habitual de una extracción de DNA cromosómico son fragmentos lineales de un tamaño que oscila entre veinte y unos cientos de kilobases. Esto se debe a que los cromosomas son muy frágiles y están sujetos a degradación por agentes mecánicos (manipulación) y químicos (nucleasas).

### Extracción de RNA

El RNA se degrada con mucha facilidad, por lo que su aislamiento requiere un cuidado especial. Los métodos más utilizados consisten en la lisis de células con detergentes (Tritón X-100, NP-40, SDS) en presencia de compuestos que inactiven las RNAsas, como el tiocianato de guanidina, EDTA y 2-mercaptoetanol. Las RNAsas son enzimas excepcionalmente estables (algunas resisten incluso 100 °C), y evitar su actividad es el objetivo principal cuando se trata de obtener RNA.

El RNA se separa del DNA aprovechando ciertas diferencias físico-químicas. Los métodos más comunes de purificación son los siguientes:

- Centrifugación en gradiente de cloruro de cesio: El RNA es más denso que el DNA cromosómico.

- Extracciones con fenol-cloroformo en medio ácido: El RNA queda en la fase acuosa y el DNA en la interfase.

- Precipitación diferencial con cloruro de litio 3M: el DNA no precipita en esta concentración de la sal de litio, mientras que el RNA sí.

- El mRNA eucariótico lleva una cola de poli-A, lo que se aprovecha para su purificación empleando columnas de cromatografía de afinidad a base de oligo-dT, o bien oligo-dU.

### Síntesis de cDNA (retrotranscripción)

Constituye un paso previo indispensable en muchas técnicas de genética molecular. Consiste en la obtención de un DNA copia a partir de un mRNA, el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas DNA polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas.

Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan RNA como genoma, en vez de DNA. Para poder expresar sus proteínas, han de pasar la información a DNA. Algunas de las transcriptasas inversas utilizadas son la AMV-RT (avian myeloblastosis virus) y la M-MLV-RT (moloney-murine leukaemia virus).

El método clásico de síntesis de cDNA utiliza un oligo-dT como «primer», en el caso de mRNA poliadenilado. El oligo-dT se une al extremo 3' del RNA, marcando el punto de iniciación de la síntesis. En el caso de los mRNA sin cola de poli-A, se pueden utilizar los llamados «random hexameric primers», constituidos por seis nucleótidos, que se unen de forma aleatoria a puntos internos de la molécula de RNA.

Una vez sintetizada la primera cadena de DNA, tenemos un híbrido RNA-DNA. Podemos parar aquí o seguir el proceso hasta obtener sólo moléculas de DNA, monocatenario o bicatenario. Para eliminar la hebra de RNA se utiliza la RNasa H, con lo que obtenemos DNA monocatenario. Con la DNA pol I se continúa la síntesis hasta la doble cadena de DNA, utilizando en este caso como «primer» una horquilla que se forma en el extremo 3'. Para terminar, se crean extremos romos con la T4 DNA pol. La horquilla se elimina con nucleasa S1.

El cDNA así obtenido puede ser utilizado con distintos objetivos: clonación, estudio de secuencias proteicas, nivel de expresión de un gen concreto en un momento determinado, etc.

## SEPARACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### Electroforesis

La electroforesis en gel se ha convertido en la técnica más utilizada para la separación de moléculas de ácidos nucleicos. Un campo eléctrico, con un extremo positivo y otro negativo, permite la separación de fragmentos de DNA en bandas características, en función de su tamaño y movilidad. El DNA, al estar cargado negativamente, migra del polo negativo hacia el positivo.

Los soportes más utilizados en este procedimiento son la agarosa y la poli(acrilamida). Su elección depende del tamaño de las moléculas a separar y del grado de resolución que queramos obtener (diferenciación de bandas de tamaño parecido).

La agarosa es un polisacárido que se obtiene de algas marinas. Al sufrir un cambio de estado (no es una polimerización), forma geles con rigidez suficiente para ser manipulados a partir de un 0,2%. Para formar los geles, la agarosa sólida es disuelta en un tampón por calentamiento. La poli(acrilamida) es una mezcla de dos polímeros sintéticos, la acrilamida y la bis-acrilamida. En este caso sí se da una reacción de polimerización.

