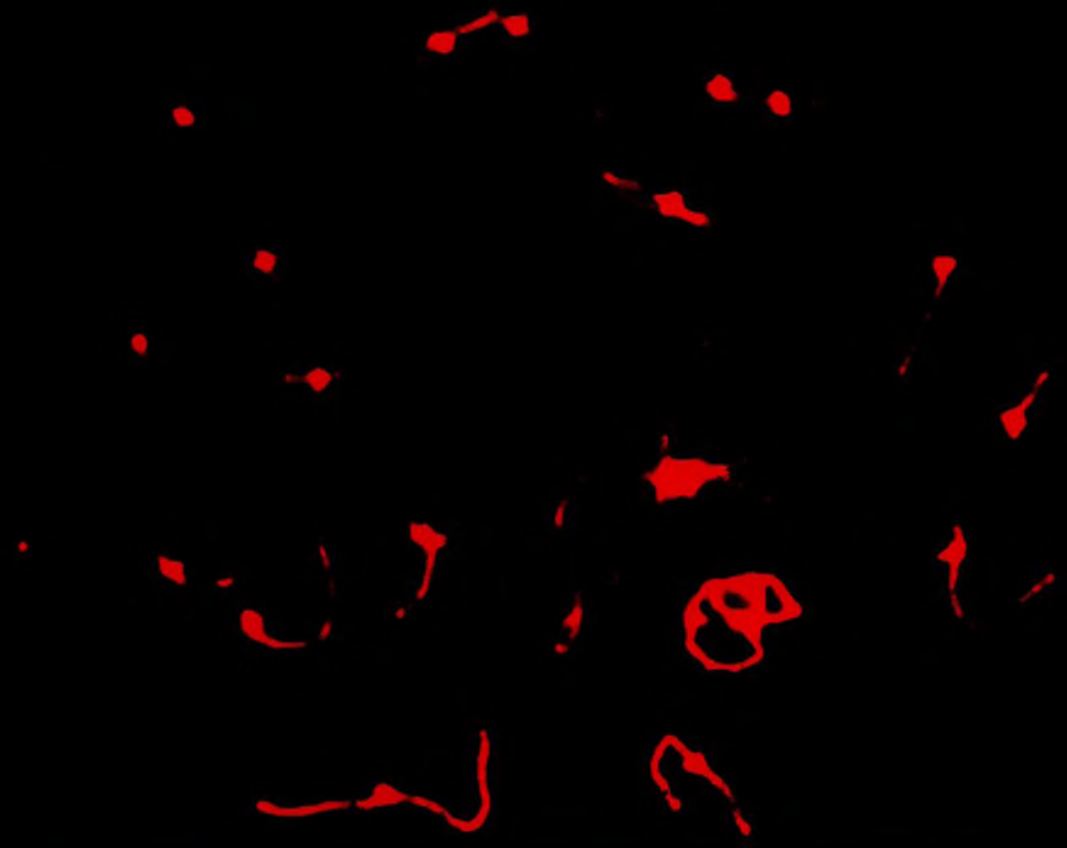
Solari

Genética Humana

Fundamentos y aplicaciones en Medicina

4ª EDICIÓN



EDITORIAL MEDICA
panamericana

Genética Humana

Fundamentos y aplicaciones en Medicina

Genética Humana

Fundamentos y aplicaciones en Medicina

Genética Humana

Fundamentos y aplicaciones en Medicina

4ª EDICIÓN

Alberto Juan Solari

Doctor en Ciencias Médicas
Profesor Emérito de la Facultad de Medicina
de la Universidad de Buenos Aires
Académico Correspondiente de la Academia Nacional de Ciencias
Académico Titular de la Academia en Ciencias de América Latina
Investigador Superior ad-honorem del CONICET
Socio Honorario de la Sociedad Argentina de Genética, Buenos Aires

Con la colaboración de

Martín Roubicek

Médico Genetista, Especialista Universitario en Bioética,
Ex presidente de la Sociedad Argentina de Genética,
Miembro del Comité de Ética del Hospital Privado
de la Comunidad de Mar del Plata

EDITORIAL MEDICA panamericana

BUENOS AIRES - BOGOTÁ CARACAS MADRID MÉXICO PORTO ALEGRE
e-mail. info@medicapanamericana.com
www.medicapanamericana.com

Los editores han hecho todos los esfuerzos para localizar a los poseedores del copyright del material fuente utilizado. Si inadvertidamente hubieran omitido alguno, con gusto harán los arreglos necesarios en la primera oportunidad que se les presente para tal fin.

Gracias por comprar el original. Este libro es producto del esfuerzo de profesionales como usted, o de sus profesores, si usted es estudiante. Tenga en cuenta que fotocopiarlo es una falta de respeto hacia ellos y un robo de sus derechos intelectuales.

Las ciencias de la salud están en permanente cambio. A medida que las nuevas investigaciones y la experiencia clínica amplían nuestro conocimiento, se requieren modificaciones en las modalidades terapéuticas y en los tratamientos farmacológicos. Los autores de esta obra han verificado toda la información con fuentes confiables para asegurarse de que ésta sea completa y acorde con los estándares aceptados en el momento de la publicación. Sin embargo, en vista de la posibilidad de un error humano o de cambios en las ciencias de la salud, ni los autores, ni la editorial o cualquier otra persona implicada en la preparación o la publicación de este trabajo, garantizan que la totalidad de la información aquí contenida sea exacta o completa y no se responsabilizan por errores u omisiones o por los resultados obtenidos del uso de esta información. Se aconseja a los lectores confirmarla con otras fuentes. Por ejemplo, y en particular, se recomienda a los lectores revisar el prospecto de cada fármaco que planean administrar para cerciorarse de que la información contenida en este libro sea correcta y que no se hayan producido cambios en las dosis sugeridas o en las contraindicaciones para su administración. Esta recomendación cobra especial importancia con relación a fármacos nuevos o de uso infrecuente.

Ilustración de tapa: Profase meiótica de un espermatocito humano. Los bivalentes y sus centrómeros (redondeados), se indican en rojo; focos de recombinación (MLH1) en amarillo. Marcación por inmunofluorescencia (véase el capítulo 12).

EDITORIAL MEDICA panamericana

Visite nuestra página web:
http://www.medicapanamericana.com

ARGENTINA
Marcelo T. de Alvear 2145
(C1122AAG) Buenos Aires, Argentina
Tel.. (54-11) 4821-5520 / 2066 / Fax (54-11) 4821 1214
e-mail: info@medicapanamericana.com

COLOMBIA
Carrera 7a A N° 69-19
Bogotá D.C., Colombia
Tel.. (57-1) 345-4508 / 314-5014 /
Fax: (57-1) 314-5015 / 345-0019
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.co

ESPAÑA
Quintanapalla N° 8, Planta 4ª
(28050) Madrid, España
Tel.. (34-91) 1317821 / Fax: (34-91) 4570919
e-mail: info@medicapanamericana.es

MÉXICO
Hegel N° 141, 2° piso
Colonia Chapultepec Morales
Delegación Miguel Hidalgo
C.P 11570 -México D.F.
Tel.. (52-55) 5250-0664 / 5262-9470 / Fax: (52-55) 2624-2827
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.mx

VENEZUELA
Edificio Polar, Torre Oeste, Piso 6, Of. 6 C
Plaza Venezuela, Urbanización Los Caobos,
Parroquia El Recreo, Municipio Libertador, Caracas
Depto. Capital, Venezuela
Tel.. (58-212) 793-2857/6906/5985/1666 Fax: (58-212) 793-5885
e-mail: info@medicapanamericana.com.ve

ISBN: 978-950-06-0269-3

IMPRESO EN LA ARGENTINA

Solari, Alberto Juan
Genética Humana: Fundamentos y aplicaciones en Medicina. 4ª ed. Buenos Aires; Médica Panamericana, 2011
564 p. 24×17 cm

ISBN 978-950-06-0269-3

1 Genética Humana. I. Título
CDD 616.042

Hecho el depósito que dispone la ley 11.723.
Todos los derechos reservados.
Este libro o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos ni archivados en sistemas recuperables, ni transmitidos en ninguna forma o por ningún medio, ya sean mecánicos o electrónicos, fotocopiadoras, grabaciones o cualquier otro, sin el permiso previo de Editorial Médica Panamericana S.A.C.F.

© 2011. EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA S.A.C.F.
Marcelo T. de Alvear 2145 Buenos Aires Argentina

Esta edición se terminó de imprimir
en el mes de marzo de 2011
en los talleres de Latingráfica S.A.
Rocamora 4161, Buenos Aires. Argentina

Índice

Prefacio de la cuarta edición VII

Cap. 1. Desarrollo histórico de la genética humana 1

Cap. 2. Conceptos básicos 15

Cap. 3. Fenómenos básicos y técnicas de genética molecular 39

Cap. 4. El material genético: ADN y cromosomas 59

Cap. 5. Información genética 91

Cap. 6. La organización del genoma humano 117

Cap. 7. Regulación de la expresión génica 137

Cap. 8. Mutación 153

Cap. 9. Patrones de herencia humana 187

Cap. 10. Determinación sexual y cromosomas sexuales 223

Cap. 11. Ligamiento. Genes ligados al sexo y fenómenos de compensación de dosis 255

Cap. 12. Meiosis, recombinación y disyunción. Genética e infertilidad 289

Cap. 13. Enfermedades de herencia multifactorial, enfermedades de origen complejo y otros tipos de herencia 321

Cap. 14. Genética bioquímica. Errores congénitos del metabolismo 347

Cap. 15. Anomalías genéticas de las proteínas estructurales 373

Cap. 16. Genética del desarrollo embrionario y ciliopatías 399

Cap. 17. Cariotipo humano y cromosomopatías 423

Cap. 18. Aberraciones cromosómicas estructurales y síndrome del X frágil 457

Cap. 19. Genética de los tumores 477

Cap. 20. Aspectos éticos, sociales y legales en genética humana 497

Glosario 511

Apéndice 1. Advertencias importantes para adquirir información adicional sobre adelantos en Genética humana y médica a través de internet 535

Apéndice 2. Abreviaturas de los aminoácidos naturales. Nomenclatura internacional de los genes humanos. Reglas de nomenclatura para las mutaciones humanas. Reglas de nomenclatura para citogenética humana 537

Índice analítico 541

Prefacio de la cuarta edición

En esta cuarta edición de nuestra obra *Genética humana* hemos seguido el mismo plan general que existió en las ediciones anteriores: el desarrollo inicial de conceptos básicos, luego el tratamiento de patrones mendelianos ejemplificados en enfermedades paradigmáticas, el tratamiento de los trastornos genéticos de proteínas enzimáticas y de proteínas estructurales, la citogenética y finalmente la genética de los tumores y un capítulo sobre Bioética. El agregado de los nuevos conocimientos aportados desde 2004 nos ha llevado a un cierto aumento del texto en cada capítulo, y este hecho a su vez nos ha planteado cómo mantener el total de esta obra dentro de límites apropiados para el estudiante y para el médico que se inicia en el estudio de la Genética humana.

Por esa razón en esta cuarta edición hemos eliminado el tratamiento de la genética de los tejidos, la genética de la pigmentación, la genética de la piel y la genética de los procesos de balance de la masa corporal y de envejecimiento. Esta limitación está compensada con la descripción de los nuevos adelantos en las técnicas moleculares de la Genética, la nueva apreciación de los ARN no codificantes, los estudios de asociación de enfermedades con marcadores y los adelantos en la comprensión de la patogenia de muchas enfermedades, que incluyen las ciliopatías genéticas, las microdeleciones y la infertilidad genética.

Los temas citados que hemos excluido de esta edición podrán ser el núcleo de una segunda obra, dedicada al estudio de tejidos específicos y procesos, que son de una índole más especializada que los conceptos básicos que están incorporados en esta cuarta edición. Por eso prevemos que una segunda obra *Genética especial* complemente a la presente.

En la presente edición hemos contado con la valiosa colaboración del Dr. Martín Roubicek, médico genetista reconocido y ex presidente de la Sociedad Argentina de Genética. Al doctor Roubicek, así como a mis colaboradores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, Dra. Roberta B. Sciurano, Lic. Mónica Rahn, Lic. M. J Franco y Lic. Cristina O. Deparci, les expreso mi más cálido agradecimiento.

Alberto Juan Solari

Prefacio de la cuarta edición

Dedicatoria

A María Susana

Capítulo 1

Desarrollo histórico de la genética humana

De los "factores" de Mendel al desciframiento del genoma humano

La Genética es la ciencia que estudia los fenómenos de la *herencia* y la *variación*. Estos fenómenos son complejos, y su análisis experimental sólo fue fructífero a partir del momento en que se contó con un marco conceptual adecuado, que fue provisto por el monje austríaco Juan Gregorio Mendel (1822-1884), aunque sus concepciones permanecieron sin uso hasta su redescubrimiento en el año 1900.

La Genética Humana tardó también mucho tiempo en establecerse sobre bases sólidas; tanto es así que recién en 1956 se comprobó fehacientemente el número de cromosomas de la especie humana, que es 46.[1]

Las grandes dificultades que presentaba la especie humana para realizar análisis genéticos (imposibilidad de realizar experimentos de cruzamiento u otros tipos de experimentación, relativamente escaso número de progenie, número de cromosomas relativamente alto, etc.) han sido totalmente superadas en la segunda mitad del siglo XX, para pasar a convertirse, en la actualidad, en una de las especies mejor estudiadas. El adelanto de la Genética Humana ha tomado un enorme impulso con la concreción del Proyecto Genoma Humano que desde el año 1990 se desarrolló en Estados Unidos con la cooperación de muchos institutos de varios países, y cuya culminación, en el año 2003, marca un hito en esta disciplina. Este desarrollo explosivo de la Genética Humana ha tenido repercusiones en múltiples campos, desde el Derecho y la ciencia política hasta la Psicología, pero principalmente ha afectado (y seguirá haciéndolo) el campo de la Medicina. En todas esas áreas existen perspectivas significativas de beneficio, pero también hay posibilidades de confusiones y de perjuicios.

En la coyuntura actual es conveniente realizar una somera recopilación del desarrollo histórico de algunos conceptos de la Genética, antes de pasar a enumerar los principios básicos de la Genética Humana. Este resumen es necesariamente esquemático y resalta sólo algunos de los conceptos básicos, para al mismo tiempo ejemplificarlos con casos concretos e introducir términos genéticos usuales.

El desarrollo histórico de algunos conceptos de la Genética

El trabajo presentado por Mendel en la Sociedad de Ciencias Naturales en Brno (actual República Checa) en 1865 y publicado el año siguiente contiene los postulados teóricos de la Genética, deducidos por Mendel a partir de sus experiencias de hibridación con plantas (fig. 1.1)

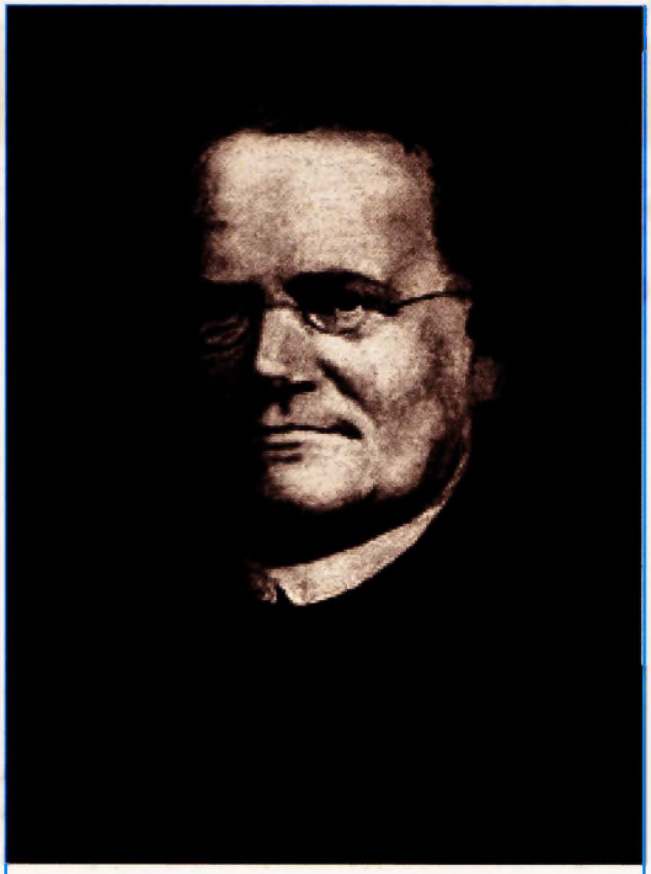


Fig. 1-1 Juan Gregorio Mendel, monje agustino y eminente biólogo, cerca de 1865. En ese año presentó su célebre trabajo sobre los híbridos, en la Sociedad de Ciencias Naturales de Brno (actualmente, República Checa).

