

APORTACIONES DE LA GENÉTICA MOLECULAR AL ESTUDIO DE LA PATOLOGÍA RESPIRATORIA

M. Baiget y E. Tizzano

Unitat de Genética Molecular. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Conceptos básicos en genética molecular

Los genes de los organismos superiores están formados por secuencias de ADN que codifican la síntesis de una cadena polipeptídica determinada (exones) y por secuencias de ADN no codificantes (intrones) cuya función se desconoce. Estos intrones no están representados en la molécula de ARN-m que dirige la síntesis proteica.

Para el estudio del ADN existen una herramientas indispensables: los enzimas de restricción, las sondas genéticas, vectores, etc, y un hecho fundamental: la hibridación de secuencias complementarias de los nucleótidos que forman los ácidos nucleicos. Los enzimas de restricción son endonucleasas que forman parte del mecanismo de defensa bacteriano y cortan la molécula de ADN cuando existe en ella una señal específica que los enzimas reconocen (diana de restricción) (fig. 1). Las sondas genéticas son fragmentos de ADN que se utilizan para la localización de secuencias de ADN de interés y pueden corresponder y por tanto identificar, a un gen conocido –sondas génicas específicas– o bien pueden reconocer una zona del genoma cuya función se desconozca –sondas anónimas.

Las dos cadenas de ADN pueden disociarse y reasociarse *in vitro* por calentamiento y enfriamiento. Según esto, es también posible formar moléculas híbridas ADN/ARN. El proceso de reasociación (hibridación) es altamente específico y en condiciones adecuadas tiene lugar solamente entre hebras de ADN cuyas bases muestren complementariedad. Cuando una sonda determinada encuentra en el ADN en estudio su fragmento complementario, gracias al proceso de hibridación se unirá a él y, si la sonda está marcada, será posible visualizarlo.

En el ADN humano, uno de cada pocos cientos de nucleótidos varía de un individuo a otro, sin que exista una expresión fenotípica de esta variación. Es-

tas diferencias o polimorfismos pueden evidenciarse gracias al empleo de combinaciones adecuadas enzima/sonda, que muestran los cambios individuales en el tamaño de los fragmentos de restricción. La denominación de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (FRLP) responde a estas diferencias y,

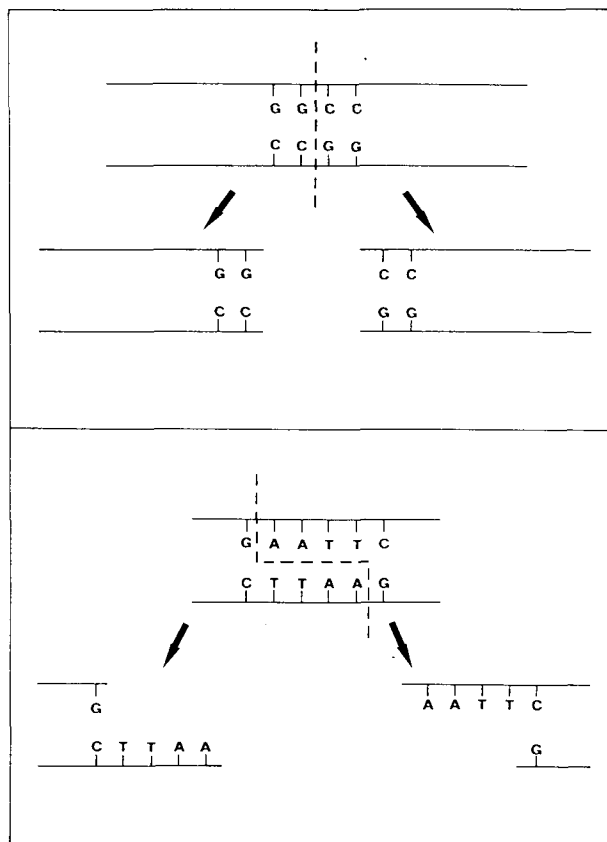


Fig. 1. Mecanismo de acción de los enzimas de restricción. En la parte superior se esquematiza cómo algunos enzimas cortan el ADN en el centro de su diana de restricción. En la parte inferior se esquematiza el modo en que, otros enzimas, cortan el ADN reconociendo en cada una de las hebras de dicha molécula, la diana de restricción.