La movilidad de los ácidos nucleicos en los geles puede considerarse dependiente de varios factores:

- El efecto tamiz de las fibras del gel: el tamaño de los poros de la malla depende de la concentración de agarosa o poli(acrilamida). En términos generales, a mayor concentración, mayor resistencia al avance de la muestra.
- El tamaño de las bandas: las bandas pequeñas migran más rápidamente.
- La configuración tridimensional del DNA: el DNA compacto y superenrollado migra con mayor rapidez que el circular abierto, mientras que el lineal tiene una velocidad distinta.

Las bandas de un gel pueden ser visualizadas mediante el bromuro de etidio, un colorante que se intercala entre las bases del DNA. El bromuro de etidio se hace visible al iluminarlo con luz ultravioleta dando un color rosa-naranja a la banda de DNA.

La electroforesis puede ser utilizada para determinar el tamaño de las moléculas de DNA de un determinado experimento utilizando un patrón de fragmentos de peso molecular conocido, como por ejemplo, DNA de un fago cortado con una enzima de restricción.

También la concentración de un DNA puede ser estimada por electroforesis si comparamos la intensidad de las bandas teñidas con bromuro de etidio con las de un patrón de concentración conocida (por densitometría).

La separación de moléculas muy grandes es posible gracias a técnicas como la electroforesis de campo alternante (PFGE, «pulsed field gel electrophoresis»), en la que cambia la orientación del campo eléctrico durante la separación. Este tipo de técnicas permite separar moléculas de hasta 6.000 kb, el tamaño de los cromosomas eucarióticos más pequeños.

### Espectrofotometría

Está basada en la capacidad de las distintas sustancias para absorber luz. Cada fracción celular absorbe un máximo de luz a una determinada longitud de onda, lo que se utiliza para cuantificar. Un espectrofotómetro hace pasar un haz de luz de una única longitud de onda a través de una cubeta de dimensiones determinadas. La absorbancia medida (también llamada densidad óptica), está en relación con la concentración de la sustancia.

Los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260 nm, aunque un RNA o DNA monocatenario tienen mayor capacidad de absorción que un DNA bicatenario. Una absorbancia de uno, medida en una cubeta (de cuarzo) de 1 cm<sup>2</sup> de sección, equivale a 50 µg/ml de DNA ya 40 µg/ml de RNA.

Para hacerse una idea del grado de pureza de un ácido nucleico se comparan la absorbancia a 260 y 280 nm (máximo de absorbancia de las proteínas). El valor del cociente entre ambas proporciona la siguiente información:

$A_{260}/A_{280} = 1,65-1,85$ : óptima para DNA bicatenario.

$A_{260}/A_{280} = 2$ : óptima para RNA.

$A_{260}/A_{280} < 1,65$ : contaminación con proteínas.

### PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de DNA. Se ha convertido en poco tiempo en una de las técnicas más ampliamente utilizadas de la Biología Molecular, por una razón: es una forma simple y rápida de obtener cantidades de DNA del orden de microgramos, a partir de otras muy pequeñas.

Hasta la fecha han sido descritas muchas variantes del procedimiento básico, aplicadas a distintas disciplinas. En medicina, concretamente, la PCR ha tenido un mayor impacto en:

- el diagnóstico y *screening* de enfermedades genéticas y cáncer;
- la detección rápida de microorganismos y virus fastidiosos o de lento crecimiento (micobacterias, HIV);

- la detección de enfermedad mínima residual en leucemia;
- el tipaje de antígenos de histocompatibilidad;
- patología forense, y
- biología de la evolución.

En la mayoría de los laboratorios de biología molecular, la PCR es una técnica rutinaria de carácter preparativo para otros procedimientos. No existe un protocolo único para todas las situaciones. Cada aplicación requiere la optimización de la técnica teniendo en cuenta los parámetros que influyen en la especificidad y cantidad del producto deseado.