En esa época aún no se conocía la meiosis, la fertilización era escasamente comprendida y la mitosis no había sido analizada aún en detalle, de modo que los postulados de Mendel no tenían una base celular y habían sido deducidos abstractamente de los resultados de sus experiencias. Por otra parte, Mendel usó una metodología estadística para establecer reglas cuantitativas para sus resultados de hibridación, efectuados en varios miles de plantas. Para explicar sus resultados, Mendel imaginó "factores" abstractos (décadas después estos factores serían llamados genes) que podían existir en *estados alternativos* (por ejemplo, un "factor" o gen para el color verde de la semilla, y un estado alternativo de ese factor, para el color amarillo) Actualmente, los estados alternativos o diferentes de un gen se denominan *alelos*, término introducido por el genetista W Johannsen en 1909 En realidad, hoy sabemos que los alelos son todas las variantes que puede presentar un gen por mutación, pero en una simplificación podemos considerar que básicamente hay dos alelos para un factor· el normal o silvestre (generalmente simbolizado con un signo positivo) y el anormal o mutado. Mendel asumió que el origen de las variaciones radicaba en la existencia de "alelos" (normal y mutado, por ejemplo el color usual y otro color) y que los progenitores contribuían al descendiente con un alelo cada uno. Hoy sabemos que efectivamente nuestros organismos tienen en cada célula sus cromosomas por pares, es decir que nuestros 46 cromosomas son 23 pares, y que por consiguiente tenemos también nuestros genes por pares, condición que se llama diploidía (término introducido recién en 1905 por el citólogo alemán E. Strasburger). Por otra parte, hoy se sabe que efectivamente cada progenitor contribuye con *uno solo* de cada par de factores o genes, porque las células sexuales (o gametos) sólo poseen un juego de cromosomas en vez de un par de juegos (los gametos humanos tienen 23 cromosomas en vez de los 46 cromosomas de las demás células; son por consiguiente "haploides" , de *haplos* = mitad, en griego, término también introducido por Strasburger en 1905) Hasta aquí, los postulados puramente hipotéticos de Mendel estaban prediciendo los mecanismos aún no descubiertos de la fertilización y de la meiosis, y, al presumir la existencia de los "factores" (genes) que podían adoptar estados alternativos, predecía los estados de los genes, o normales o mutados (fig. 1 2)

Después de formular esos postulados, Mendel analizó la descendencia cuando los progenitores poseían "alelos" diferentes, por ejemplo color usual (+) y color mutante (m). Una de sus conclusiones capitales es que los alelos no se *fusionaban* en el descendiente y que, aunque un alelo m ("recesivo") no tuviera un efecto evidente en ese descendiente, ese "factor" (gen) permanecía intacto en ese individuo y en la siguiente generación (llamada "filial 2" o F2) *podía aparecer de nuevo.* Además, cuando ese factor que no se expresó en la "filial 1" (F1 o primera descendencia) aparecía en un individuo de la F2, ese individuo era "puro", *porque sus dos alelos eran iguales* (el individuo se llama *homocigótico* cuando tiene esa condición) Esa separación de los alelos, el silvestre + y el mutante m que

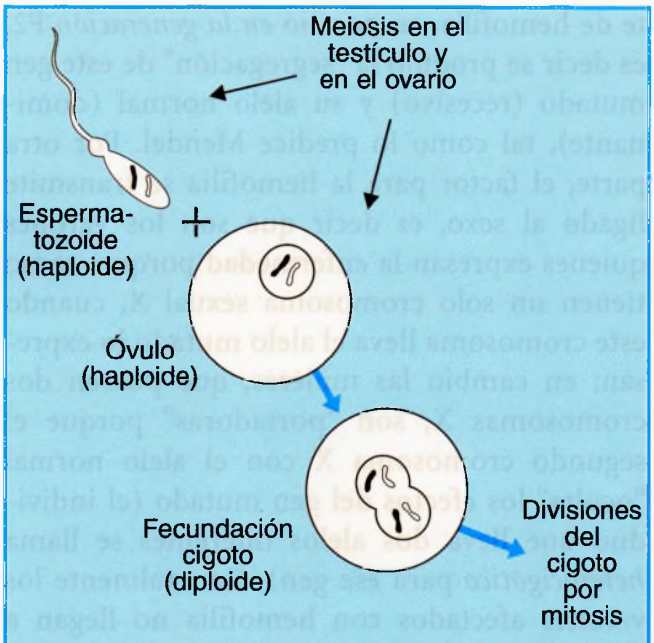


Fig. 1-2. Postulados predichos por Mendel que se comprobaron más tarde por observaciones citológicas. La meiosis (desconocida en tiempo de Mendel) reduce a la mitad el número de cromosomas en los gametos, espermatozoide y óvulo, que son haploides. Al producirse la fecundación, en el cigoto se reconstituye el número de pares de cromosomas, 23 pares en la especie humana (aquí se representan sólo dos pares de cromosomas).

están juntos en la F1 y se separan en la F2, es la *segregación* de los factores o genes, que tiene su base material en la separación de los dos miembros de cada par de cromosomas que ocurre en la meiosis (no descubierta aún en esa época).

Estas consecuencias, y otras que también dedujo Mendel, marcaron los caminos de la Genética en el siglo siguiente. En este libro de Genética Humana, daremos un ejemplo solamente aproximado a las experiencias de Mendel con plantas, para cuyo fin usaremos el árbol genealógico de la familia real inglesa del siglo XIX, en la cual se dieron una serie de casos de hemofilia, enfermedad grave con defecto de la coagulación de la sangre. Este ejemplo se aproxima a esas experiencias, por la (eugénicamente mala) costumbre de los miembros de las familias reales de casarse entre ellos, con un número no muy escaso de hijos, y que reciben cuidados tales que ciertos enfermos pueden sobrevivir hasta la edad reproductiva, seguramente Mendel hubiera apreciado estas observaciones (fig. 1 3)

La reina Victoria tuvo nueve hijos, cuatro varones, de los cuales uno solo fue enfermo de

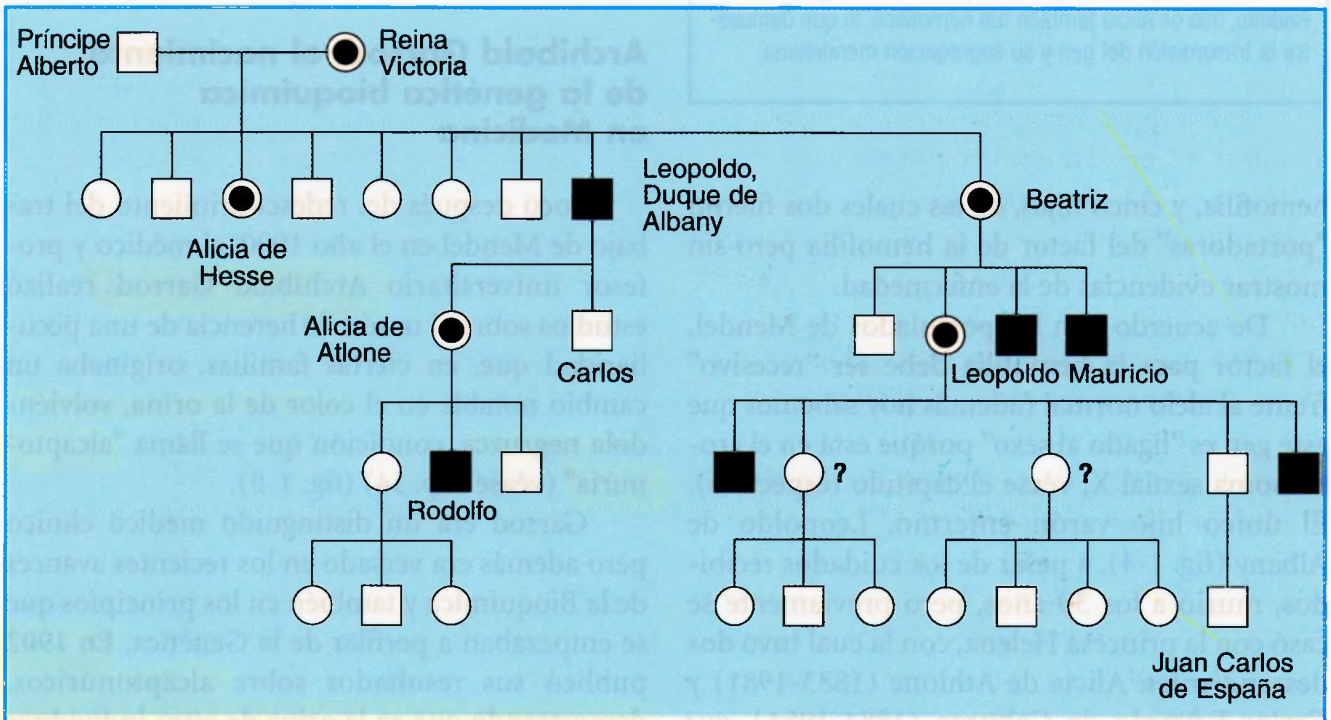


Fig. 1-3. Genealogía (parcial) de la descendencia de la reina Victoria de Inglaterra (1819-1901). En esta descendencia es evidente la transmisión hereditaria de la hemofilia. Se señala en particular el hijo menor de la reina, Leopoldo (hemofílico) y sus descendientes, y su hermana Beatriz (portadora) con los suyos. (Símbolo para varones: cuadrado; para mujeres, círculo; cuadrado llenado, enfermo; círculo parcialmente llenado, portador;signo ? = estado de portadora o no portadora incierto.

Fig. 1-4. Leopoldo, duque de Albany, fue el único hijo varón de la reina Victoria que fue hemofílico y transmitió el gen mutado a su hija Alicia, quien fue portadora del gen mutado; Rodolfo, hijo de Alicia también fue hemofílico, lo que demuestra la transmisión del gen y su segregación mendeliana.

hemofilia, y cinco hijas, de las cuales dos fueron "portadoras" del factor de la hemofilia pero sin mostrar evidencias de la enfermedad.

De acuerdo con los postulados de Mendel, el factor para la hemofilia debe ser "recesivo" frente al alelo normal (además hoy sabemos que este gen es "ligado al sexo" porque está en el cromosoma sexual X, véase el capítulo respectivo) El único hijo varón enfermo, Leopoldo de Albany (fig. 1-4), a pesar de los cuidados recibidos, murió a los 30 años, pero previamente se casó con la princesa Helena, con la cual tuvo dos descendientes: Alicia de Athlone (1883-1981) y Carlos Eduardo de Coburgo (1884-1954), *que no evidenciaron ningún signo de hemofilia.* Sin embargo, Alicia de Athlone tuvo tres descendientes, de los cuales uno, Rodolfo, *resultó enfermo de hemofilia.* Es decir, el gen mutado causante de hemofilia, *reapareció en la generación* F2, es decir se produjo la "segregación" de este gen mutado (recesivo) y su alelo normal (dominante), tal como lo predice Mendel. Por otra parte, el factor para la hemofilia se transmite ligado al sexo, es decir que son los varones quienes expresan la enfermedad porque, como tienen un solo cromosoma sexual X, cuando este cromosoma lleva el alelo mutado lo expresan, en cambio las mujeres, que poseen dos cromosomas X, son "portadoras" porque el segundo cromosoma X con el alelo normal "oculta" los efectos del gen mutado (el individuo que lleva dos alelos diferentes se llama *heterocigótico* para ese gen) Generalmente los varones afectados con hemofilia no llegan a tener descendencia, como se aprecia en la descendencia de Beatriz (véase fig. 1 3)

Varios miles de enfermedades humanas se deben a la mutación de un único gen, cuando no hay otros factores que perturben su expresión, esas enfermedades debidas a la mutación de un solo gen se comportan como los rasgos estudiados por Mendel, y son llamadas enfermedades *mendelianas* o monogénicas.

Archibald Garrod: el nacimiento de la genética bioquímica en Medicina

Poco después del redescubrimiento del trabajo de Mendel en el año 1900, el médico y profesor universitario Archibald Garrod realizó estudios sobre el modo de herencia de una peculiaridad que, en ciertas familias, originaba un cambio notable en el color de la orina, volviéndola negruzca, condición que se llama "alcaptonuria" (véase cap. 14) (fig. 1-5)

Garrod era un distinguido médico clínico pero además era versado en los recientes avances de la Bioquímica y también en los principios que se empezaban a perfilar de la Genética. En 1902 publicó sus resultados sobre alcaptonúricos, demostrando que en la orina de estos individuos había gran cantidad de ácido homogentísico, un producto del metabolismo de los aminoácidos (abreviado: aa) tirosina y fenilalanina, que normalmente no se encuentra en la orina. También

mostró que en las familias a las que pertenecían esos individuos, la alcaptonuria se heredaba como un "*factor*" *mendeliano recesivo*. Garrod supuso que la ausencia de ácido homogentísico en la orina normal se debe a que es degradado por una enzima, y que la falta de esa enzima es lo que provoca la alcaptonuria. Esta conclusión es exacta, como lo muestra el camino metabólico actualmente conocido que se expresa a continuación:

fenilalanina---tirosina---ácido---p-hidroxifenilpirúvico
enzima:di-oxigenasa
↓
---ác. homogentísico--//ác. fumarilacetoacético---//
(final) CO_2 +H_2O.

En ausencia de la enzima, se acumula ácido homogentísico, que se transforma espontánea mente en un polímero negruzco que oscurece la orina. Garrod propuso que la falta de la enzima (proteína) se debía a la mutación del gen normal para esa enzima. Garrod estudió otros rasgos con similares características, como la cistinuria y el albinismo, y llegó a la conclusión clarividente de que *cada una de esas enzimas se correspondía con un gen*. No sólo analizó las enfermedades hereditarias de enzimas; consideró que cada individuo debería tener un metabolismo diferente, por la gran cantidad de factores o genes involucrados y la gran variedad de cambios en cada factor o gen (alelos) Es también propia de Garrod la expresión "defectos congénitos del metabolismo" con la cual se engloba hoy a las enzimopatías genéticas.

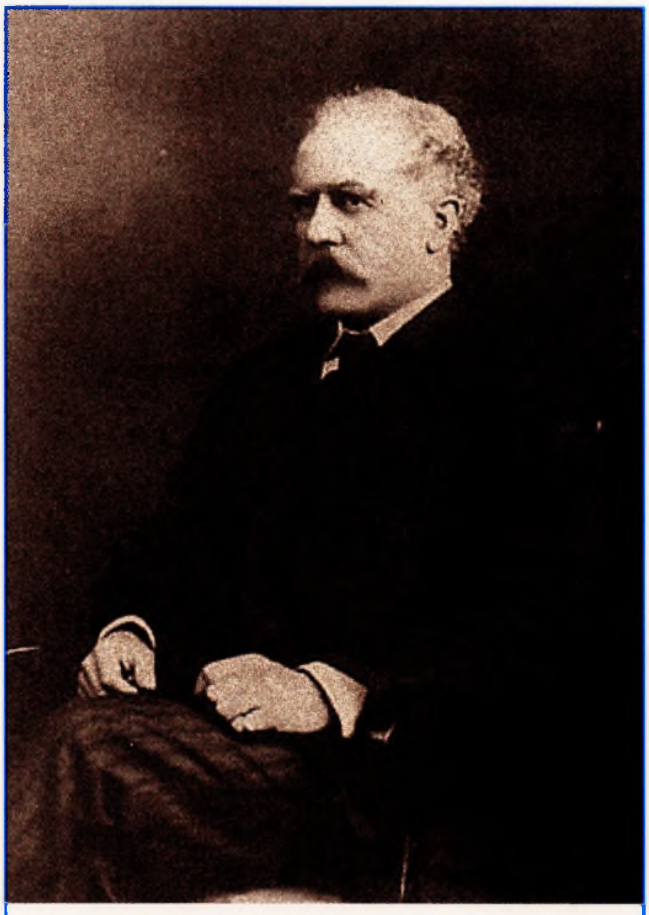


Fig. 1-5. Archibald Garrod (1858-1935). Médico inglés que propuso la relación entre genes y enzimas, y que fundamentó el estudio de los "errores congénitos del metabolismo" como llamó Garrod a las mutaciones de genes para enzimas.

Thomas Hunt Morgan: el ordenamiento lineal de los genes

El biólogo norteamericano Thomas H. Morgan (1866-1945) (fig. 1-6) se desvió de sus estudios iniciales de embriología para estudiar el ciclo vital y la herencia en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Aprovechando las ven tajas experimentales de esta mosca, demostró la existencia de la *recombinación* entre los genes, que ocurre en la profase de la meiosis, antes de la formación de gametos. Morgan y cols. demostraron que *los genes estaban colocados en un orden lineal*, en cada cromosoma, aunque la naturaleza de esa línea no era conocida (hoy sabemos que esa línea se corresponde con la molécula bihelicoidal de ácido desoxirribonucleico (abreviado: ADN) La realización de los primeros *mapas de genes*, colocados en orden lineal y con una estimación de las distancias que los separan, tuvo gran repercusión y estableció la metodología para realizar estos *mapas de ligamiento* (ligamiento es la tendencia a permanecer juntos que tienen los genes que están localizados en el mismo cromosoma, véase el capítulo respecti vo) Los trabajos de Morgan y cols. y de otros genetistas coetáneos demostraron además, en forma fehaciente, que los genes estaban localizados en los cromosomas, confirmando así la *teoría cromosómica de la herencia*, que da nacimiento a la Citogenética.

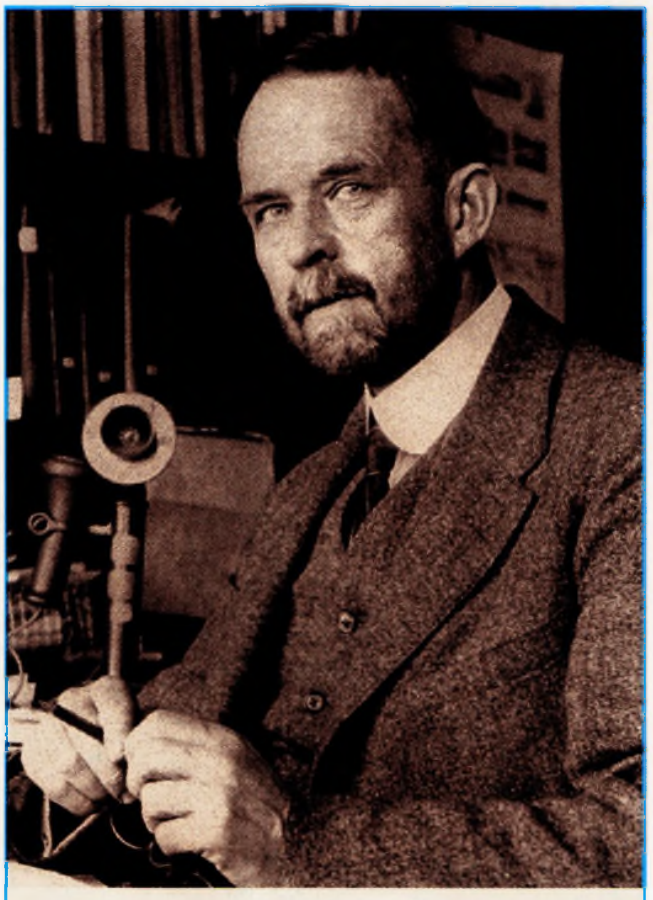


Fig. 1-6. Thomas H. Morgan, biólogo norteamericano que realizó los primeros mapas de ligamiento de genes y muchos otros adelantos, con el modelo de la mosca de la fruta.

Fig. 1-7 Rosalind Franklin (1920-1958). Doctora en Física, realizó el estudio cristalográfico que permitió demostrar la estructura molecular del ADN, que J. D. Watson y F H. Crick usaron (sin su autorización) para proponer el modelo de doble hélice del ADN. Franklin falleció de cáncer de útero en 1958.