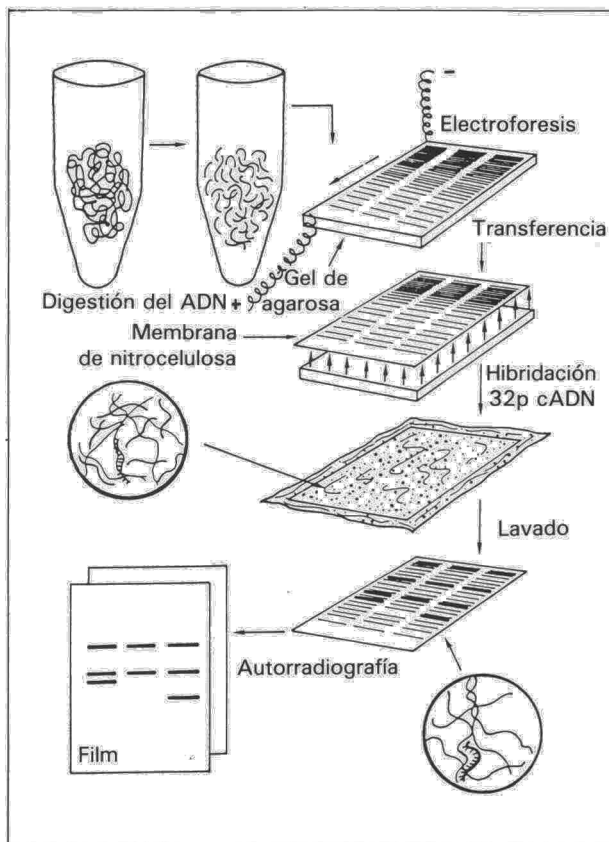
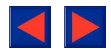


Fig. 2. Esquema del análisis de secuencias de ADN por hibridación con sondas marcadas de los fragmentos transferidos según el método de Southern.

dado que se transmiten con carácter mendeliano, pueden utilizarse como marcadores genéticos. Un marcador genético será, pues, aquel polimorfismo que permita distinguir los diferentes alelos que ocupan un determinado locus en el genoma humano.

Técnicas básicas en el diagnóstico molecular

En el amplio grupo de técnicas útiles en el diagnóstico molecular destacan aquéllas que son capaces de visualizar una porción del genoma (*Southern blotting*) y de amplificar *in vitro* secuencias conocidas (PCR).

La técnica de Southern¹ (fig. 2) consiste en la separación electroforética de los fragmentos de ADN generados tras una reacción con un enzima de restricción, la transferencia de éstos a un soporte sólido (generalmente una membrana de nylon) en el que, posteriormente, se efectúa la hibridación con la sonda marcada con ³²P. La señal radioactiva identifica el fragmento de ADN de interés y puede establecerse la presencia o ausencia de secuencias específicas en una muestra de ADN en estudio. Además, es posible conocer el tamaño de los fragmentos de ADN que se generan y, por lo tanto, estudiar los FRLP.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa² (PCR) es un método capaz de producir una amplificación selectiva de una magnitud de 10⁶ de una

determinada secuencia de ADN, lo que facilita las manipulaciones posteriores. Esta técnica conlleva el uso de dos cebadores oligonucleotídicos que flanquean el fragmento de ADN que se desea amplificar y se basa en el desarrollo de ciclos repetidos de desnaturalización de la doble hebra de ADN por el calor, la unión de los dos cebadores a sus secuencias complementarias y la síntesis de ADN gracias a la acción de una ADN polimerasa. Los cebadores hibridan con las dos hebras de la secuencia de interés y están orientados de modo que la síntesis tiene lugar a través de la región de ADN que los cebadores flanquean, duplicándose así, la cantidad de dicha secuencia de ADN. El hecho de que el ADN sintetizado sea también complementario y capaz de unirse de nuevo a los cebadores, hace que en cada ciclo se duplique la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo anterior. El resultado de esto es una producción exponencial del fragmento de ADN de interés, aproximadamente 2ⁿ, siendo n el número de ciclos (fig. 3).