El método de PCR fue desarrollado a mediados de los años 80, aunque el principio había sido descrito una década antes. Está basado en la síntesis de una hebra complementaria de DNA, utilizando una cadena simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de DNA (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o «primers» se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, pero uno en cada una de las cadenas del DNA.

Los requerimientos de la reacción son simples: deoxinucleótidos (dNTPs) que proporcionan tanto la energía como las unidades de la síntesis, una polimerasa de DNA, cebadores, el DNA molde y un tampón que contenga magnesio.

El proceso básico se desarrolla en tres pasos:

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del DNA.
- Apareamiento o «annealing»: unión de los «primers» a sus secuencias complementarias. Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del «primer» respectivo.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del DNA, hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial.

En teoría, la amplificación de secuencias no deseadas es mínima. En la práctica, a menudo se producen amplificaciones inespecíficas, principalmente debido a «annealing» incorrectos, entre los «primers» y el molde, o entre los «primers» entre sí (esto último da lugar a las estructuras llamadas «primers-dimers»). Es muy recomendable preparar en frío la mezcla de reacción y comenzar la PCR lo más rápidamente posible para evitar esta clase de problemas. Asimismo, es fundamental observar las máximas precauciones para evitar contaminaciones durante la manipulación de las muestras.

En un principio, la PCR se realizaba manualmente, y con una enzima que no resistía la temperatura de desnaturalización, por lo que tenía que ser añadida en cada nuevo ciclo. Finalmente se pudo

disponer de una polimerasa termoestable, procedente de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq pol), y se fabricaron las primeras «máquinas de PCR».

Los primeros termocicladores eran robots que movían una gradilla de tubos entre varios baños termostáticos a tiempos preestablecidos. Los actuales constan, básicamente, de un bloque de metal que puede ser calentado o enfriado, con posibilidad de programar las temperaturas y los tiempos.

Factores decisivos en la calidad de la amplificación son la estabilidad de las temperaturas de incubación y la rapidez en el paso de una temperatura a otra. También es importante que el termociclador pueda mantener las muestras a 4 °C una vez terminada la PCR.

## MODIFICACIONES DE LA PCR

### «RT-PCR»

Se denomina así a la PCR en la que se realiza un paso previo con una transcriptasa inversa, por partir de una muestra de RNA.

### «Nested-PCR»

Consiste en dos procesos de amplificación sucesivos, de forma que en la segunda PCR se utilizan unos «primers» contenidos en la secuencia amplificada en la primera reacción. Es decir, el producto de amplificación de la primera PCR es el molde de la segunda. Se aplica cuando se quiere mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica, especialmente en el caso de muestras de baja calidad o con un pequeño número de copias de la secuencia a amplificar.

### «Hot-PCR»

En esta variante, uno de los «primers» está marcado radiactivamente, lo que aumenta enormemente la sensibilidad de la técnica, al obtenerse un producto también marcado. El marcaje del «primer» se realiza con polinucleótido kinasa y ATP marcado con P<sup>32</sup>.

### «Hot start-PCR»

Las reacciones inespecíficas de amplificación suelen ocurrir en gran parte durante la preparación de la mezcla de reacción, o mientras el termociclador alcanza la temperatura de desnaturalización inicial. La «Hot start-PCR» minimiza estos efectos, mediante la limitación de la disponibilidad de un compo-

nente esencial de la reacción, hasta que se alcanza una temperatura elevada (generalmente > 60 °C).

Existen varios métodos para realizar esto:

- Técnicas manuales: no añadir en la mezcla de reacción alguno de los componentes críticos (magnesio, polimerasa) hasta que la temperatura ha aumentado.
- Introducir algún tipo de barrera física para separar un componente crítico del DNA y los «primers».
- Inactivación reversible de la polimerasa: se utiliza un anticuerpo que bloquea el dominio de unión al DNA de la polimerasa. Al calentar, el anticuerpo se disocia, restableciéndose la actividad de la enzima.

### PCR múltiple

En ella se utilizan varios pares de «primers» específicos para distintas dianas en la misma reacción.