La conexión con el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el modelo de la doble hélice

Hacia mediados del siglo XX la Genética estaba ingresando en una orientación hacia la Física y la Química. El gran interrogante acerca de la *base material de los genes* empujaba en esa dirección, y lo mismo hacían los avances más notables que ocurrían en la Genética de microorganismos y en especial de los virus. La conjunción del interés por la Genética despertado entre físicos y químicos más los resultados de la Genética microbiana llevaron en 1944 a la primera demostración de que la información hereditaria (es decir los genes) se encontraba en los ácidos nucleicos. Esta demostración fue realizada por el médico Oswald T. Avery junto a C. M. MacLeod y Maclyn McCarty, en Estados Unidos, trabajando con bacterias (neumococos), comprobando que cierta información hereditaria de los neumococos residía en su ADN La estructura molecular del ADN pasó entonces a ser un centro del interés de distinguidos físicos y químicos puros, tales como Linus Pauling, J. T. Randall y otros. El método más poderoso para investigar esa estructura molecular era el análisis por difracción de rayos X de cristales puros de esa sustancia en estado nativo. En el laboratorio dirigido por el físico J. T. Randall (King's College, en Londres) se realizaron durante 1952 y 1953 los más detallados y precisos estudios de difracción de rayos X de muestras de ADN, hechos por la joven física británica Rosalind Franklin (1920-1958) (fig. 1 7), a la sazón de 32 años de edad, quien trabajaba como investigadora asociada, en

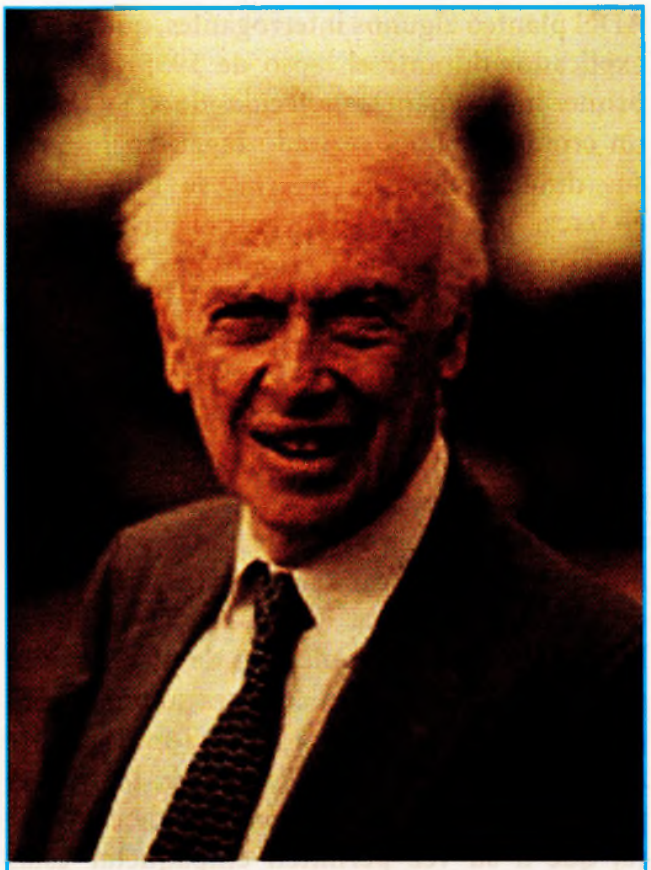


Fig. 1-8. James D. Watson, zoólogo norteamericano, que en colaboración con el físico inglés Francis Crick diseñó el modelo molecular de doble hélice del ADN en 1953, durante su estadía en Cambridge (Inglaterra).

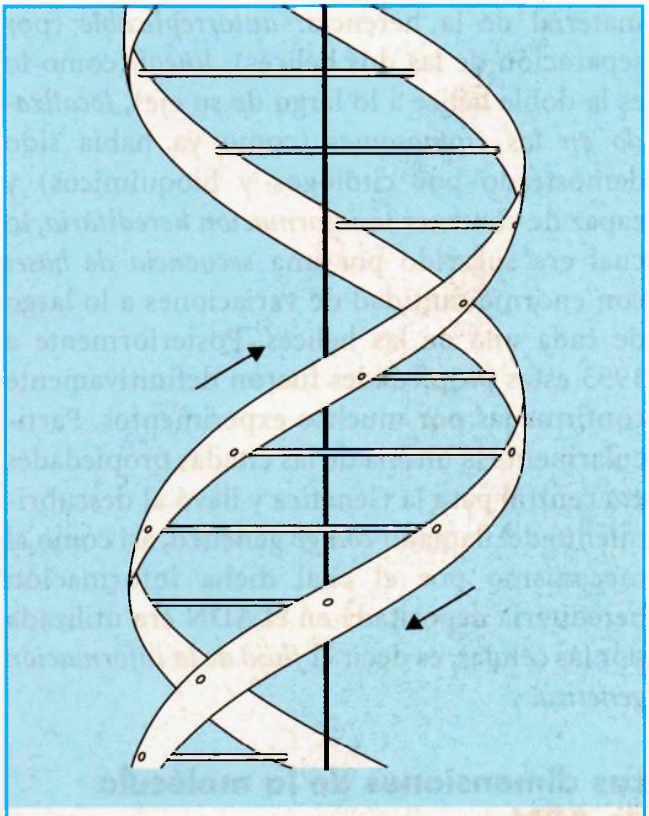


Fig. 1-9. Modelo original de la doble hélice del ADN, de Watson y Crick (Nature, 25 de abril de 953). Cada hélice, representada aquí por una cinta, es una cadena de polinucleótidos. Las barras transversales representan pares de bases. La línea central representa el eje ideal sobre el cual las dos hélices se enrollan. Las flechas indican el sentido inverso de las dos hélices.

el mismo entorno en que lo hacía el físico neocelandés Maurice H. F. Wilkins, también interesado en el ADN

Rosalind Franklin descubrió las formas A y B del ADN, demostró que las bases nitrogenadas estaban dirigidas hacia adentro y dio los detalles más precisos de las distancias moleculares en el ADN, pero no elaboró un esquema funcional de la molécula. Sus datos, incluidos sus cálculos y diagramas, fueron llevados por Wilkins a un par de investigadores, el biólogo norteamericano James D. Watson (nacido en 1928) (fig. 1-8) y el físico británico Francis H. C. Crick (1916-2004), quienes estaban en un laboratorio similar, en Cambridge, pero que estaban impedidos de realizar tareas experimentales y dedicaban su tiempo a proponer modelos moleculares teóricos.

Sobre la base de los datos de Franklin y las proporciones de las bases encontradas por el austríaco-norteamericano Erwin Chargaff (1905-2002), Watson y Crick elaboraron un modelo molecular del ADN, que consiste en dos hélices que corren con sentidos opuestos, con las bases de cada hélice dirigidas hacia el centro y guardando una relación espacial de estricta complementariedad (que justifica las relaciones halladas por Chargaff) y que sugiere de inmediato una forma simple de replicación de la molécula, por separación de las hélices y síntesis de las hélices complementarias (fig. 1-9).[2]

Confirmación y consecuencias del modelo de la doble hélice

El modelo de la doble hélice representó una forma intuitivamente fácil de representar las propiedades que debía tener el sustrato

material de la herencia. *autorreplicable* (por separación de las dos hélices), *lineal* (como lo es la doble hélice a lo largo de su eje), *localizado en los cromosomas* (como ya había sido demostrado por citólogos y bioquímicos) y capaz de contener la *información hereditaria*, lo cual era sugerido por una *secuencia de bases* con enorme cantidad de variaciones a lo largo de cada una de las hélices. Posteriormente a 1953 estas propiedades fueron definitivamente confirmadas por muchos experimentos. Particularmente la última de las citadas propiedades era central para la Genética y llevó al descubrimiento del llamado *código* genético, así como al mecanismo por el cual dicha información hereditaria depositada en el ADN era utilizada por las células, es decir el *flujo de la información genética.*

Las dimensiones de la molécula de ADN

Siendo la base material de la herencia y un componente de los cromosomas, la molécula de ADN planteó algunos interrogantes, que fueron explicados durante el lapso de 1955-1975. En primer lugar, cuántas moléculas de ADN hay en un cromosoma, en segundo lugar, cuáles eran sus dimensiones, en especial su longitud, y en tercer lugar, cómo se encontraba dispuesto en los cromosomas. Cada cromosoma consta de dos *cromátides hermanas* iguales, y los datos de replicación del ADN mostraron que cada cromátide tiene *una única molécula* de ADN (de doble cadena) A su vez, la molécula de ADN desafió la noción química de que las moléculas son entidades submicroscópicas en todas sus dimensiones: la molécula única de cada cromosoma humano puede llegar (si estuviera totalmente desenrollada) a cerca de siete centímetros de longitud. se trata de moléculas de una longitud gigantesca a pesar de su anchura submicroscópica de sólo 23 nm (fig. 1 10) La molécula de ADN es flexible y puede curvarse, lo cual le permite adoptar sucesivos órdenes de curvatura, que a su vez permiten empaquetar estas moléculas larguísimas en los pequeños cromosomas.

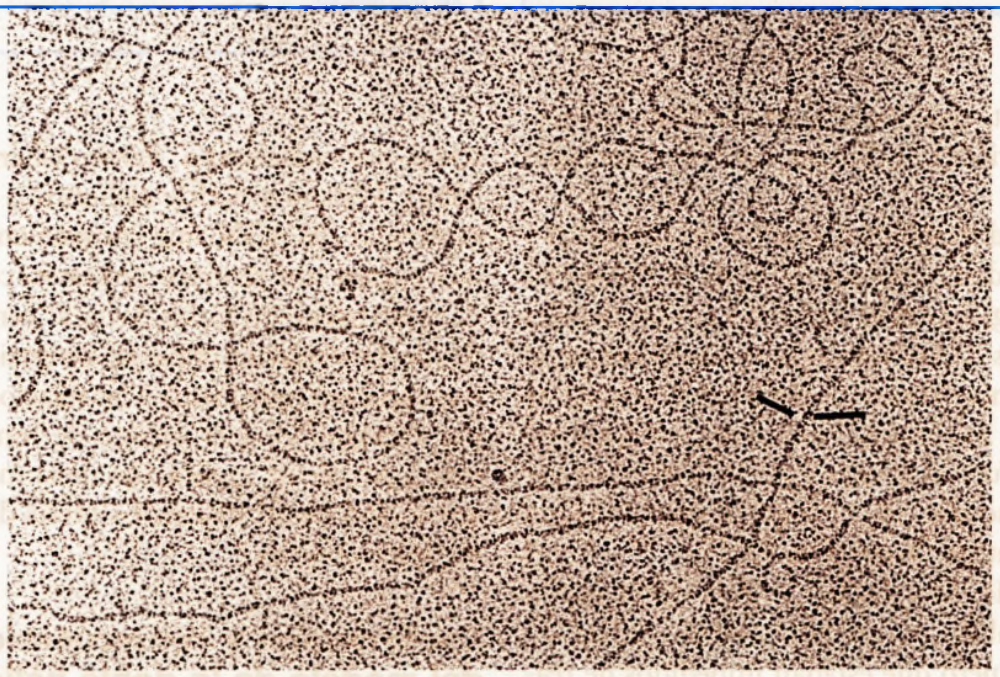


Fig. 1-10. Con microscopia electrónica se pudo demostrar que la molécula de ADN es muy larga, de una anchura constante (de 23 nm), señalada entre las dos líneas, y además que es flexible y esto le permite curvarse. Aumento: 52.000. (Solari AJ, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965; 53:503-511).

La codificación de la herencia

Cuando se demostró que la base material de la herencia era el ADN, surgió el problema de cómo estaba representada, en el ADN, esa determinación de la herencia. Dado que todas las células de los organismos vivos funcionan básicamente por sus proteínas, que forman no sólo los bloques estructurales con los que se organiza la célula, sino que también a través de proteínas enzimáticas las células movilizan las reacciones químicas del metabolismo, la asignación de la herencia a una sustancia poco reactiva como el ADN planteaba algunas dudas conceptuales que ya habían sido resueltas, y otras dudas nuevas. Desde hacía décadas se había demostrado que el "puente" entre una generación y la siguiente depende sólo de los gametos, y dentro de los gametos, de sus cromosomas. De modo que la base material de la herencia implica una miniaturización de esa base material, cualquiera sea su naturaleza. Por otra parte, se había demostrado que las unidades de la herencia, los genes, estaban colocados en orden lineal, que podía ser fraccionado por recombinación, y que además eran susceptibles de variar (por *mutación*) Siendo los componentes del ADN solamente de tres tipos, fosfato, desoxirribosa y bases nitrogenadas (éstas son cuatro), la única forma imaginable de acumular la información hereditaria en el ADN sería por el *orden secuencial de las bases nitrogenadas, adenina(A), guanina (G), citosina (C) y timina (T).* El físico ruso-norteamericano George Gamow (1904-1968) propuso que las instrucciones hereditarias estaban *codificadas* en el ADN de modo que las variaciones de las secuencias de los cuatro tipos de bases (con repeticiones) determinaban el orden, a su vez, de los aminoácidos en cada proteína. Aunque el esquema de Gamow no era correcto en detalle, la idea estimuló a muchos otros científicos, entre ellos Francis Crick y el británico Sydney Brenner, hasta que la idea de un "código" de tres bases seguidas, es decir un "triplete" se afirmó como el representante de cada uno de los 20 aminoácidos. Finalmente, en 1966 se determinó experimentalmente el "código genético", por parte de un conjunto de estudios en los cuales intervinieron el bioquímico norteamericano Marshall Nirenberg (1927), el bioquímico hindú-americano Har G Khorana (1922-) y el bioquímico español norteamericano Severo Ochoa (1905-1993) El paso de la información desde el ADN hasta las proteínas era intermediado por otra sustancia, el ácido ribonucleico (ARN) del tipo que se llamó "mensajero" (ARNm)

Consecuencias del desciframiento del código genético

A partir de la confirmación experimental del código genético, gran parte de la Genética inició un viraje, desde los estudios estructurales hacia los estudios de descodificación, que se extiende hasta la actualidad. El objetivo, al parecer inalcanzable en 1960, de determinar la identificación y el orden de todas las bases nitrogenadas a lo largo del ADN (es decir la *secuenciación* del ADN), se fue volviendo factible gracias a adelantos técnicos. Los resultados por lograr se planificaron en gran escala bajo la forma del llamado *Proyecto Genoma Humano*, cuya finalización se realiza en el año 2003.

Ya finalizada la secuenciación del ADN humano, se abre una etapa diferente, de combinación de estudios estructurales (de *proteínas*, actualmente) y sobre todo de estudios de interacciones entre ácidos nucleicos y proteínas, y de proteínas entre sí, con el objetivo de dilucidar los *procesos de regulación génica* y de *función de las proteínas* dentro del organismo, que tiene enormes repercusiones en Medicina.

El Proyecto Genoma Humano de secuenciación y análisis del ADN humano

Durante la década de 1980-1990 un cierto número de instituciones académicas, organismos de política científica e investigadores individuales de Estados Unidos llegaron a la conclusión de que el desciframiento completo del ADN humano, con su conjunto de genes (o *genoma*) era un proyecto tecnológicamente factible, si se asignaban los considerables recursos económicos y académicos necesarios. La decisión finalmente

fue tomada por las autoridades respectivas de Estados Unidos, asignando fondos crecientes a dos instituciones gubernamentales, el Instituto Nacional de la Salud (NIH) y el Departamento de Energía (DOE) de Estados Unidos, así como a numerosas universidades de ese país, con el objetivo declarado de *descifrar la secuencia total de bases del ADN humano*. Este proyecto, que comenzó oficialmente en 1990, tenía metas precisas para cada quinquenio, que fueron ampliamente superadas en la realidad. En el año 2001, este proyecto llevaba consumidos alrededor de 3.000 millones de dólares desde el año 1990, sin por ello afectar la asignación de recursos a otros proyectos científicos, y había llegado a lograr la secuencia de casi todo el genoma (o ADN) humano. Paralelamente, una empresa privada llamada Celera y presidida por el investigador Craig Venter había logrado en el año 2000 una secuenciación casi total del ADN humano, por lo cual el entonces presidente de los Estados Unidos, Clinton, con la presencia conjunta de Venter y del director del proyecto gubernamental, Francis Collins, presentó en público la descodificación del ADN humano "en borrador", el 26 de junio del año 2000. También se anunció que las secuencias "definitivas" serían publicadas en 2003 (la diferencia entre "secuencias en borrador" y secuencias definitivas o finales es el grado de error que pueden contener, que en las últimas debe ser menor a una base errónea entre 10.000)

Consecuencias e implicancias de la secuenciación del ADN humano (Proyecto Genoma Humano)

La consecuencia inmediata del completamiento de la secuenciación del genoma humano es que se dispone de la secuencia de los 3.000 millones de bases nitrogenadas que constituyen en ADN humano. Esas tres mil Mb (abreviación de millón de bases) están distribuidas en los 23 pares de cromosomas humanos, proporcionalmente al tamaño de cada uno de éstos; de esa manera, el cromosoma 21, que es el más pequeño, tiene un ADN con aproximadamente 41 Mb, y el 22 tiene 45 de las cuales 33,4 Mb fueron secuenciadas[3] (fig. 1 11)

La enorme cantidad de información acumulada en la preparación de la secuenciación y en sus resultados ha impulsado el desarrollo de métodos informáticos especializados para el manejo de esta información, y esto ha concluido en el establecimiento de una disciplina nueva, la *bioinformática*. A través de procedimientos de bioinformática se puede *acceder a bases de datos* y disponer inmediatamente de la secuencia de bases de cualquier sector del ADN de todos los cromosomas humanos. El Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) dispone de la base de datos más completa para estos fines.

Los resultados de la secuenciación en borrador fueron publicados simultáneamente por parte del proyecto oficial y el de compañía Celera en el año 2001 [3,4] Uno de los objetivos de la secuenciación, que es obtener el número total de genes humanos, sólo pudo obtenerse en forma aproximada: alrededor de 25.000 genes. Esto se debe a que para demostrar fehacientemente que una secuencia es un gen es preciso saber si *funciona* como un gen, y demostrar el funcionamiento es más difícil que la secuenciación. Muchos genes importantes ya habían sido aislados individualmente, en laboratorios universitarios, antes de la conclusión del Proyecto Genoma Humano. Este proyecto confirmó casi totalmente las secuencias de esos genes conocidos, pero además se encontraron gran cantidad de genes de función totalmente desconocida, y muchos otros genes de los cuales se presupone con alguna probabilidad cuál es su función por ciertas características de la proteína que codifican.