Aplicación de la genética molecular a la patología respiratoria

El impacto del estudio de la patología respiratoria, basado en los conocimientos de la genética molecular, puede considerarse atendiendo a tres grupos bien diferenciados de enfermedades respiratorias:

1. Enfermedades hereditarias monogénicas
2. Enfermedades infecciosas
3. Enfermedades neoplásicas

En el primer grupo cabría destacar los avances efectuados, tanto en el conocimiento de las bases fisiopatológicas como en la mejora de la capacidad diagnóstica.

En el segundo grupo, los aspectos diagnósticos han sido los más claramente beneficiados por las nuevas técnicas, mientras que en el tercer grupo los progresos más sobresalientes se centran en la mejora del conocimiento de las implicaciones de los cambios genéticos en la transformación neoplásica.

Enfermedades hereditarias monogénicas

Se conoce un buen número de estas entidades en el ámbito de la patología respiratoria, pero a modo de ejemplo consideramos solamente algunos aspectos del déficit de α -1-antitripsina³, de la fibrosis quística de páncreas^{4,5} y de las inmunodeficiencias primarias.

El déficit de α 1-antitripsina (α 1-AT) es una enfermedad hereditaria que se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo. El gen en cuestión se localiza en el brazo largo del cromosoma 14(q31-32,3) y codifica para la síntesis de una glicoproteína de 394 AA que desempeña una función de antiproteasa protegiendo el tejido pulmonar de la acción de una serin proteasa muy activa denominada elastasa.

El gen de la α 1-AT posee siete exones dispuestos en un total de 12,2 kb de ADN, de los cuales solamente cuatro son exones codificantes. Una gran variedad de mutaciones puntuales (cambios de un solo nucleótido)

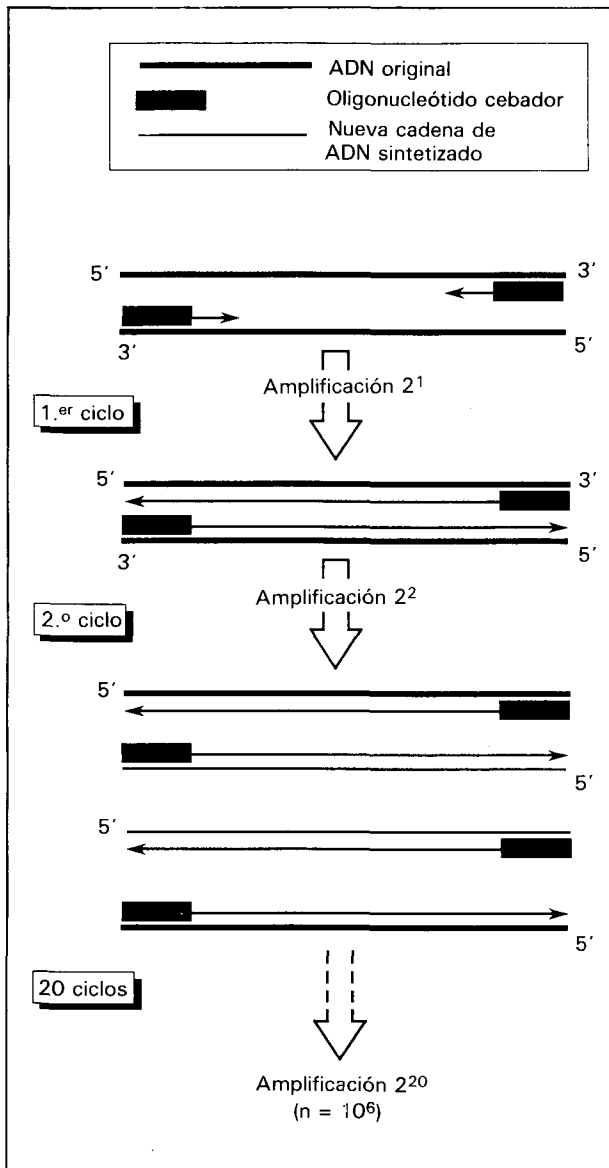
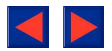


Fig. 3. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las dos hebras de la secuencia de ADN de interés se separan por calentamiento. A continuación, el oligonucleótido que actúa como cebador se une a ambos extremos de dicha secuencia. Gracias a la acción de la ADN polimerasa se sintetiza una nueva cadena de ADN complementaria a la original. Esta a su vez servirá de molde en los ciclos siguientes, obteniéndose al final de la reacción gracias a la amplificación selectiva, una gran cantidad de la secuencia de ADN que se desea analizar.

en dichos exones dan lugar a los distintos alelos que ocupan el locus $\alpha 1$ -AT. La nomenclatura de los más de 70 alelos descritos se basa en letras que corresponden a la posición de la proteína $\alpha 1$ -AT tras la migración en isoelectroenfoque. Cuando dos alelos muestran una movilidad idéntica, se designan además con un número o indicando el lugar de nacimiento del afectado motivo de estudio.