### «ARMS-PCR»

Este sistema («amplification refractory mutation system») utiliza «primers» con desapareamiento en el extremo 3' y una polimerasa sin actividad exonucleasa 3'-5', para detectar mutaciones puntuales. Como la extensión de un «primer» depende del emparejamiento estable de su extremo 3', estos cebadores demuestran la existencia de secuencias que no pueden ser amplificadas sino con los «primers» que contienen la mutación.

### PCR cuantitativa

La PCR es una técnica muy valiosa para el estudio del nivel de expresión de un gen determinado, ya que permite estimar la cantidad de un mRNA concreto en una determinada muestra. A pesar de que la cantidad del producto de una PCR es im-

predecible, hay métodos descritos para la cuantificación.

Una de las aproximaciones utiliza una secuencia estándar como control, perteneciente a un gen constitutivo (por ejemplo, la actina), que coamplifica con el producto a cuantificar. La diferencia en la intensidad de las bandas da una idea de cuánto más o menos se expresa el gen X en comparación con el control. No es una cuantificación en sentido estricto.

Otra posibilidad que ofrece más información consiste en coamplificar diluciones seriadas de un DNA de concentración conocida, con una cantidad constante de la muestra a cuantificar. Los dos DNAs compiten por los «primers», y en la reacción en la que la cantidad de ambas dianas coincide, las bandas tendrán la misma intensidad.

## GENES Y ENFERMEDAD RENAL

### Genes Candidatos

- Enfermedades monogénicas.
- Enfermedades poligénicas.

### Enfermedades monogénicas

- Enfermedad poliquística renal: formas autosómicas y recesivas.
- S. De Alport.
- T. De Wilms.
- GESFS familiar: alfa-Actn4.
- Formas de hipertensión arterial.

### ADPKD

PKD: 1/1.000, penetrancia 100%.

PKD1: 85-95% de los casos, Cr. 16p.

PKD2: 15% de los casos Cr. 4q.

PKD1: constituye la forma más severa aunque fenotípicamente indistinguible de PKD2.

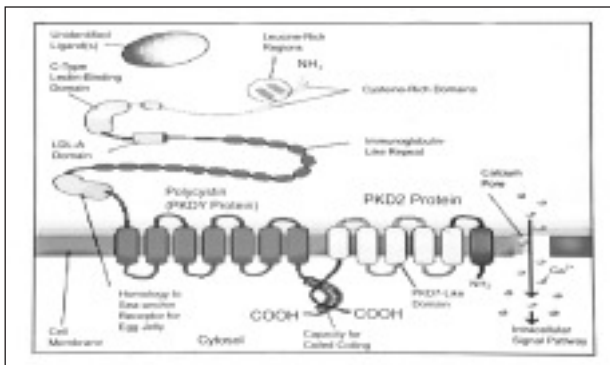


Fig. 1.—Poliquistosis renal autosómica dominante. Proteína PKD1 y PKD2.

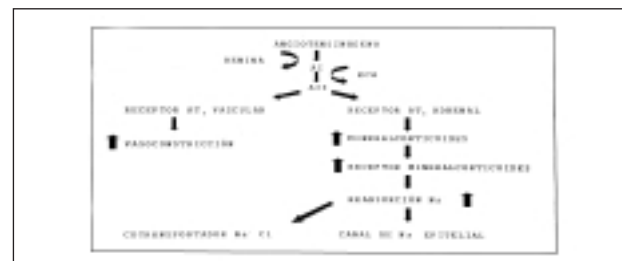


Fig. 2.—Síndrome de Alport. Genes COL4 A1-6.

### La búsqueda de PKD1

El esfuerzo comenzó con la búsqueda de genotipos ligados (coheredados) con la enfermedad. Si se utilizan un número suficiente de personas y un gran número de marcadores que muestren un ligamiento de más del 99% con la enfermedad, se puede determinar en  $\approx 10^6$  nucleótidos su posición en un cromosoma (fig. 1).

Mutaciones caracterizadas: sustituciones de nucleótidos, deleciones, duplicaciones. El fenómeno implica dos etapas, el paso limitante es la inactivación del alelo normal tras una mutación somática o adquirida.