Uno de los resultados más importantes de la secuenciación es que se dispone ahora de la codificación de varios miles de proteínas desconocidas y la secuencia codificada de muchas proteínas incompletamente conocidas. Se ha estimado que existirían alrededor de un millón de proteínas humanas, dado que cada gen codifica varias proteínas usando diferentes combinaciones de sus regiones codificantes, ya sea por empalme alternativo, por el uso de diferentes promotores, por modificaciones del transcripto o por modificaciones postraduccionales.[5]

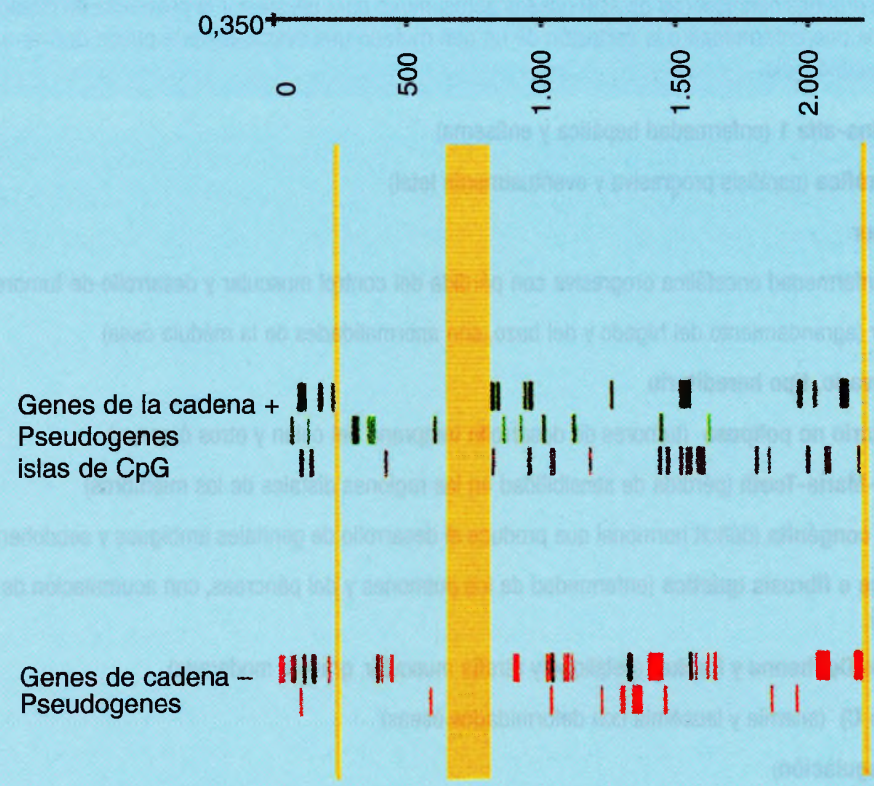


Fig. 1-11 Pequeño sector del cromosoma 22 humano, con su ADN secuenciado, mostrando los genes que se encuentran en la cadena + (la que se dirige del centrómero al telómero) en verde, y los de la cadena (orientados inversamente) en color rojo. Para definiciones de genes y pseudogenes, véase el capítulo correspondiente. El sector mostrado ocupa sólo 2 Mb. Las bandas en amarillo corresponden a intervalos sin secuenciar. (Modificado de Dunham I, Shimizu B, Roe BA, Chissoe S, et al. The DNA sequence of human chromosome 22. Nature 1999; 402:489-494.)

Dado que el estudio de la estructura y función de cada proteína es sumamente complejo, se estima que el estudio de las propiedades fisiológicas y farmacológicas del millón de proteínas humanas (que colectivamente forman el llamado *proteoma humano*) constituye la tarea inmediata de las próximas décadas.[6]

Otro aspecto de la secuenciación del ADN es la obtención de *pruebas diagnósticas* de un número de enfermedades hereditarias, incluso para "portadores" que no presentan ninguna sintomatología. Estas pruebas diagnósticas, que ya empezaron a estar disponibles a medida que ciertos genes importantes en Medicina fueron aislados, han ido gradualmente incrementando en número, a medida que se conocieron los cambios de bases, pérdidas de bases u otros cambios en la secuencia del ADN correspondiente a un gen que impiden su función normal (es decir "mutaciones") y que están asociados a una determinada enfermedad. En el cuadro 1 1 se enumeran algunas de estas pruebas genéticas.

Identificación de personas

La secuenciación total del ADN humano fue realizada con especímenes derivados de unas pocas personas; por ejemplo, el mapa génico de Celera (dirigida por Craig Venter) fue realizado con el ADN de sólo cinco personas.[3] Sm embargo, uno de los propósitos del Proyecto Genoma Humano es también determinar las *variaciones* en la secuencia del ADN que se encuentran en distintos individuos, de diferentes poblaciones y

Cuadro 1-1. Algunas de las pruebas diagnósticas de ADN usadas actualmente para demostrar la presencia de mutaciones asociadas con la presencia real de una enfermedad o la portación de un gen mutado que eventualmente puede derivar en la enfermedad en el sujeto o en su descendencia.

Deficiencia de antitripsina-alfa 1 (enfermedad hepática y enfisema)

Esclerosis lateral amiotrófica (parálisis progresiva y eventualmente letal)

Enfermedad de Alzheimer

Ataxia-telangiectasia (enfermedad encefálica progresiva con pérdida del control muscular y desarrollo de tumores malignos)

Enfermedad de Gaucher (agrandamiento del hígado y del bazo, con anormalidades de la médula ósea)

Cáncer de mama y de ovario, tipo hereditario

Cáncer de colon hereditario no poliposo (tumores de desarrollo temprano del colon y otros órganos)

Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (pérdida de sensibilidad en las regiones distales de los miembros)

Hiperplasia suprarrenal congénita (déficit hormonal que produce el desarrollo de genitales ambiguos y seudohermafroditismo)

Enfermedad fibroquística o fibrosis quística (enfermedad de los pulmones y del páncreas, con acumulación de mucus espeso e infecciones crónicas)

Distrofias musculares de Duchenne y Becker (debilidad y atrofia muscular, grave o moderada)

Anemia de Fanconi (tipo C) (anemia y leucemia con deformidades óseas)

Factor V-Leyden (de coagulación)

Síndrome de X frágil (importante factor de retraso mental genético)

Hemofilia A; Hemofilia B (déficit de coagulación sanguínea)

Enfermedad de Huntington (enfermedad neurolológica, de inicio a mediana edad y letal)

Distrofia miotónica (debilidad muscular progresiva)

Neurofibromatosis, tipo I (tumores múltiples benignos)

Fenilcetonuria (retraso mental por déficit enzimático; corregible por dieta)

Poliquistosis renal del adulto (enfermedad renal y hepática)

Síndromes de Prader-Willi y Angeiman (déficit intelectual y motor)

Anemia falciforme (anemia que cursa con dolor e infecciones)

Ataxia espinocerebelosa, tipo 1 (movimientos involuntarios, alteraciones del lenguaje y de los reflejos)

Atrofia muscular espinal (atrofia muscular grave y progresiva)

Talasemias (anemias variadas por reducción de la síntesis de una hemoglobina)

Enfermedad de Tay-Sachs (neuropatía)

razas. Si bien el estudio de las variaciones no está completado, se demostró que hay numerosas variantes de la secuencia de bases, en especial en regiones no génicas, que son características de cada individuo y que se heredan como "caracteres" mendelianos. Esto hace que sea posible, con muestras de ADN de una persona y sus parientes, establecer la filiación, la ascendencia y la identidad de las personas (para este fin también es usado el pequeño ADN de las mitocondrias, que se transmite exclusivamente por vía materna). Estos adelantos ya han sido introducidos en la práctica jurídica, aunque su validez es siempre determinada por los tribunales.

A su vez, la posibilidad de identificar a las personas por su ADN y la posibilidad adicional de determinar si es portador de genes mutados que eventualmente pueden determinar una enfermedad en el sujeto o en sus descendientes han originado una serie de problemas de índole bioética, legal y social. El Proyecto Genoma Humano de Estados Unidos (HUGO) contiene un sector especial dedicado a analizar este tipo de problemas (llamado el *subprograma ELSI = ethical, legal, social issues*), convocando a reuniones de discusión multidisciplinaria, en las cuales intervienen juristas, teólogos, sociólogos, psicólogos y especialistas en bioética (esta última es una disciplina en rápido crecimiento) (panel 1-1)

Panel 1-1 Proteoma, transcriptoma y varioma

Después del completamiento del Proyecto Genoma Humano se realizaron las secuenciaclones de alrededor de dos centenares de otros organismos, que incluyen los genomas de mamíferos cercanos a la especie humana (el ratón, el chimpancé, el perro, y otros (véase http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez, GENOME PROJECTS). Ello acrecentó la posibilidad de comparar nuestro genoma con el de otros mamíferos y organismos inferiores, y detectar segmentos génicos conservados (es decir, poco variables en diferentes especies), lo cual es útil para distinguir secuencias esenciales para procesos celulares básicos.

Adicionalmente, se creó una disciplina en rápido crecimiemnto, la proteómica, cuyo objetivo es el estudio del conjunto completo de proteínas de cada organismo, es decir de los proteomas. Se estima que el conjunto de las proteínas humanas, es decir el proteoma, contiene aproximadamente un millón de proteínas.[7] Esto significa que el proteoma es unas 40 veces mayor que el número de genes codificantes de proteína. Este hecho, a su vez, señala la importancia de las variantes producidas por empalme alternativo (5 a 7 son comunes), las modificaciones postraduccionales y otros mecanismos de variación. El estudio del proteoma se lleva a cabo en centros especializados y con tecnologías fisicoquímicas, en especial la espectrometría de masa. La proteómica humana tiene también como objetivos caracterizar el conjunto de proteínas de cada tipo celular (p. ej., el hepatocito) de tal manera que existen numerosos subproyectos dirigidos hacia tipos celulares, órganos específicos o proteínas presentes en líquidos biológicos normalas (plasma, líquido cefalorraquídeo, etc.). A su vez, otros subproyectos se dirigen a identificar las diferencias de composición proteica de células normales y células patológicas, pero estos estudios sólo están en sus inicios.[8]

El transcriptoma es el total de ARN transcriptos en un organismo determinado.

El estudio del transcriptoma humano ha deparado varias sorpresas: la mayor parte del genoma humano es transcrita por la ARN polimerasa II, la misma que fabrica los transcriptos de los genes codificantes de proteínas.[9] A esta extensión de la transcripción por fuera de los genes de proteínas se la ha calificado de "pervasiva" (en el sentido de excesiva) y da lugar a la producción de numerosos ARN transcriptos no codificantes de proteína. Estos transcriptos no merecieron la atención de los investigadores hasta la primera década del siglo XXI, cuando se empezó a tomar conciencia de su importancia en la regulación génica. El *XIST* es un típico "gen de ARN", cuyo papel regulador de la inactivación del cromosoma X está muy estudiado (véase cap. 11). Actualmente se sabe que en el transcriptoma humano solamente el 2,5% del total de transcriptos corresponde a genes de proteínas, mientras que el resto corresponde a transcriptos de ARN no codificante de proteínas, ya sea largos (100 kilobases o más), cuyo papel regulatorio es intensamente estudiado, y ARN "cortos", que también son funcionales, puesto que intervienen en los fenómenos de interferencia de ARN (véase cap. 7).

El "varioma" es el conjunto de mutaciones que afectan los genes del organismo humano. Existe un Proyecto del Varioma Humano,[10] que tiene por objetivo construir una base de datos de todas las variantes génicas humanas y establecer sus relaciones con los fenotipos correspondientes.

RESUMEN

Un bosquejo histórico del desarrollo de los conceptos de la Genética muestra que Juan Gregorio Mendei, en su trabajo de 1865, predijo con exactitud un número de fenómenos biológicos de gran importancia y el mecanismo de transmisión de los factores hereditarios. Su concepto de "factores" hereditarios, puramente teórico y deductivo, se corresponde con los genes conocidos como tales en la actualidad. La "segregación" de los genes se corresponde con la separación de los cromosomas homólogos de la entonces desconocida meiosis, y la correspondiente separación de los "alelos" o variantes génicas de esos cromosomas. Esta segregación de los alelos es visible en las "genealogías", por ejemplo, de los miembros de la familia real británica portadores del gen para la hemofilia. El médico inglés Garrod dedujo acertadamente que los factores o genes mendelianos eran responsables de enfermedades hereditarias del metabolismo y predijo también acertadamente que cada "enzima"era determinada por un gen, realizando estudios en varios defectos congénitos del metabolismo, como la alcaptonuria. El ADN fue por primera vez demostrado como el material hereditario en la bacteria neumococo, por Avery y McCarty en 1944. En 1953 Rosalind Franklin consiguió las pruebas experimentales de la estructura del ADN y, en el mismo año, basándose en esos datos y en las proporciones de bases demostradas por Chargaff, J. D. Watson y F. H. C. Crick propusieron el modelo de estructura del ADN consistente en dos hélices de sentido inverso con las bases dirigidas hacia adentro, que establece una complementariedad entre una hélice y la opuesta. Esta estructura, que sugiere el mecanismo de la autorreplicación del ADN y su función de reservorio de información a través de la secuencia de bases, fue verificada por numerosos experimentos. La información hereditaria está codificada en tripletes de bases; este código fue determinado finalmente en 1966 por Nirenberg, Khorana, Ochoa y otros. La descodificación de todo el ADN, es decir su secuencia de bases, fue encarada por el Proyecto Genoma Humano que comenzó en 1990 y termina con éxito en 2003. Esta secuenciación tiene numerosas consecuencias científicas y sociales, y abre el paso a una nueva etapa de estudio del conjunto de las proteínas humanas (proteoma humano). La proteómica ya forma una disciplina propia, y junto al estudio del conjunto de transcriptos o transcriptoma, y el de las variantes génicas o varioma, son objeto de investigación en la actualidad.

REFERENCIAS

1 Tjio HJ, Levan A. The chromosome numbers of man. Hereditas 1956; 42:1-6.
2. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyrribose nucleic acid. Nature 1953;171:737-738.
3. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001 409:860-921
4. Venter C, et al. The sequence of the human genome. Science 2001 291·1304-1351
5. Pennisi E. The human genome. Science 2001 291·1177 1180.
6. Baker D, Sali A. Protein structure prediction and structural genomics. Science 2001 294:93-96.
7 Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome.Mol Hum Rerod 2009;15:271-277
8. Rai AJ, Merlini G. A focus on recent advances in proteomics-one step closer to entrance into the clinical arena. Clin Cem Lab Med 2009; 47:625-626.
9. Amaral PP Dinger ME, Mercer TR, Mattic JS. The eukaryotic genome as an RNA machine. Science 2008;319:1787 1789.
10. Cotton RGH, Auerbach AD, Axton M, et al. The human variome project. Science 2008;322:861-862.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Mickios DA, Freyer GA. DNA Science. A first course in recombinant DNA technology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

Capítulo 2

Conceptos básicos

Relaciones entre factores genéticos, ambientales y el fenotipo. Fenocopias. Utilidad del estudio de gemelos. Caracteres discretos y continuos en la especie humana. Enfoque molecular de la genética humana: del ADN al fenotipo

El problema central de la Genética Médica: factor genético versus factor ambiental

La ciencia de la Genética se ha establecido sobre la base de algunos postulados fundamentales, de los cuales el primero es que la estructura y la función de un organismo dependen de dos tipos de factores: los ambientales y los genéticos.[1] Este postulado está sustentado por la observación de toda la escala biológica, incluida la especie humana: es posible introducir cambios en un organismo (que *no* serán heredables) por cambios en el entorno; por ejemplo, las plantas superiores, frente a cambios en la cantidad de luz recibida, exhiben importantes diferencias en su desarrollo, desde la cantidad de color dada por la producción de clorofila hasta la envergadura de la planta y su tiempo de floración; o las variaciones en la alimentación de los animales, que se expresan en su desarrollo, su peso y su estado de salud. Estos cambios son tan evidentes y conocidos que la agricultura se ha basado, hasta tiempos recientes, en lograr mejores rindes mediante cambios ambientales. En Medicina, se buscó muchas veces cuáles eran los agentes nocivos *externos* o noxas que pudieran causar enfermedades. Estos hechos evidentes oscurecieron durante un tiempo el hecho esencial de que los cambios efectuados por el ambiente son cuantitativos y que consisten generalmente en las reacciones de las que el organismo es capaz frente a cambios del entorno. Es decir que existe, en cada organismo, un plan de desarrollo que es heredable y que se concreta en la medida y forma en que el ambiente lo permite. Estas distinciones, entre los cambios del entorno y el plan heredable del desarrollo, con el aspecto final del organismo, fueron enunciadas por el genetista Johannsen (1911) al definir el *fenotipo*, o sea el aspecto del organismo, tanto macroscópico como microscópico, con todos sus rasgos expresados, externos e internos, funcionales y de conducta, como el resultado de su constitución genética, o *genotipo*, heredado de sus progenitores, más los *factores ambientales* que permitieron o modificaron la expresión de esa constitución genética. Es decir·

FENOTIPO = GENOTIPO + AMBIENTE

o, más exactamente al referirnos a *cambios* observados:

VARIACIONES FENOTÍPICAS = VARIACIONES GENOTÍPICAS + VARIACIONES AMBIENTALES

En Genética Médica, el problema primario frente a una enfermedad determinada es resolver cuál es la identidad y la importancia del factor ambiental y cuál es el de la constitución genética ("nurture versus nature" = crianza versus naturaleza) Hasta hace poco tiempo, la Medicina

estuvo orientada a determinar las noxas externas, pero actualmente se reconoce que en casi todos los rasgos, incluidos los patológicos, existe un factor genético. Sin embargo, el genotipo y el ambiente se relacionan de una forma compleja. Uno de los ejemplos de esta complejidad es la existencia de *fenocopias*, que pueden definirse como rasgos provocados por factores ambientales concretos, que remedan los efectos de una alteración del genotipo.