El fenotipo de $\alpha 1$ -AT se detecta mediante una determinación sérica del nivel de la proteína en el caso

índice y en sus familiares y con el estudio del patrón en isoelectroenfoque de la misma.

El genotipo de $\alpha 1$ -AT puede determinarse en un buen número de casos mediante un análisis directo de la mutación o bien empleando una estrategia indirecta: la asociación de una determinada mutación a un haplotipo (patrón de distintos polimorfismos del ADN situados en la región del locus en estudio).

El análisis directo de las mutaciones puede efectuarse a partir del ADN extraído de las células nucleadas de sangre periférica mediante amplificación (PCR) del exón que posee la mutación e hibridación posterior con una sonda marcada con un radioisótopo. Más recientemente se ha descrito una modificación del método PCR que permite obviar el empleo de radioactividad⁶.

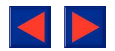
Los distintos alelos $\alpha 1$ -AT pueden clasificarse en: *alelos normales* y *alelos a riesgo*. Los primeros codifican para la síntesis de una cantidad adecuada de proteínas $\alpha 1$ -AT funcionales. Los segundos sitúan al individuo que los posee en forma homocigota en condición de riesgo para desarrollar enfisema, dada la síntesis insuficiente de proteasa.

Se conoce la existencia de 45 alelos normales que representan el 95 % de los alelos $\alpha 1$ -AT de la población caucásica y se admite que todos ellos derivan de un primer alelo ancestral.

En el grupo de los alelos a riesgo, cabe destacar aquellos que conllevan una producción baja de $\alpha 1$ -AT. Los más frecuentes son los alelos Z y S. El individuo homocigoto ZZ solo sintetiza 10-15 % de $\alpha 1$ -AT y posee un riesgo elevado de desarrollar enfisema en el adulto y compromiso hepático neonatal. En el caso de un homocigoto SS, se sintetiza suficiente proteína como para no manifestar la enfermedad, mientras que los individuos SZ poseen un nivel sérico bajo de $\alpha 1$ -AT que hace que un pequeño porcentaje de estos individuos se vea afectado.

En cuanto a nuevas medidas terapéuticas, existen claras evidencias de que el daño tisular se debe a la oxidación de un residuo de metionina de la molécula de $\alpha 1$ -AT que la hace inefectiva como inhibidor de la elastasa leucocitaria. En base a estos hechos se ha desarrollado una alternativa terapéutica basada en la producción de proteína recombinante. El gen $\alpha 1$ -AT se inserta en levadura y mediante una técnica denominada *mutagénesis puntual dirigida* se obtiene un gen mutado que dirige la síntesis de una proteína activa y resistente a la oxidación, puesto que contiene una sustitución metionina-valina en el centro activo de la molécula. Esta $\alpha 1$ -AT recombinante no se administra por vía endovenosa porque su vida media es corta, pero puede administrarse por aerosol.

Otro aspecto a considerar sería el referente a la terapia génica, puesto que desde un punto de vista conceptual, el déficit de $\alpha 1$ -AT es susceptible de ser sometido a manipulación genética. Todo lo que se necesita es disponer de suficientes copias del gen normal para que se sintetice y se excrete al medio la cantidad suficiente de $\alpha 1$ -AT. Insertando dicho gen con los elementos de control genético necesarios en



células que normalmente no expresen $\alpha 1$ -AT (fibroblastos) y trasplantando estas células al receptor, sería posible establecer un número suficiente de células productoras de la proteína en los individuos deficitarios. Al respecto, se han desarrollado con éxito dos modelos animales.

La *fibrosis quística de páncreas* (FQ) o mucoviscidosis es una enfermedad autosómica recesiva grave y frecuente. A pesar de que la atención médica a los pacientes homocigotos ha mejorado sensiblemente en los últimos años, el pronóstico para los mismos continúa siendo pobre.