PKD1 funciona como un gen supresor de tumores. El Knock-out de un alelo es tolerable pero la inactivación del segundo no lo es. En términos moleculares, la enfermedad renal autosómica dominante es, en realidad, un desorden recesivo.

### SÍNDROME DE ALPORT

Nefritis hereditaria: hematuria, proteinuria y sordera neurosensorial. Trastornos oculares y de plaquetas. Adelgazamiento de la MBG. Herencia: ligada al X, pero también autosómicas. Defecto en el gen que codifica Colágeno IV (mutaciones en las  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$ , posteriormente  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 6$ ). Genes COL4 A1-6 (chr 13, 2 y X).

### GEFS familiar

Familia de las Islas Canarias (Las Palmas) dando un mapeo genómico idéntico en el cromosoma 19q (19q13). Marcador D19S191 (lod score 4,44: 95% penetrancia).

Familia de Oklahoma: cromosoma 19q13. Familia de California: cromosoma 19q13.

Una vez realizado el estudio con el gen del Síndrome. Nefrótico congénito y fallado nos decidimos por otros genes que codificasen componentes glomerulares. Uno de ellos fue el gen de la  $\alpha$ -actinina-4 (ACTN4).

Se realizaron análisis mutacionales del ACTN4 porque la  $\alpha$ -actinina está muy expresada en los podocitos glomerulares y en enfermedades renales que cursan con síndrome nefrótico en animales.

### TUMOR DE WILMS

Cáncer de riñón con una frecuencia de 1/10.000 niños que se origina en células del blastema meta-

nefrítico. 90% curables por resección del riñón afecto, seguido de RTX o quimioterapia.

Se identificaron inicialmente anomalías citogenéticas: deleción cromosómica en 11p13 y una duplicación en 11p15. Posteriormente se identificó el gen WT1 en el locus cromosómico 11p13. Miller y cols. 1964: Asociación tumor de Wilms y aniridia. Asociación con la afectación «WAGR» (wilms, aniridia, genito urinary malformations, mental retardation) WT1 y Pax6.

WT1 es un gen supresor de tumores, se trata de un factor de transcripción que se expresa en el desarrollo del riñón. WT1 es un gen de 50Kb (10 exones) que presenta dos sitios de *splice* insertados de forma variable en el transcrito de forma que se originan cuatro isoformas distintas que se expresan en proporción constante.

Dianas:

EGR1 (early growth response 1).

IGF-II (insulin like growth factor II) PDGF-A.

Pax2.

GM-CSF.

### GENES E HTA

Ver figuras 3, 4 y 5.

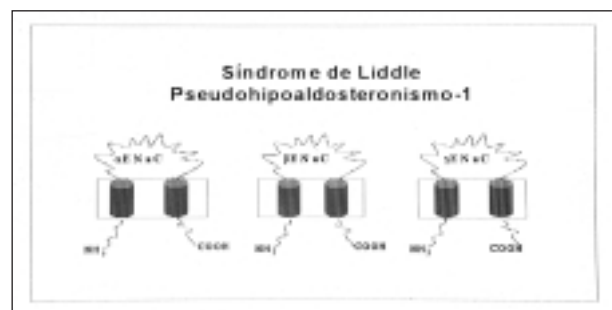


Fig. 3.—Receptor AT1 adrenal.

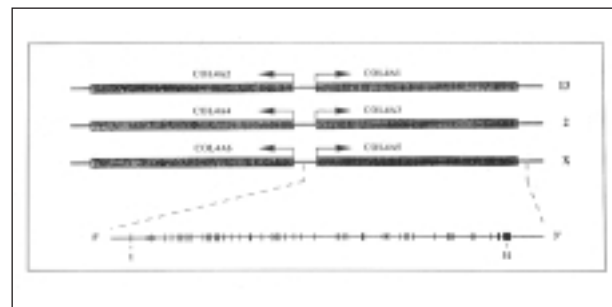


Fig. 4.—Receptor AT1 adrenal y formas genéticas de HTA.