Fenocopias: raquitismo nutricional y raquitismo hipofosfatémico

El raquitismo clásico es una enfermedad por déficit nutricional, que era muy frecuente en los niños pequeños hace varias décadas pero que es rara en la actualidad, determinada por una deficiencia de vitamina D o calciferol. Un precursor de esta vitamina es sintetizado en la piel por acción de la luz de corta longitud de onda, pero en los países de latitudes altas es necesaria una ingestión adicional de la vitamina. La vitamina contenida en alimentos es absorbida en el intestino como precursor de la forma activa, acoplada a proteína sérica y modificada en el hígado. Luego sigue su trayecto al riñón, donde finalmente es producida la forma activa, el 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol) Este compuesto actúa por medio de *receptores* en la mucosa intestinal, favoreciendo la absorción de calcio alimentario y, a nivel del tejido óseo, movilizando iones de calcio desde el hueso hacia el plasma, de modo que tiende a remontar la concentración de calcio hasta su nivel normal. En el hueso en formación, el producto de las concentraciones de Ca^{++} y de fosfato debe pasar un umbral determinado para que se produzca el depósito normal de fosfato cálcico (como hidroxiapatita) en el tejido sin mineralizar; la forma activa de la vitamina D, al llevar la calcemia a su nivel normal, favorece este proceso de mineralización. En caso de déficit de esta vitamina en los alimentos (o de iluminación), el hueso se calcifica menos y en forma irregular. Este proceso es sobre todo visible en las epífisis de los huesos, que se presentan hinchadas y deformadas, y en los extremos de las costillas; además, como el hueso está menos calcificado, los huesos largos pueden arquearse, lo que le da al paciente un aspecto característico (fig. 2-1)

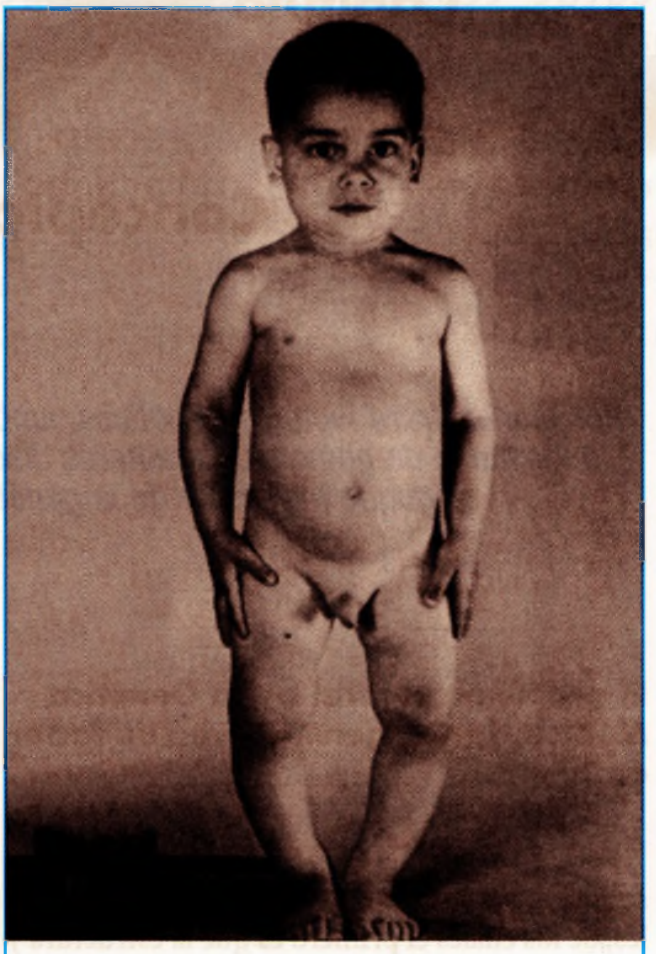


Fig. 2-1 Niño afectado por raquitismo hipofosfatémico (mutación del gen *HYP* = *PHEX*, ligado al sexo). Las epífisis de los miembros están aumentadas de tamaño y son irregulares, y los huesos de la pierna, arqueados. Un aspecto muy similar tienen los niños con déficit de vitamina D (raquitismo nutricional o clásico). (Reproducido con autorización de Nora JJ, Fraser FC y col. Medical Genetics, Principles and Practice, 4ª ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.)

Un *aspecto similar* puede ser producido por una mutación génica de un gen conocido, localizado en el cromosoma X y que produce el *raquitismo hipofosfatémico*. Cuando el genetista observa un cuadro producto de un factor ambiental, que reproduce el efecto de una mutación génica, se lo denomina *fenocopia* (en el sentido de ser una copia fenotípica del efecto de una mutación) El raquitismo hipofosfatémico en realidad no es un raquitismo, sino una hipofosfatemia genética que reproduce sus síntomas; no tiene relación alguna con la vitamina D, a la cual es

completamente insensible. El gen alterado es *HYP* (sigla en inglés de *hypophosphatemia*), llamado actualmente gen *PHEX* (panel 2-1), y se lo ha localizado en el brazo corto del cromosoma X, en Xp22 (véase cap. 9) [4]

En el raquitismo hipofosfatémico, el origen de la enfermedad estriba en la insuficiencia de las células de los túbulos renales para reabsorber el ión fosfato del ultrafiltrado glomerular; el defecto se encuentra a nivel del ribete en cepillo y es específico para el fosfato; es causado por el déficit del producto codificado por el gen *HYP*, déficit que es total para el varón, puesto que el gen reside en el único cromosoma X (véase cap. 10, Ligamiento al X) El bajo nivel de fosfato tiene, en el hueso, un efecto semejante al descenso del calcio en el raquitismo clásico, con defectos en la calcificación del tejido osteoide, permanencia del cartílago hipertrófico sin calcificar y, finalmente, las deformaciones óseas del raquitismo.

Si bien el aspecto de los pacientes es muy similar, los datos de laboratorio, el efecto de la vitamina D y los antecedentes familiares permiten distinguir ambos cuadros. Además, existe otra enfermedad hereditaria similar, no ligada al sexo, que se origina en una mutación autosómica del gen de la enzima que origina la forma activa de la vitamina D. Esto muestra

Panel 2-1 Gen *PHEX* (*HYP*), responsable del raquitismo hipofosfatémico

Panel

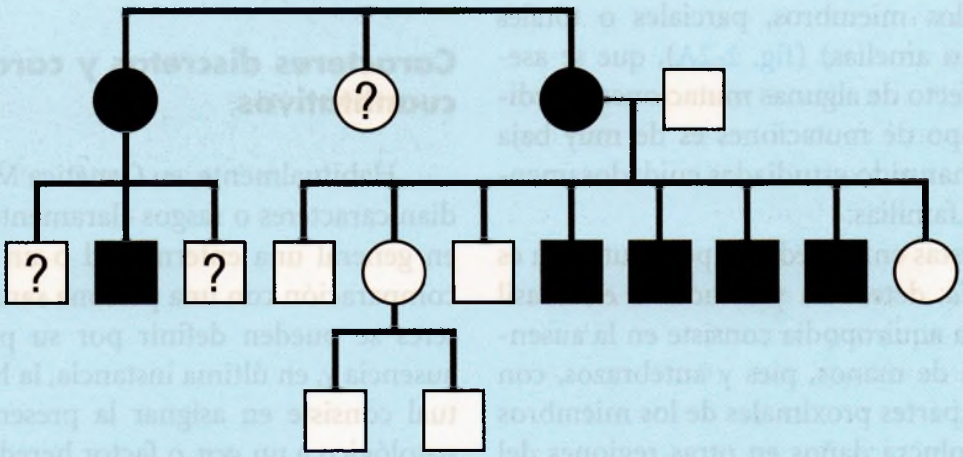


Fig. 1. Genealogía de varios pacientes con raquitismo hipofosfatémico. La mutación es dominante.[3]

No siempre el avance de la Genética Molecular es lineal. El gen humano responsable de la hipofosfatemia (*HYP*; esta sigla ha quedado para la enfermedad, mientras el gen es llamado *PHEX*), durante el proceso de su estudio, mostró imprevistamente que contiene la codificación de una proteína de tipo endopeptidasa neutra.[2] Esta proteína es una metaloproteasa porque se une a átomos de zinc. Por lo tanto, se le dio el nombre de PHEX (de *Phosphate, Endopeptidase*, cromosoma X) o FEX, en castellano. El gen *FEX* = *PHEX* posee 22 exones, ocupa unas 220 kb y su ADNc posee un marco abierto de lectura (véase cap. 4) de 2.247 pb que codifica la proteína de 749 aa y que posee tres regiones: 1) una región intracelular corta, 2) una región intramembranosa, que atraviesa la bicapa de la membrana celular y 3) una región extracelular con los "motivos" que coordinan átomos de Zn. Se han encontrado mutaciones puntuales de este gen en pacientes con hipofosfatemia (fig. 1).[3] El gen *PHEX* se transcribe activamente en los osteoblastos, no en las células renales,[4] de modo que su función está vinculada con la degradación de un polipéptido circulante en el plasma, el factor de crecimiento fibroblástico 23 (su sigla: FGF23), que es probablemente el factor que regula la pérdida de ión fosfato, con lo cual se está esclareciendo un sistema regulador del fosfato en el cual intervienen elementos circulantes (FGF23 y otros), enzimas (PHEX) y proteínas de la matriz extracelular.[5]

que no sólo las causas ambientales pueden simular el efecto de una mutación, sino que para un fenotipo determinado puede haber varios orígenes genéticos, provenientes de mutaciones de genes distintos; es decir que existe, en general, una *heterogeneidad de causas genéticas*, entre enfermedades reconocidas como hereditarias.

Fenocopias en malformaciones: efecto de la talidomida y amelias genéticas

Entre 1958 y 1963, en varios países europeos, y en Canadá y Australia, ocurrió una epidemia de malformaciones graves en recién nacidos de madres que inadvertidamente habían sido medicadas con talidomida en las semanas 4 a 6 del embarazo. Muchos de los bebés presentaban defectos de los miembros, parciales o totales (meromelias o amelias) (fig. 2-2A), que se asemejaban al efecto de algunas mutaciones hereditarias. Este tipo de mutaciones es de muy baja frecuencia y han sido estudiadas cuidadosamente en algunas familias.

Una de estas enfermedades por mutación es la *aquiropodia*, detectada y estudiada en Brasil (fig. 2-2B). La aquiropodia consiste en la ausencia congénita de manos, pies y antebrazos, con atrofia de las partes proximales de los miembros y que no involucra daños en otras regiones del organismo. Esta enfermedad se hereda con carácter autosómico (es decir, residente en cromosomas no sexuales) y recesivo. En 2001 se determinó que el gen mutado en la aquiropodia es el gen C7orf2 (del cromosoma 7, y hasta entonces el segundo "orf" o *marco abierto de lectura* de esa zona (véase cap. sobre mutación) [6,7] Dicha anomalía, descrita en familias de origen portugués, es muy rara, con una frecuencia estimada en 1 cada 3,3 millones de personas. Otras mutaciones, también raras, causan la falta completa de uno o más miembros (amelia) Precisamente la muy baja frecuencia de estas malformaciones y su incidencia mayor en ciertas familias es lo que llevó a sospechar que la epidemia de 1958-1963 podría ser un efecto ambiental (la medicación recibida)

Interpretación de las fenocopias

Muchos otros cuadros patológicos hereditarios comparten los signos (aunque no todos, por lo general) con otros que tienen un origen diferente; en cada caso un cuadro tiene un origen claramente ambiental, y otro, parecido, es hereditario. Así, la sordera congénita puede estar determinada por una mutación, o ser parte de un cuadro determinado por una mutación, como en el síndrome de Waardenburg (véase cap. 16), y en otros casos puede ser el resultado de la administración de estreptomicina en dosis altas durante la gestación o formar parte de las alteraciones fetales inducidas por el virus de la rubéola. La conclusión de estas observaciones es que la discriminación entre causas genéticas y causas ambientales siempre se debe tener en cuenta frente a un cuadro de etiología desconocida.

Caracteres discretos y caracteres cuantitativos

Habitualmente, en Genética Médica se estudian caracteres o rasgos claramente clasificables, en general una enfermedad o un síndrome, en comparación con una persona sana. Estos caracteres se pueden definir por su presencia o su ausencia y, en última instancia, la hipótesis habitual consiste en asignar la presencia del rasgo patológico a un *gen*, o factor hereditario responsable de esa enfermedad. Esta hipótesis general, que comienza con Gregorio Mendel, se ha desarrollado extraordinariamente, en especial en los últimos años, mediante el uso de las técnicas de la Genética Molecular, que han concretado la asignación de muchos cuadros patológicos a segmentos definidos y bien localizados del ADN humano (véase cap. 4) La transmisión hereditaria de estos rasgos patológicos asignados a genes concretos es básicamente la que obedece a las reglas de Mendel, por lo cual la herencia de este tipo de caracteres discretos (también llamados discontinuos) es mendeliana y, como usualmente es un solo gen el responsable del rasgo, también es llamada "monogénica" Algunos ejemplos de enfermedades de herencia monogénica, como la enfermedad de Huntington, las hemofilias A y

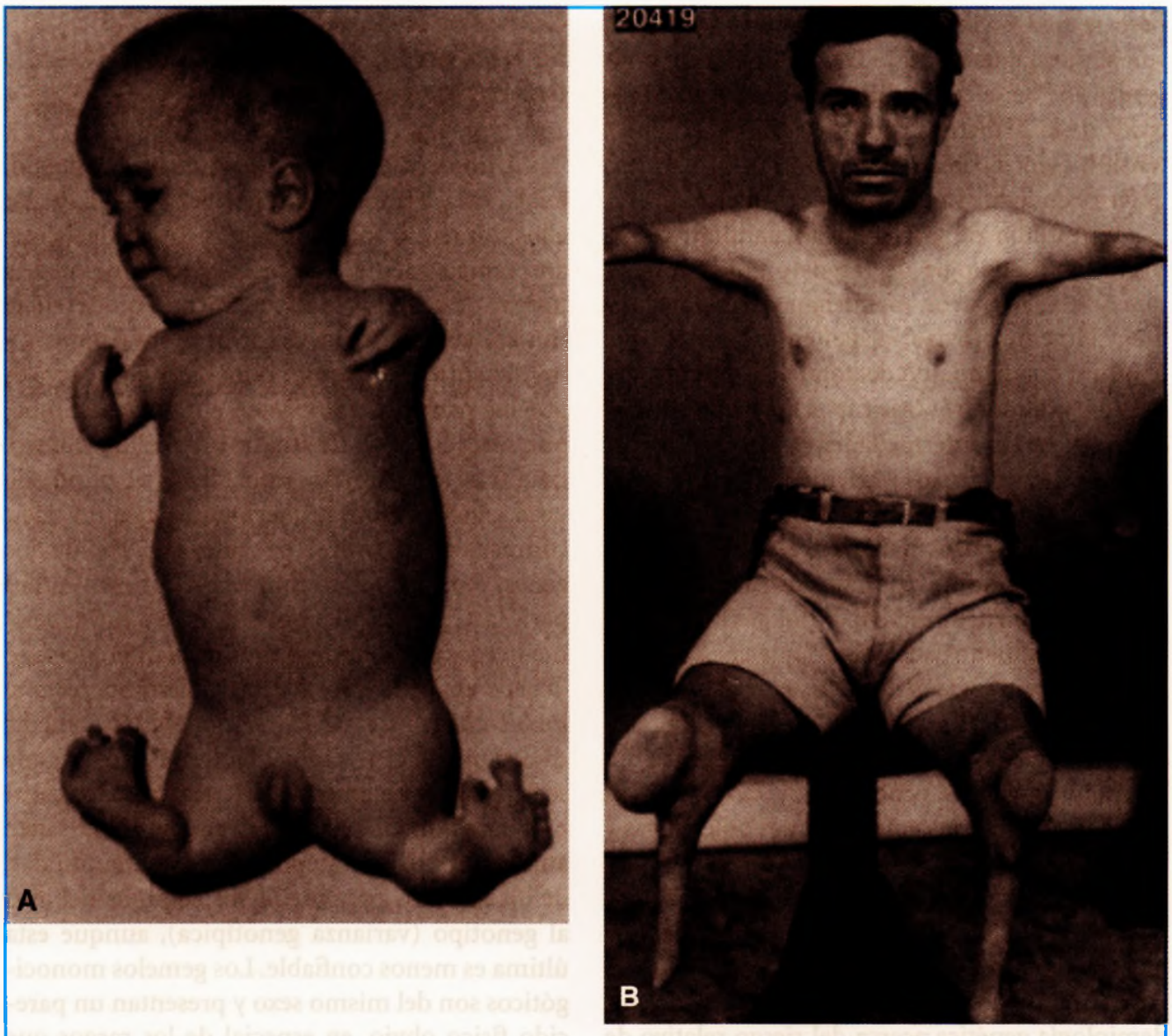


Fig. 2-2. A. Paciente afectado por el efecto de la talidomida durante la gestación. **B.** Paciente afectado por la mutación determinante de la aquiropodia. (**A.** Reproducida con autorización de Langman [Sadler]. Embriología médica, 7ª ed. Editorial Médica Panamericana, 1996. **B.** Reproducida con autorización de Buyse ML [ed]. Encyclopedia of Birth Defects, New York: Blackwell Sci. Publications, 1990).[6]

B, las neurofibromatosis I y II y otras serán explorados en los capítulos siguientes.

Otro tipo de rasgos heredables son, por ejemplo, la estatura, el color de la piel, el cociente intelectual y la presión arterial. Esos rasgos son *medibles* (por lo que se denominan métricos o continuos) y son estudiados por métodos estadísticos, bien desarrollados en la Biometría. Ellos han dado lugar a la disciplina de la Genética Cuantitativa (por lo que también se habla de herencia "cuantitativa") La diferencia entre la genética de los rasgos métricos y la de los rasgos monogénicos es sólo metodológica; en realidad, los rasgos cuantitativos derivan de la acción combinada de varios genes, a lo cual se agrega el factor ambiental (como en los monogénicos), lo que deriva en patrones de herencia que no son mendelianos. En estos casos se habla de "herencia poligénica", "herencia cuantitativa" y también (con algunas especificaciones, véase cap. 10) de "herencia multifactorial" Muchas enfermedades, en las cuales no hay un patrón claro de herencia,

pero sí una incrementada recurrencia familiar, son supuestamente causadas por "herencia poligénica" o "herencia multifactorial"; tales son los casos de la diabetes mellitus de tipo I, la hipertensión esencial, la esquizofrenia y muchas otras enfermedades de importancia en medicina.