Desde el punto de vista genético, esta enfermedad representaba un verdadero enigma hasta que, en 1985, se localizó el gen en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31) gracias a los estudios de ligamiento con marcadores del ADN próximos al gen. Estos polimorfismos del ADN, empleados como marcadores, son extraordinariamente útiles para efectuar el diagnóstico de portadores y el diagnóstico prenatal de la enfermedad, a la vez que fueron el punto de partida para abordar el clonaje y la caracterización del gen FQ en el año 1989. Se trata de un gen de 250 kb de longitud, con 24 exones que codifican un ARN-m de 6,5 kb. La proteína en cuestión estaría compuesta de 1480 AA y poseería características similares a las proteínas de membrana. Según el lugar de origen de los pacientes, del 30 al 80 % de los cromosomas FQ poseen la misma anomalía molecular: la ausencia de 3 pares de bases que, en circunstancias normales, codifican para el aminoácido fenilalanina.

El diagnóstico prenatal de FQ se efectuaba en la era pre-ADN, en el segundo trimestre de gestación, mediante dosificación de enzimas microvillares intestinales en el líquido amniótico. Este tipo de diagnóstico pudo adelantarse al primer trimestre cuando se aplicó el análisis de los polimorfismos del ADN al estudio de la FQ; en estos casos era imprescindible el disponer de ADN de un paciente afectado para poder estudiar a su familia y ofrecer la posibilidad de un diagnóstico prenatal. En la actualidad, al conocerse la mutación mayoritaria del gen FQ, no sólo no es condición *sine quae non* el disponer de material genético del paciente para poder estudiar a su familia, sino que además es posible detectar portadores en la población general para identificar parejas a riesgo.

La identificación de la mutación o mutaciones FQ puede ser también útil en el diagnóstico, sobre todo en el período neonatal y en aquellos casos que muestran una clínica y unos resultados del test del sudor dudosos.

A pesar de la mejora de la capacidad diagnóstica aportada por los avances en el conocimiento de la patología molecular del gen FQ, éstos no han tenido aún una repercusión clara en el desarrollo de terapéuticas eficaces.

Si nos situamos en el ámbito de las *inmunodeficiencias primarias*, cabe recordar que la defensa contra los agentes infecciosos implica una interacción compleja de los mecanismos de defensa humoral, celular, sistema complemento y células fagocíticas. Dado que el

tracto respiratorio es un puerta de entrada importante de agentes patógenos, muchas de las inmunodeficiencias se presentan inicialmente con infección respiratoria.

A pesar de que la gran mayoría de los defectos bioquímicos subyacentes a estos trastornos no se conocen, la genética molecular ha dado importantes pasos en la localización, clonaje y tentativa terapéutica en algunos de ellos. En la tabla I se muestra la información molecular disponible para algunas inmunodeficiencias primarias, así como las estrategias empleadas a nivel de diagnóstico de ADN.

Un avance terapéutico a reseñar es la transferencia y expresión del gen de la adenosín deaminasa (ADA) empleando un retrovirus como vector: la molécula de ADN recombinante transferida a fibroblastos de un individuo afectado por la deficiencia enzimática, es capaz de dirigir la síntesis correcta y en cantidad adecuada de la enzima en cuestión¹⁶.

Enfermedades infecciosas

La tecnología de estudio del ADN, ha entrado de lleno en los laboratorios de microbiología, dado que la misma es capaz de brindar un diagnóstico rápido, específico y sensible de las enfermedades infecciosas que afectan el pulmón¹⁷.

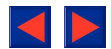
Un ventaja adicional de esta metodología es la capacidad para detectar microorganismos latentes no infecciosos, agentes patógenos que presentan dificultades para desarrollarse en cultivos, micobacterias, virus, *Mycoplasma pneumoniae*, o en situaciones que desnaturalizarían un antígeno proteico¹⁸.