El estudio de la Genética Cuantitativa respecto de la etiología de rasgos o enfermedades que no tienen patrón mendeliano de herencia es esencialmente provisorio, dado que se espera que el futuro conocimiento del total de las secuencias del ADN humano (véase cap. 4) permita asignar el origen de las enfermedades poligénicas a grupos de genes concretos y, además, se podrán establecer las relaciones entre ellos y el factor ambiental. En la actualidad, el estudio de los caracteres cuantitativos y de las enfermedades que se suponen de herencia poligénica es más difícil y está menos adelantado que el estudio de los rasgos patológicos discretos con patrones de herencia mendeliana (las que tienen proporciones mendelianas en la progenie, segregación, dominancia y recesividad, etc.)

El estudio de las enfermedades poligénicas y "rasgos complejos"[6] se realiza mediante una combinación de métodos biométricos, clínicos y de genética molecular en animales de experimentación y en personas. Entre estos métodos se cuentan los estudios en gemelos, los datos de epidemiología genética acerca del riesgo relativo de recurrencia en familiares del afectado, la restricción del estudio a los casos clínicos más severos y mejor definidos de cada tipo de enfermedad y el análisis de ligamiento (véase cap.11) Este estudio se realiza actualmente mediante la búsqueda de los genes causantes de enfermedades homólogas en animales.[7] Este último enfoque se basa en la mayor facilidad para lograr ubicar genes en animales cuyas cruzas pueden ser controladas y llevadas a cabo en grandes cantidades; si se localiza un gen en un animal, se lo aísla como un segmento de ADN (véanse caps. 3 y 4), y luego, dada la presencia de un importante grado de "conservación genética" entre mamíferos, se investiga la presencia de un gen homólogo en la especie humana, mediante las potentes herramientas derivadas de la hibridación de ácidos nucleicos (véase cap. 3)

Gemelos monocigóticos. Su uso en la determinación del factor hereditario

Uno de cada 87 nacimientos en promedio, en la raza blanca, corresponde a mellizos; de ellos, un tercio son monocigóticos, es decir que aproximadamente 1 de cada 290 nacimientos es un par de gemelos monocigóticos. La diferencia fundamental entre los gemelos monocigóticos y los dicigóticos (fraternos o mellizos comunes) es que los primeros comparten el mismo genoma, por ser derivados de una misma célula huevo, mientras los segundos son, desde el punto de vista genético, simples hermanos y, como tales, comparten en promedio sólo el 50% de los genes. Los gemelos monocigóticos son útiles para la Genética debido a que son un experimento genético natural. todas sus diferencias se deben, en principio, exclusivamente a *factores ambientales.* Además de ser útiles para medir directamente el efecto del factor ambiental, que se expresa en una medida estadística de los cambios ocasionados por el ambiente (varianza ambiental), se ha tratado de extender la utilidad de los gemelos para medir los cambios debidos al genotipo (varianza genotípica), aunque esta última es menos confiable. Los gemelos monocigóticos son del mismo sexo y presentan un parecido físico obvio, en especial de los rasgos que son más claramente de origen genético, como la coloración del iris y el tipo de cabello; fundamentalmente, expresan su genotipo idéntico al compartir numerosos marcadores bioquímicos, como el grupo sanguíneo, polimorfismos enzimáticos y polimorfismos de ADN (véase cap. 11), y morfológicos: su cariotipo es idéntico y sus dermatoglifos (véase más adelante) son parecidos, aunque *no idénticos*; desde el punto de vista médico sus tejidos son intercambiables en trasplantes, ya que son inmunológicamente idénticos.

Cuando se usan gemelos para determinar la importancia de los factores genético y ambiental, se clasifican los rasgos en dos grandes categorías: los *rasgos cuantitativos*, que son los medibles, y los *rasgos discontinuos* o *cualitativos*, que se aprecian por su presencia o su ausencia. Los rasgos cuan-

titativos pertenecen a la Genética Cuantitativa y a la Biometría; son ejemplos la estatura, el color de la piel medido en reflectancia, los coeficientes intelectuales y los recuentos de crestas dérmicas de los dermatoglifos (véase más adelante) Los rasgos cualitativos se refieren, en Genética Médica, a la presencia o ausencia de una enfermedad o un signo patológico.

En el estudio de la importancia de los factores ambiental y genético en los gemelos, es con veniente considerar separadamente los rasgos métricos o cuantitativos y los discretos. Respecto de los primeros, el objetivo es comparar la variabilidad del rasgo en los monocigóticos respecto de los dicigóticos o fraternos; para ello, se evalúa la varianza en cada serie (monocigóticos y dici góticos) La varianza (medida estadística) es $V = \Sigma d^2/N$, donde N es el número de pares de gemelos y "d" es la diferencia de cada medición con la media de ese conjunto.

Las diferencias, estimadas por las varianzas, entre los pares de monocigóticos y los pares de fraternos pueden indicar, en principio, la importancia relativa del factor genético, puesto que teóricamente los monocigóticos sólo difieren por factores ambientales, y los fraternos, en cambio, tienen dos fuentes de variación. la genética (sólo poseen el 50% de genes en común, en promedio) y además el factor ambiental. De allí se ha propuesto una "partición de la varianza", en la cual la de los monocigóticos, V_m, es igual a la varianza debida al ambiente, V_a, y la varianza de los fraternos, V_f, es: $V_f = {}^1{}_2 V_g + V_a$, donde V_g es la varian za genética (considerada $^1/_2$ respecto de la pobla ción general, ya que comparten el 50% de sus genes) Si se resta la varianza de monocigóticos de la de fraternos, se obtiene:

$$V_f - V_m = {}^1/_2 V_g$$

de donde se mide la varianza genética, y si se la compara con la total, se obtiene una medición de "heredabilidad" (H) del rasgo:

$$H = V_g / (V_g + V_a)$$

La "heredabilidad" así concebida ha sido usada para estimar el factor genético en la estatura (alrededor del 80%), en el peso del adulto en cada sexo (muy escasa) y en el coeficiente intelectual (Binet) (dispar, entre 80% y muy baja). Los resultados son generalmente ambiguos, debido a las varias fuentes de error en este procedimiento, que debería ajustarse a criterios estadísticos estrictos para no dar resultados irrelevantes.[8,9] En general, esta "partición de la varianza" tiende a exagerar la importancia del factor genético ("heredabilidad"), por ejemplo, en las mediciones de cociente intelectual, si los gemelos monocigóticos reciben un trato más parecido que el de los fraternos (como generalmente es el caso), la varianza ambiental no es la misma que para los fraternos, y la fórmula no es exacta, lo cual está de acuerdo con los datos de gemelos monocigóticos criados en forma separada. De todas maneras, puede admitirse que esta "heredabilidad" sugiere una tendencia, en especial para los rasgos físicos bien definidos, como la estatura.

Respecto de los rasgos cualitativos, se denomina *concordancia* al grado en el que los gemelos presentan el mismo rasgo o enfermedad; y *discordancia*, al grado de diferencia entre ellos respecto de ese rasgo. La presencia de numerosas enfermedades sospechadas de herencia poligéni ca o multifactorial ha sido estudiada en gemelos. Para ser relevantes, los datos deben ser corregi dos respecto del método de diagnóstico o clasificación de la enfermedad usado en cada caso y, además, se deben cumplir otros requisitos.[8]

De las diferencias de concordancia entre la serie de monocigóticos y la de fraternos, se puede también estimar la "heredabilidad", que muestra tendencia a ser alta en ciertas enfermedades como la hipertensión arterial, la diabetes, la esquizofrenia, la psicosis maníaco-depresiva o enfermedad bipolar y el paladar hendido, entre otras (fig. 2-3)

Estos estudios sobre heredabilidad son complejos y de resultados controvertidos. Se ha estudiado, por ejemplo, la heredabilidad de rasgos cognitivos ("inteligencia") en 110 pares de mellizos homocigóticos concluyendo que diversos aspectos cognitivos tienen heredabilidades entre el 32 y el 62% (McClearn et al., 1997). Otro estudio posterior encontró que la heredabilidad para un factor general de inteligencia ronda el 50% y

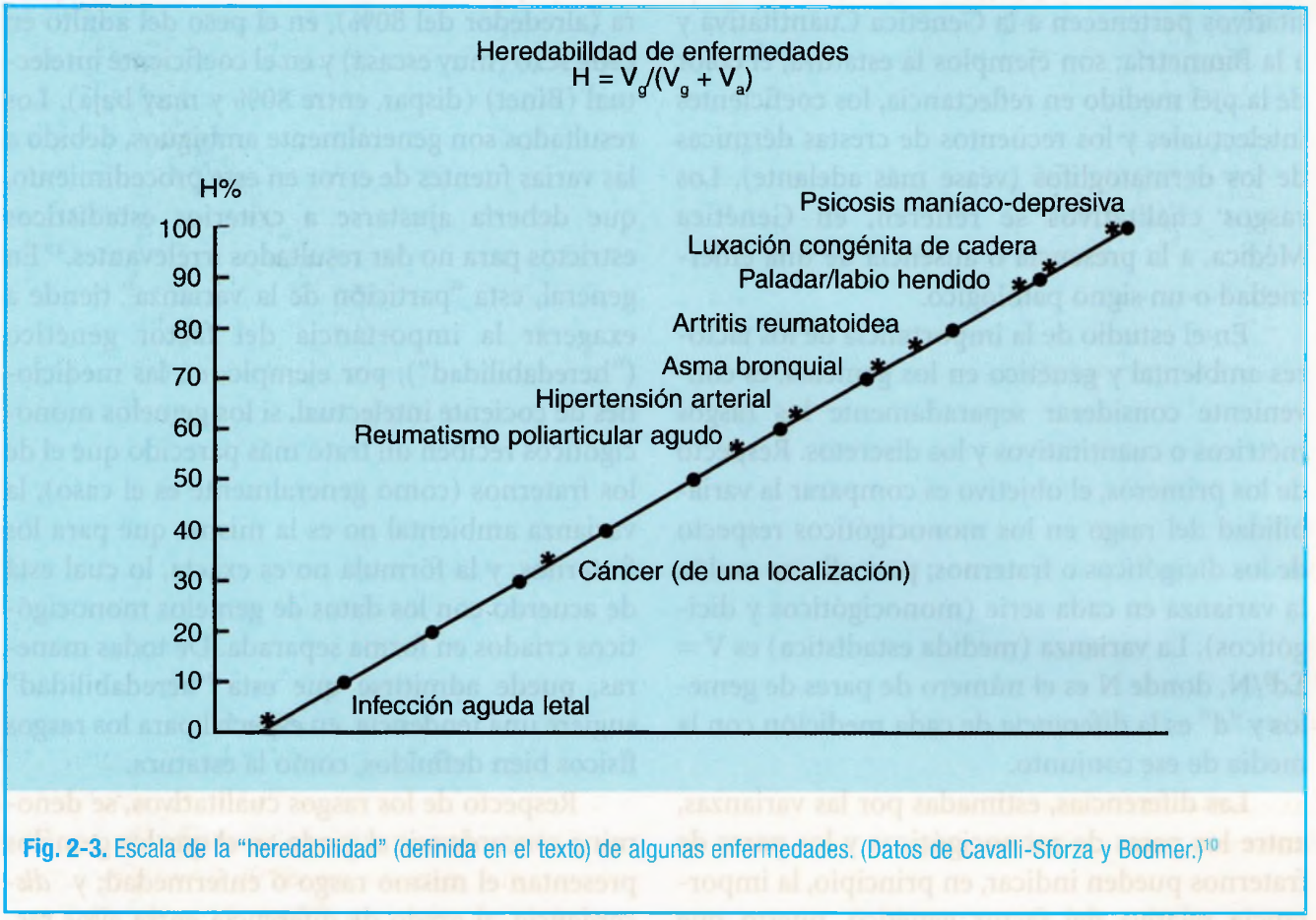


Fig. 2-3. Escala de la "heredabilidad" (definida en el texto) de algunas enfermedades. (Datos de Cavalli-Sforza y Bodmer.)[10]

que al menos 18 loci están asociados con su desarrollo (Deary et al., 2009) En términos generales, la genética de rasgos de la conducta humana es todavía incipiente.

Herencia de caracteres cuantitativos. Dermatoglifos

Los caracteres cuantitativos son heredables, de la misma manera que los discretos, puesto que unos y otros están codificados en el ADN del núcleo celular. Sin embargo, la herencia de los caracteres cuantitativos no aparenta regirse por las leyes de Mendel, simplemente porque estas leyes se refieren exclusivamente a caracteres determinados por un solo gen, y los caracteres cuantitativos están determinados por más de un gen (de ahí el nombre de herencia poligénica)

Un ejemplo ilustrativo de la herencia poligénica, de importancia en Medicina, es la de los *dermatoglifos*, que son los patrones de dibujo de las crestas dérmicas en los dedos, en las palmas y plantas, y que dan lugar a las huellas digitales usadas para la identificación de personas. Cada cresta de la piel en estas zonas está formada por la sucesión lineal de las desembocaduras de las glándulas sudoríparas, que es posible observar con lupa como una hilera de orificios a lo largo de la cresta. Las crestas se disponen según dibujos específicos, que se pueden clasificar en tres tipos principales: 1) arcos, 2) presillas o asas y 3) verticilos o remolinos (fig. 2-4) Las crestas dérmicas se forman en el embrión temprano, entre la semana 13 y la semana 15 del desarrollo; una vez formadas las crestas, los dibujos resultantes de las crestas permanecen inalterados por el resto de la vida. No se evidencia prácticamente ningún factor ambiental en el desarrollo de estos dibujos, puesto que en los gemelos monocigóticos el *recuento de crestas* es muy similar. La correlación entre las medidas de crestas dérmicas ("recuento total de crestas", véase más adelante) entre gemelos monocigóticos es del 95%, y el 5% restante sólo puede asignarse a varianza ambiental

Fig. 2-4. Esquema de los tres patrones principales de dibujos de crestas dérmicas. **A.** Arco (no tiene trirradio). **B.** Presilla (= asa); tiene 1 trirradio (horqueta). **C.** Verticilo; tiene dos trirradios. Las líneas unen cada trirradio con el centro del dibujo y sirven para el "recuento total de crestas"

durante la época embrionaria, es decir, durante la formación de las crestas.[11]

Recuento total de crestas. Variaciones patológicas

Los dibujos formados por las crestas se clasifican en los tres patrones principales, que se caracterizan por el número de trirradios. Se denomina *trirradio* a una bifurcación en forma de horqueta de una cresta; cada trirradio separa tres regiones de crestas y su posición es relativamente constante. Los arcos no tienen trirradio, las presillas tienen uno y los verticilos habitualmente tienen dos. La línea extendida entre un trirradio y el centro del dibujo define el lugar y el número de las crestas que se cuentan, es decir, todas las crestas que cruzan dicha línea. Para obtener el valor del "recuento total de crestas" (RTC) se suman todos los números obtenidos en los diez dedos. Este recuento es una cifra estadística importante e invariable respecto de la edad. Es distintiva la diferencia entre sexos: la media del RTC en varones de raza blanca es 144, y la media en mujeres es 127 [11]

La distribución de este recuento (RTC) en una población varía entre 0 y 300, y tiene una distribución prácticamente acorde con la curva "normal" (o de Gauss, en Estadística) salvo un ligero sesgo negativo (a la derecha) Este tipo de distribución "normal" o gaussiana es típica de los rasgos de herencia cuantitativa (en teoría, puesto que en la práctica hay desviaciones) (fig. 2-5)

La *herencia* del recuento total de crestas es típica. de padres a hijos, se transmite una similaridad del 50%, es decir que coincide con la proporción promedio de genes comunes entre un progenitor y un hijo. Esto es demostrado por el coeficiente de correlación de los recuentos en una serie de pares progenitor-hijo: este coeficiente es de 0,48 o 0,49 [11] El coeficiente de correlación entre gemelos monocigóticos es 0,95 y el de dicigóticos coincide con el de hermanos (0,49)

El RTC está alterado en un número de cromosomopatías (véase cap. 17); en especial, es notable su alteración en las polisomías sexuales, en las que, a medida que el número de cromosomas sexuales aumenta, el RTC disminuye, con una tasa de aproximadamente 30 crestas menos por cada cromosoma X o Y excedente.[12]

La interpretación de la herencia del RTC y sus variaciones posiblemente estriba en su codificación en un número no muy grande de genes (pero por lo menos 5 para dar un patrón casi normal en las distribuciones) que operan en el embrión en las semanas 13-15, cuando se establecen estas crestas. Estos genes codificadores pueden formar una *familia génica*, un ejemplo típico de familia génica son los genes *HOX*, que intervienen en el desarrollo de los miembros (véase cap. 16) Estos genes, para determi

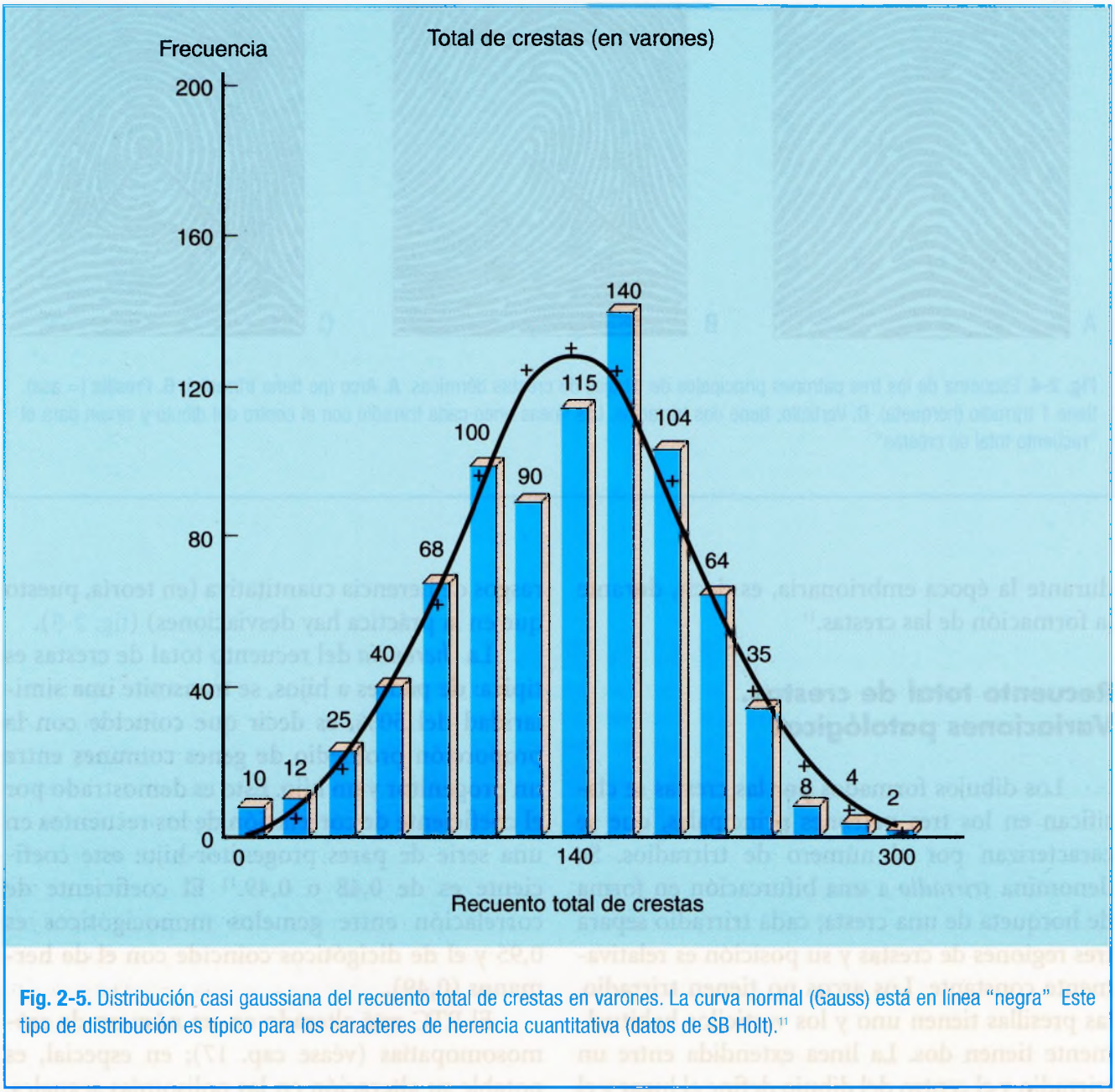


Fig. 2-5. Distribución casi gaussiana del recuento total de crestas en varones. La curva normal (Gauss) está en línea "negra" Este tipo de distribución es típico para los caracteres de herencia cuantitativa (datos de SB Holt).[11]

nar un carácter cuantitativo como el RTC, deben operar *aditivamente*, es decir que cada uno de ellos contribuye con una porción relativamente pequeña del total de crestas. No hay mayores diferencias de potencia entre ellos, y se excluye la dominancia de uno sobre otros. En realidad, es posible que esta sumatoria de efectos parciales esté compuesta por aportes desiguales, que se nivelan por interacciones con otros genes. Este tipo de interpretación es válida para otros rasgos poligénicos y, en especial, para enfermedades de origen hipotéticamente poligénico.

Alteraciones de los patrones de dibujo en los dermatoglifos

Si bien el diagnóstico estándar en las cromosomopatías se hace mediante el análisis del cariotipo (véase cap. 17), el recuento total de crestas y los dibujos de los dermatoglifos tienen un cierto valor accesorio para el diagnóstico de cromosomopatías, en especial el síndrome de Down, y para casos de retardo mental en los cuales se debe precisar si la causa es ambiental o genética. Los dibujos, la posición de los trirradios y otras particularidades son usados como

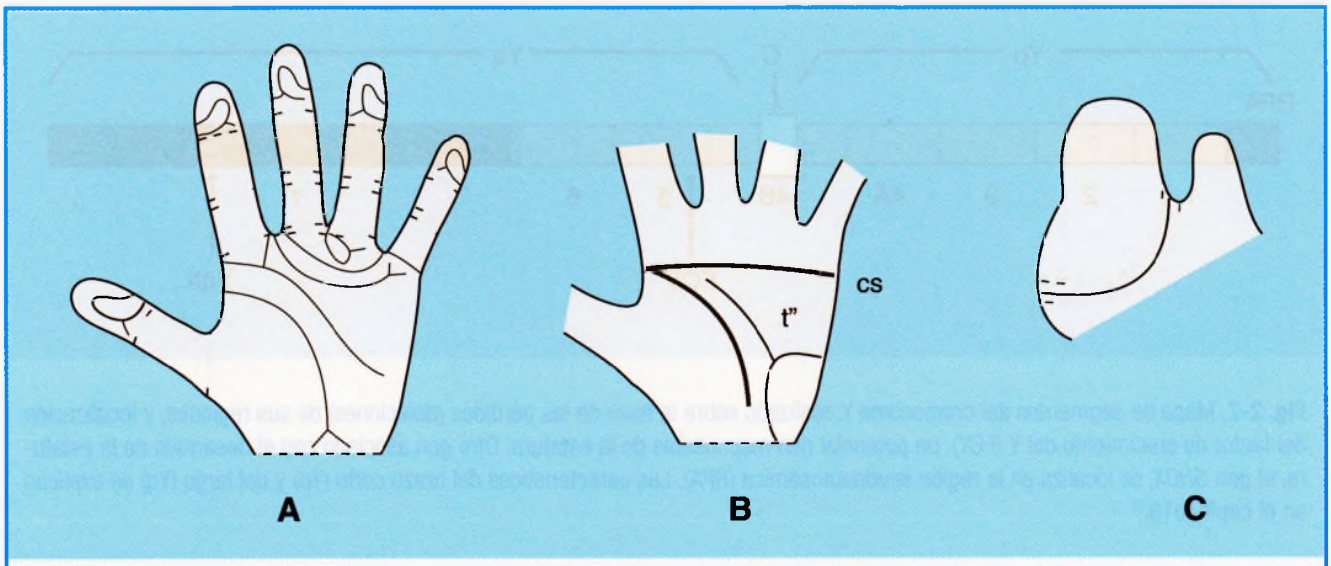


Fig. 2-6. A. Dibujos palmares normales. **B.** Cresta o pliegue simiano (cs) y trirradio axial t" desplazado distalmente en el síndrome de Down. **C.** Arco tibial plantar en el síndrome de Down.

caracteres cualitativos (ausencia o presencia, localización después de un límite) o también en forma numérica, asignando un valor diagnósti co a cada ítem.[13-15] Los dibujos de las yemas de los dedos tienen frecuencias características; los más comunes son presillas hacia el lado cubital (las presillas se clasifican por el lado al cual se *abren*, radial y cubital o distal) Cuando hay una alta frecuencia de arcos en los dedos (más de seis), se puede sospechar la trisomía del cromosoma 18 (véase cap. 17)

Los dibujos palmares y plantares son indi cadores de valor en el síndrome de Down. En la palma, en la base de los dedos, las cuatro regiones basales de los dedos 2-5 (índice-meñique) tienen trirradios que pueden desplazarse en casos patológicos pero el dato de mayor importancia es la localización del *trirradio axial*, normalmente muy cerca del pliegue de la muñeca en la base de la mano (fig. 2-6) y desplazado distalmente en el síndrome de Down. Además, se observan los pliegues de flexión (no son dermatoglifos, son lugares de fijamiento de la piel a la aponeurosis), que usualmente son tres, dos transversales y uno en la base de la eminencia tenar. En el síndrome de Down, es muy frecuen te que los dos transversales estén reemplazados por uno solo, llamado "pliegue simiano", aun que disminuye un poco su valor diagnóstico porque alrededor del 5% de los controles normales pueden tenerlo. La línea de Sydney es un pliegue (proximal) que se extiende hasta el borde cubital de la mano. Respecto de las plan tas, el dibujo normal más frecuente es una presilla distal. El reemplazo del dibujo normal por uno muy simple, el *arco tibial* (sin trirradio) es valioso para el diagnóstico del síndrome de Down (el coeficiente de su frecuencia en el síndrome de Down es 150 veces mayor respecto del normal)

Otros caracteres cuantitativos. Genes para la estatura según los estudios de amplitud genómica

La localización y el aislamiento de los genes codificantes de caracteres cuantitativos son mucho más difíciles que los de los caracteres discretos. En el caso de la estatura, que es un carácter cuantitativo muy estudiado en Biometría, se superponen los efectos de varios genes y, además, los efectos ambientales. Hasta la primera década del año 2000 las evidencias sobre genes para estatura estuvieron restringidas a los efectos de anomalías cromosómicas tales como el síndrome de Turner (con baja estatura, véase cap. 17) que fue-

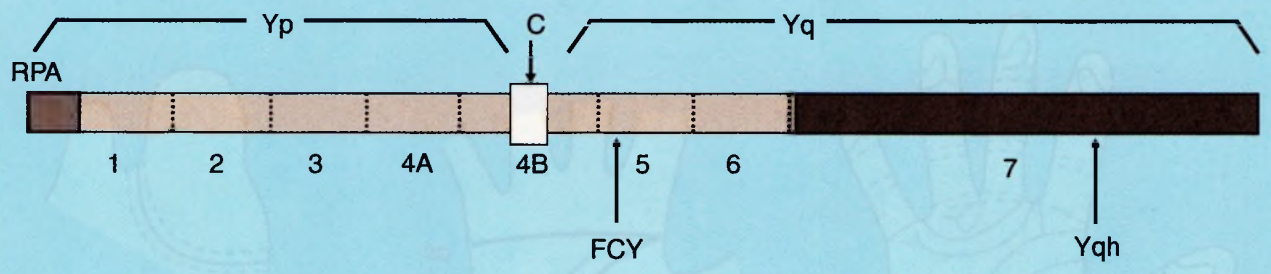


Fig. 2-7 Mapa de segmentos del cromosoma Y, realizado sobre la base de las pérdidas (deleciones) de sus regiones, y localización del factor de crecimiento del Y (FCY), un potencial gen responsable de la estatura. Otro gen asociado con el desarrollo de la estatura, el gen *SHOX*, se localiza en la región seudoautosómica (RPA). Las características del brazo corto (Yp) y del largo (Yq) se explican en el capítulo18.[20]

ron relacionados con la presencia de un solo cromosoma sexual portando el gen *SHOX* en la región seudoautosómica, que es importante para el desarrollo del cartílago y del hueso. Los varones con cromosomas XYY (véase cap. 17) son a su vez más altos, en promedio, que los varones XY normales. También los pacientes con disgenesia gonadal y cromosomas XY (véase cap. 10) son más altos que los pacientes con esa disgenesia y cromosomas XX. Sin embargo, la acción de un único gen en los cromosomas sexuales no concuerda con el carácter eminentemente cuantitativo del rasgo de la estatura, y las deleciones del gen *SHOX* o de un factor de crecimiento del Y (fig. 2-7) no son relevantes más que para pacientes individuales con ciertos síndromes, por lo que este tema solamente comenzó a retomar interés cuando se iniciaron *estudios de amplitud genómica* para la asociación de rasgos (véase cap. 13)

Estos estudios genómicos fueron posibles a partir de la disponibilidad de analizar genomas completos en forma rápida en poblaciones adecuadas para la búsqueda de una asociación con el rasgo buscado. Además fueron necesarios los adelantos en bioinformática para analizar grandes masas de datos genéticos. Se pudo entonces establecer que muchos fenotipos de interés médico se comportan como rasgos cuantitativos,[16] y también lo hacen ciertos rasgos normales como la estatura.[17]

La estatura posee una heredabilidad del 80% y estos estudios han identificado al menos 40 loci relacionados con variaciones de la estatura.[18] Algunos de estos loci con alta significación estadística para su asociación con estatura están localizados en los siguientes sitios cromosómicos: 1p21, 6p25; 9q22, 14q23, Xq24 y 17q24. Un estudio posterior agregó otros loci significativos, en 12q13 (región que contiene el gen para el receptor de vitamina D, *VDR)* y en 15q25 (que contiene un receptor para un factor de crecimiento) [19]

Estos estudios están en sus comienzos, pero ya evidencian la verdadera naturaleza poligénica de la heredabilidad de la estatura.

Generación de caracteres continuos o través de lo segregación de varios genes cooperativos: color de la piel humana

Un carácter continuo, como la estatura o el recuento de crestas dérmicas, es el resultado de la acción de más de un gen, con el agregado del factor ambiental, como es el caso de la estatura. Otro carácter continuo es el color de la piel en la especie humana, que también está condicionado por varios factores genéticos y factores ambientales. Aunque no se conoce el número exacto de genes que intervienen en el color de la piel, se ha demostrado que hay al menos once genes candi

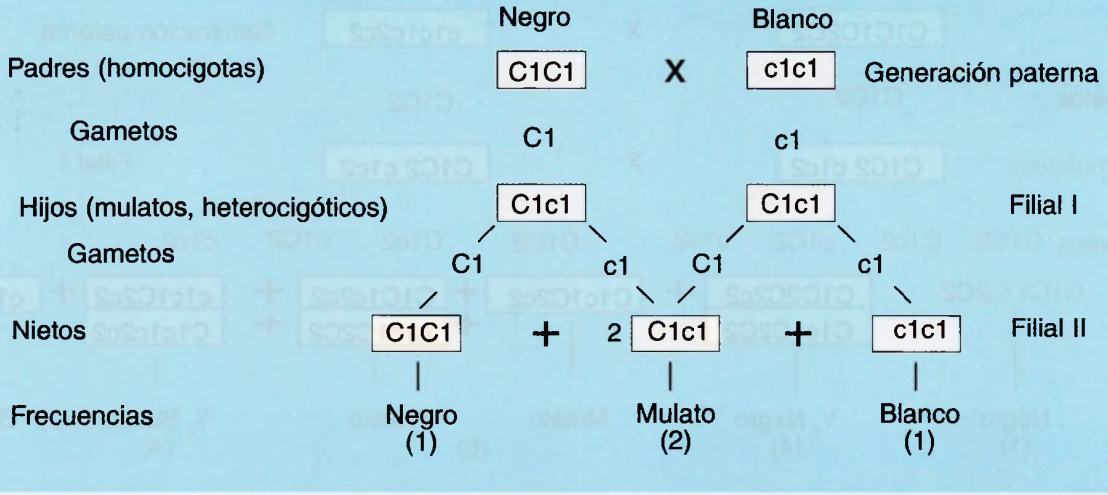


Fig. 2-8. Esquema de herencia basado en un solo gen de color de la piel.

datos para intervenir en este proceso.[21] Como es la regla en la herencia de caracteres continuos, se postula que cada gen tiene un efecto parcial sobre el color final, que los efectos de diferentes genes son aditivos (se suman), que no hay dominancia de un gen sobre otros, ni otro tipo de interferencia mutua entre los genes. Además, para esquematizar este tipo de herencia, se postulan algunas presunciones sobre la población: que las cruzas (casamientos) no son afectadas por el rasgo cuantitativo, es decir que no hay una preferencia por el color, sino que son al azar y que las poblaciones que se analizan se hallan en equilibrio respecto de sus genes. Si se dan por sentadas esas presunciones, se puede analizar cuáles son los resultados si el color de la piel resulta de un solo gen o de dos genes: el primer gen será C1 para color oscuro y c1 su gen homólogo o alelo para la falta de color; de la misma manera, C2 para el segundo gen de color y c2 para su alelo de carencia de color. De acuerdo con las reglas de Mendel, en el primer caso (un solo gen determina el color) y considerando que los padres son puros para el gen, es decir que sus dos genes alelos son idénticos (condición llamada "homocigota"), el esquema de herencia será el observado en la figura 2-8.

Este esquema, basado en un solo gen de color de la piel, llevaría a una transmisión mendeliana con la aparición de clases segregantes puras (negro puro y blanco puro) en la tercera generación, y con frecuencias del 25%, lo cual no corresponde a la realidad.

El segundo esquema, basado en dos genes de color, da los resultados presentados en la figura 2-9.

Como se observa, en este esquema de dos genes, en la tercera generación también se segregan los tipos puros, pero en menor proporción ($^1/_{16}$), se crean clases intermedias de color de piel y el máximo de frecuencia corresponde a mulatos.

Si se procede igual con un esquema de *tres* genes para color, las clases de descendencia en la filial II (tercera generación) serán siete (se crearon nuevas clases intermedias), y sólo $^1/_{64}$ es la frecuencia de una clase pura (blanca o negra), mientras que se han suavizado las diferencias entre clases que se producen con las frecuencias: 1, 6, 15, 20, 15, 6 y 1, entre las extremas negra y blanca.

Si se realiza un gráfico de cada uno de los esquemas, es posible ver que, a medida que aumenta de 1 a 3 el número de genes involucrado en el rasgo, la distribución del rasgo (clases de color de la piel) se aproxima a una distribución parecida a la curva de Gauss (véase antes), que es característica de los rasgos continuos (fig. 2-10). Si a esto se le agrega la variación introducida por el ambiente, se suavizan aún más las diferencias

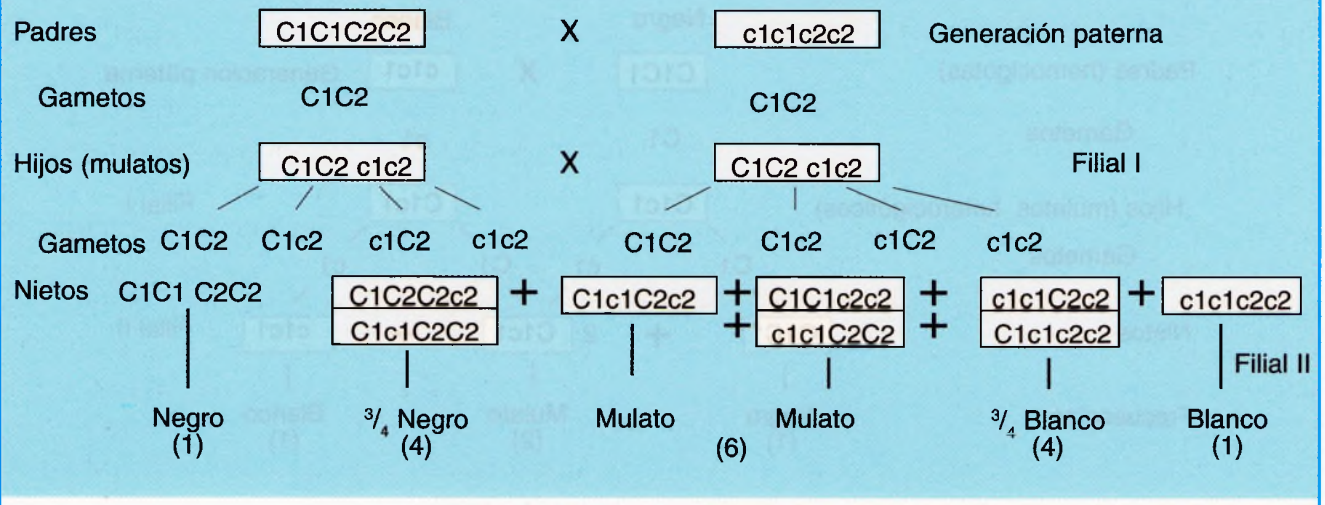


Fig. 2-9. Esquema de herencia basado en dos genes de color de la piel.

entre clases y se tiende a una distribución continua, normal o gaussiana.