El genoma de los microorganismo contiene además de secuencias de nucleótidos que son comunes a muchos de ellos, secuencias únicas. Es el estudio de estas últimas el que confiere una alta especificidad a estos métodos. Se trata de incluir estas secuencias únicas, bien sea en las sondas o en los cebadores empleados para amplificar por PCR. En ambos casos se identificará con certeza de qué agente causal se trata, aun en

TABLA I
Inmunodeficiencias primarias susceptibles de estudio a nivel de ADN

| Trastorno | Localización cromosómica | Estrategia diagnóstica | Referencia |
|------------------------------------|--------------------------|------------------------|------------|
| Ataxia telangiectásica | 11 q 22-23 | FRLP | 7 |
| Agammaglobulinemia | Xq21,3-q22 | FRLP | 8 |
| Inmunodeficiencia combinada severa | Xq11-q13 | FRLP | 9 |
| Wiskot-Aldrich | Xp11,3 | FRLP | 10 |
| Enfermedad granulomatosa crónica | Xp21,1 | Directo | 11 |
| Déficit de properdina | Xp11,23-21,1 | FRLP | 12 |
| Déficit de adenosín deaminasa | 20q13,11-13,2 | Directo | 13 |
| Síndrome linfoproliferativo | Xq24-27 | FRLP | 14 |
| Hiperinmunoglobulinemia M | Xq24-27 | FRLP | 15 |

FRLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica.



el caso de que se trabaje con muestras biológicas cuyo contenido en agentes patógenos sea extremadamente bajo (homogenados de tejidos, esputos, aspirados bronquiales y gástricos, líquidos tisulares).

El diagnóstico bacteriológico convencional de infección por *Mycobacterium tuberculosis* es un proceso tedioso y largo. El método alternativo que utiliza sondas de ADN específicas conlleva a una sensible mejora, si bien sólo es útil cuando se dispone de gran cantidad de muestra. La amplificación selectiva (PCR) obvia estas limitaciones: se han podido identificar micobacterias en muestra de esputo, aspirado gástrico y biopsia de ganglio linfático de enfermos tuberculosos y en sangre periférica de pacientes con infección por micobacterias y SIDA¹⁹.

Enfermedades neoplásicas

A pesar de que el cáncer de pulmón no se considera una enfermedad genética, existen una serie de evidencias experimentales que demuestran la existencia de cambios genéticos en el proceso de transformación neoplásica de las células del epitelio bronquial²⁰.

Estas lesiones genéticas podrían agruparse en dos apartados distintos:

1) Las capaces de activar la expresión de determinados protooncogenes.

2) Las responsables de la inactivación de genes supresores de tumores.

1) En la génesis de las neoplasias de pulmón se han implicado oncogenes de distintas familias y mecanismos moleculares muy diversos: mutaciones puntuales en oncogenes de la familia ras, alteraciones que conllevan un aumento de la expresión de protooncogenes como el c-myc, N-myc, L-myc y c-myb, etc.

Las proteínas codificadas por estos genes actúan en la parte interna de la membrana celular y se les atribuye una función en la transducción o transmisión de señales celulares. La alteración de un nucleótido en las regiones que codifican del oncogen ras es responsable de la capacidad transformadora de dichos oncogenes.

El oncogen c-myc es quizás uno de los más estudiados, debido a su participación en el linfoma de Burkitt. Hoy se admite también el compromiso del protooncogen c-myc en la patogénesis del cáncer de pulmón de células pequeñas, puesto que se ha demostrado la existencia de un gran número de copias del gen (amplificación) en distintas líneas celulares estudiadas. Se ha establecido también que la amplificación del oncogen c-myc aparece con más frecuencia en células tumorales de pacientes que han recaído tras la quimioterapia que en pacientes que se estudian en el momento del diagnóstico. En el mismo estudio se constata que los pacientes que presentan recaída y en los que el oncogen c-myc está amplificado, tienen una supervivencia más corta que aquellos en los que no existe amplificación. El papel que se le asignaría al oncogen c-myc radicaría en el control de la regulación del crecimiento celular y en la expresión de las alteraciones morfológicas.

2) Los estudios citogenéticos realizados en células tumorales de pulmón han evidenciado un gran número de anomalías tanto numéricas como estructurales. Existe, sin embargo, una anomalía citogenética común a varios tipos celulares del cáncer de pulmón: una pérdida de material genético (delección) en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21). Inicialmente se evidenció sólo en pacientes con cáncer de células pequeñas (CCPP), pero empleando los polimorfismos del ADN de esta zona del cromosoma 3 como marcadores, se ha visto que existe delección en todas las muestras de CCPP y en la mayoría de los otros tumores. Estos datos sugieren que dicha anomalía es un suceso precoz importante en la patogénesis de ambas entidades: en la región delecionada podría existir un antioncogen, cuya pérdida pondría en evidencia una mutación recesiva en un cromosoma 3 citogenéticamente normal. Se ha demostrado que un mecanismo similar es el responsable de la aparición de otros tumores humanos: el tumor de Wilms con una delección localizada en el brazo corto del cromosoma 11²¹ y el retinoblastoma localizado en el brazo largo del cromosoma 13²².

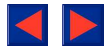
Conclusiones y perspectivas

En los últimos años hemos sido testigos de grandes avances en el campo de la tecnología del ADN recombinante. Ello ha hecho posible la manipulación del material genético para el estudio de fenómenos biológicos fundamentales y de procesos patológicos bien definidos en la práctica clínica. En este sentido se ha iniciado la definición de algunas enfermedades en términos de patología molecular, con una precisión diagnóstica impensable hace unos años. El estudio de la patología respiratoria, al igual que en otras áreas de la medicina, se ha visto beneficiado gracias a estos avances.

Desde un punto de vista teórico, las posibilidades tecnológicas del estudio del genoma son ilimitadas, lo que conlleva un compromiso para los profesionales de la medicina que habrán de ser capaces de enfocar, desde un punto de vista molecular, no sólo las bases fisiopatológicas de las enfermedades sino sus implicaciones diagnósticas y terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98:503-508.
2. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directe enzymatic amplification of DNA with the thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-491.
3. Crystal RG. The $\alpha 1$ -antitrypsin gene and its deficiency states. *TIG* December 1989; 5:411-417.
4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1.066-1.072.
5. Kerem B, Romens JM, Buchanan JA et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1.073-1.080.
6. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:2.503-2.516.



7. Gatti RA, Berket I, Boder E et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988; 336:577-580.
8. Kwan SP, Terwilliger J, Parmley R et al. Identification of a closely linked DNA marker to further refine the X-linked agammaglobulinemia locus. *Genomics* 1990; 6:238-242.
9. Saint Basile G, Arveiler B, Oberlé I et al. Close linkage of the locus for X chromosome-linked severe combined immunodeficiency to polymorphic DNA markers in Xq11-q13. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7576-7579.
10. Saint Basile G, Arveiler B, Fraser NJ et al. Close linkage of hypervariable marker DXS255 to disease locus of Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1989; 11:1.319-1.321.
11. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP et al. Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease-on the basis of its chromosomal location. *Nature* 1986; 322:32-38.
12. Goundis D, Holt SM, Boyd Y, Reid KBM. Localization of the properdin structural locus to Xp11.23-Xp21.1. *Genomics* 1989; 5:56-60.
13. Jhanwar SC, Berkvens TM, Breukel C, van Ormondt H, van der Eb AJ, Meera Khan P. Localization of human adenosine deaminase gene sequences to the q12-q13.11 region of chromosome 20 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 50:168-171.
14. Skare JC, Milunsky A, Byron KS, Sullivan J. Mapping the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2.015-2.018.
15. Mensink EJB, Thompson A, Sandkuyl LA et al. X-linked immunodeficiency with hyperimmunoglobulinemia M appears to be linked to the DXS42 restriction fragment length polymorphism locus. *Hum Genet* 1987; 76:96-99.
16. Palmer TD, Hock RA, Osborne WRA, Miller AD. Efficient retrovirus-mediated transfer and expressions of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from a adenosine deaminase-deficient human. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1987; 84:1.055-1.059.
17. Kinsburg DT. DNA probes in the diagnosis of genetic and infectious diseases. *TIBTECH* 1987; 5:107-111.
18. Hata D, Kuze F, Mochizuki Y et al. Evaluation of DNA probe test for rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J of Pediatrics* 1990; 116:273-276.
19. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989; 11:1.069-1.071.
20. Minna J. Genetic events in the pathogenesis of lung cancer. *Chest* 1989; 96:175-235.
21. Compton D, Weil M, Bonetta L et al. Definition of the limits of the Wilms tumor locus on human chromosome 11p13. *Genomics* 1990; 6:309-315.
22. Dryja TP, Rapaport JM, Joyce J, Petersen RA. Molecular detection of deletion involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:7.391-7.394.