Como se mencionó antes, la localización de genes de caracteres continuos no es sencilla, y su estimación por métodos estadísticos puede ser ambigua antes de la utilización de los estudios de amplitud genómica.[18] Sin embargo, dada la importancia de las enfermedades que se suponen de naturaleza poligénica, como la diabetes, la hipertensión arterial y otras, estos datos han sido importantes para guiar la búsqueda de los genes respectivos mediante las técnicas moleculares.

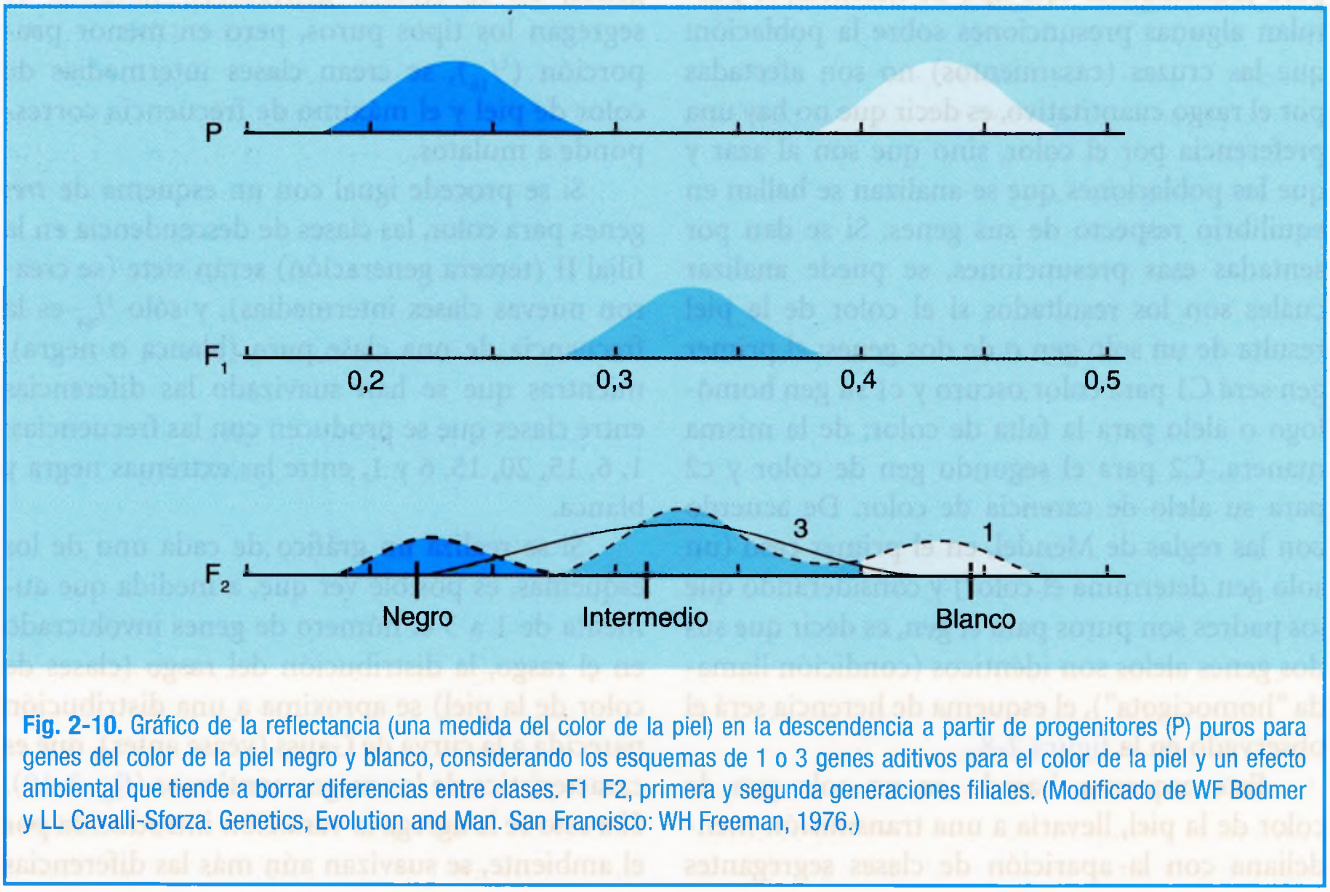


Fig. 2-10. Gráfico de la reflectancia (una medida del color de la piel) en la descendencia a partir de progenitores (P) puros para genes del color de la piel negro y blanco, considerando los esquemas de 1 o 3 genes aditivos para el color de la piel y un efecto ambiental que tiende a borrar diferencias entre clases. F1 F2, primera y segunda generaciones filiales. (Modificado de WF Bodmer y LL Cavalli-Sforza. Genetics, Evolution and Man. San Francisco: WH Freeman, 1976.)

Complejidad en la relación entre genes y caracteres: pleiotropía y penetrancia

La relación entre genes y caracteres no es necesariamente: un gen = un carácter; generalmente es más compleja, dado que los genes (codificantes son segmentos de ADN que codifican una proteína (véanse caps. 4 y 5), y una proteína generalmente tiene efectos sobre varios tejidos u órganos del organismo. Cuando la alteración de un gen determina efectos en varios órganos y funciones, *aparentemente desvinculados*, se habla del efecto *pleiotrópico* de ese gen. Los efectos pleiotrópicos son comunes y encuentran su explicación en las distintas funciones de una proteína. Por ejemplo, uno de los genes del colágeno, el *COL1A1*, se encuentra alterado en la enfermedad llamada *osteogénesis imperfecta*, caracterizada por fracturas espontáneas (por defecto del colágeno en el hueso), color azulado de la esclerótica (por deficiencia de colágeno en la esclerótica) y sordera congénita (por alteración del colágeno en la cadena de huesecillos del oído medio)

Más dificultades son causadas por la denominada *penetrancia* incompleta de un gen: esto es, que el efecto del gen puede estar presente sólo en un porcentaje determinado de las personas portadoras de ese gen. La penetrancia es completa (100%) cuando siempre se observa el efecto en el fenotipo, ya sea cuando es un gen dominante (con un solo gen alterado presente), o cuando es recesivo (con dos genes alterados) Hay numerosas enfermedades mendelianas cuyos genes causantes tienen penetrancia incompleta.

En el ejemplo citado antes, el gen causante del raquitismo hipofosfatémico presenta penetrancia incompleta en las mujeres portadoras del gen, que sólo en pocos casos muestran deformaciones óseas; sin embargo, los niveles de fosfato en la sangre están alterados, de modo que la penetrancia incompleta se manifiesta en el aspecto pero no en los datos de laboratorio. Otra razón de penetrancia incompleta es la aparición de síntomas a edad variable, por ejemplo en la corea de Huntington (véase cap. 9) Algunas personas que portan este gen dominante fallecen antes de llegar a la edad de desarrollo de los síntomas y son anotados como casos "negativos" Es probable que la causa más frecuente de penetrancia incompleta sea la interacción génica entre el gen mutante y otros genes que forman el "trasfondo genético" de cada persona, que es variable en miembros de una misma familia. Un gen mutante puede ver inhibida su expresión cuando ésta se encuentra regulada por factores de transcripción diferentes en distintos miembros de la familia (véase cap. 5) En general, la penetrancia incompleta se observa con genes dominantes, lo cual hace que esa dominancia parezca irregular.

Se dice que un gen tiene *expresividad variable* cuando el cuadro ocasionado por este gen comprende rasgos que aparecen con intensidad variable o en edades variables; de esta manera, la aparición de síntomas de la enfermedad de Huntington a edades variables es también un ejemplo de expresividad variable. Muchos cuadros de enfermedades hereditarias presentan rasgos de expresividad variable. Nuevamente, esta variabilidad fenotípica puede no corresponderse con variabilidad en el nivel molecular; por ejemplo, en la anemia falciforme los síntomas pueden ser variables pero el tipo de proteína anormal (hemoglobina S; véase cap.15) está siempre presente en los enfermos. En general, puede interpretarse que estos fenómenos a nivel del fenotipo son explicables por los mecanismos de operación de los genes, y los nombres de penetrancia, expresividad y efectos pleiotrópicos generalmente encubren el desconocimiento del mecanismo de acción de ese gen particular o de su proteína.

La heterogeneidad genética de enfermedades hereditarias

En las últimas décadas se ha afirmado la idea de que la mayor parte de las enfermedades hereditarias son entidades de origen múltiple; es decir que al hablar de una determinada enfermedad (p. ej., la fibrosis quística), se debe pensar no en una única mutación determinante de la enfermedad, sino en múltiples mutaciones, cada una en un lugar distinto del gen, que alteran su función parcial o totalmente. Este tipo de

heterogeneidad es llamada *intraalélica o intragénica*, porque se trata de diversas mutaciones dentro del mismo gen o alelo. Esta heterogeneidad es la regla: hay enfermedades que pueden ser causadas por muchas diferentes (cientos) mutaciones del mismo gen, por lo cual se debe investigar el "espectro de mutaciones" de cada gen (véase cap. 8)

Otro tipo de heterogeneidad es *interalélica*, es decir que varios genes diferentes pueden originar la enfermedad; un caso típico es el de las retinitis pigmentarias, que pueden originarse en por lo menos sesenta genes diferentes (véase cap. 16, Ciliopatías).

Muchas de estas causas de complicación de la relación entre el fenotipo y los genes se han aclarado a medida que se conoce el mecanismo molecular de las enfermedades hereditarias, por lo cual es conveniente resumir este enfoque molecular de las enfermedades humanas. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de nueva información brindada por la descodificación del ADN humano, las relaciones entre el genotipo y el fenotipo son, esencialmente, *indirectas y complejas.*

El enfoque malecular de las enfermedades hereditarias; del ADN al fenotipo

Básicamente, la Genética Molecular postula que los caracteres hereditarios (discretos y continuos) están de alguna manera codificados en el ADN del núcleo celular; en realidad, se postula que este ADN codifica proteínas (y también los ARN), de cuyo funcionamiento finalmente depende la aparición de dichos caracteres. De esta manera, la relación ADN-caracteres es siempre indirecta y sujeta a su concreción en el complejo ambiente interno de la célula. Además, el proceso de flujo de la información desde el ADN no es simple, sino que consiste en pasos regulados que pueden ser modificados (véase cap. 5). Se tiene entonces una codificación en los segmentos del ADN, que en un primer paso es *transcripta* en ARN (transcripto primario); luego este ARN es *procesado* hasta transformarse en un ARN mensajero, apto para ser usado como molde o templado en los ribosomas, para efectuar la *traducción* de esta información en una secuencia de aminoácidos de una proteína, la cual generalmente es *modificada* antes de convertirse en una *proteína funcional* (fig. 2-11)

Hasta aquí, la secuencia es muchas veces lineal, es decir que a segmentos del ADN le corresponden secuencias de aminoácidos de una proteína codificada. De aquí en adelante, el flujo de la información es menos lineal, la proteína puede intervenir en diferentes reacciones metabólicas, puede integrar la estructura de algún organoide o puede ingresar en el núcleo para actuar como *regulador* en la descodificación de otros genes; es decir, puede efectuar múltiples funciones, incluso afectar la función de otros genes diferentes del que la codificó a ella. Además, las proteínas suelen interactuar y, al hacerlo, están confluyendo las informaciones de dos (o más) genes. Finalmente, la función de las proteínas está sujeta a cambios ambientales que inciden sobre la célula. A pesar de esta diversifi

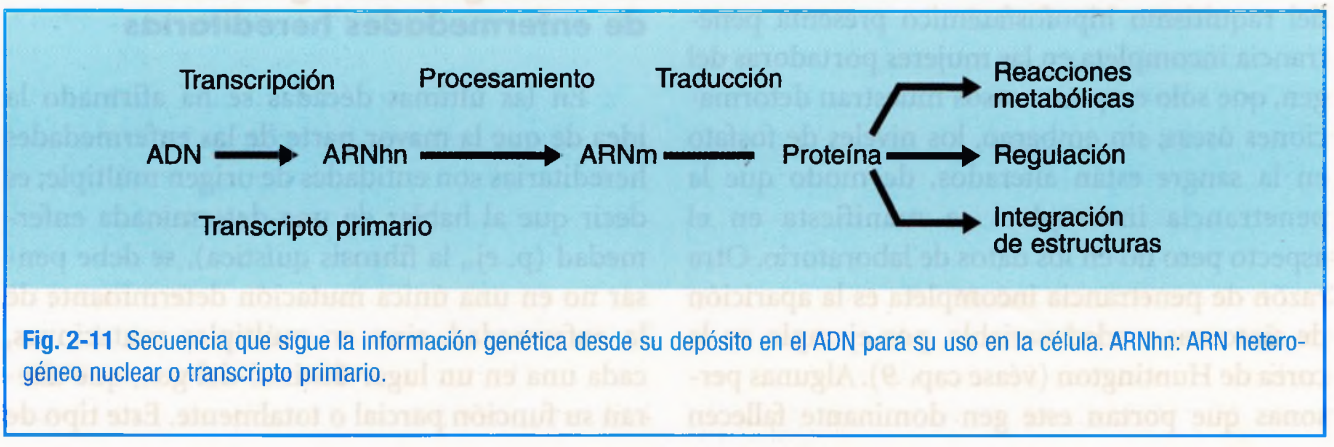


Fig. 2-11 Secuencia que sigue la información genética desde su depósito en el ADN para su uso en la célula. ARNhn: ARN heterogéneo nuclear o transcripto primario.

cación final, toda la primera parte del proceso, que es lineal, puede abordarse mediante las técnicas moleculares con gran provecho. En este sentido, el procedimiento seguido observa generalmente estos pasos: primero, por los datos de transmisión familiar, se trata de vincular el gen causante de la enfermedad con algún "marcador" de un cromosoma y luego se trata de localizarlo en una región del cromosoma, luego se aísla ADN de esa región, con uno o más marcadores incluidos; ese ADN se investiga para secuencias *conservadas* en otras especies, como lo son los genes; con posterioridad, uno por uno se identifican los ARN mensajeros transcriptos por cada gen, buscando un ARN de secuencia anormal; finalmente, se trata de correlacionar la secuencia anormal con la presencia de la enfermedad y se realiza una contraprueba, en una especie animal, inactivando ese gen (*noquear* el gen) y analizando qué efectos produce en el fenotipo. Este tipo de método se denomina a veces *análisis posicional.*

Aplicación de las técnicas moleculares: enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y sus variedades

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) o atrofia muscular peronea es en realidad un grupo de enfermedades hereditarias relativamente frecuentes (1 en 2.500 nacimientos) Su forma clínica más común "(CMT1A)", corresponde a una mutación autosómica dominante y consiste en una enfermedad desmielinizante de los nervios periféricos (motores y sensitivos) Hay otras formas clínicas menos frecuentes, que corresponden a otros genes diferentes del de la primera forma, y en los últimos años se ha incrementado tanto el número de genes que pueden intervenir (hasta 26 genes en 2003, véase panel 2.1), como las variedades clínicas menos frecuentes. Los signos de la enfermedad, en su forma clásica son: debilidad y atrofia de los músculos peroneos, deformidad de los pies (pie cavo), conducción nerviosa disminuida en el nervio mediano e incidencia familiar, de patrón dominante. Hay dificultades para caminar desde la niñez; las piernas se van atrofiando y dan un aspecto característico (fig. 2-12) Además, hay atrofia de los músculos pequeños de las manos, que pueden terminar deformando la mano (en garra), una disminución notoria de la conductibilidad nerviosa en el nervio mediano y cambios en la transpiración en los miembros. En algunos pacientes, hay hinchamiento de los grandes nervios distales de los miembros. En la anatomía patológica lo sobresaliente es la desmielinización de los nervios en la forma CMT1A.

Como esta enfermedad no pone en peligro la vida, se han recolectado numerosas genealogías de enfermos, lo que facilita el estudio de la localización del principal gen. Ésta se detectó en la región del cromosoma 17p11.2. Al estudiar el ADN del brazo corto del cromosoma 17, se observó que los enfermos poseían aparentemente un segmento redundante, lo cual fue verificado por varios métodos, entre ellos la amplificación del ADN con RCP (véase cap. 3 y Glosario) y por hibridación in situ y fluorescencia (FISH = HISYF, véase cap. 17) [22] La conclusión de estas observaciones es que un segmento del cromosoma 17 estaba triplicado, es decir que en vez de haber un segmento en cada uno de los dos cromosomas 17, uno de los cromosomas llevaba duplicado el segmento. La duplicación del segmento, aunque es grande desde el punto de vista del ADN (1,5 millones de bases: Mb), no es visible al microscopio con técnica de bandeado (véase cap. 17) pero sí es detectable por HISYF (fig. 2-13)

Esta duplicación en el cromosoma 17 fue encontrada en un número considerable de pacientes europeos pertenecientes a familias independientes, lo cual es una evidencia de peso de que se trata del cambio genético relacionado con la enfermedad. Además de transmitirse en familias que ya la poseen, esta duplicación parece surgir espontáneamente ("de novo") con cierta frecuencia. Esta aparición nueva probablemente está relacionada con la presencia en el cromosoma 17 normal, de una secuencia de ADN repetida, de alrededor de 17.000 bases (17 kb), en los extremos de la región que se duplica (fig. 2-14). Esta repetición, llamada CMT1A-REP está presente como 3 copias en el cromoso-

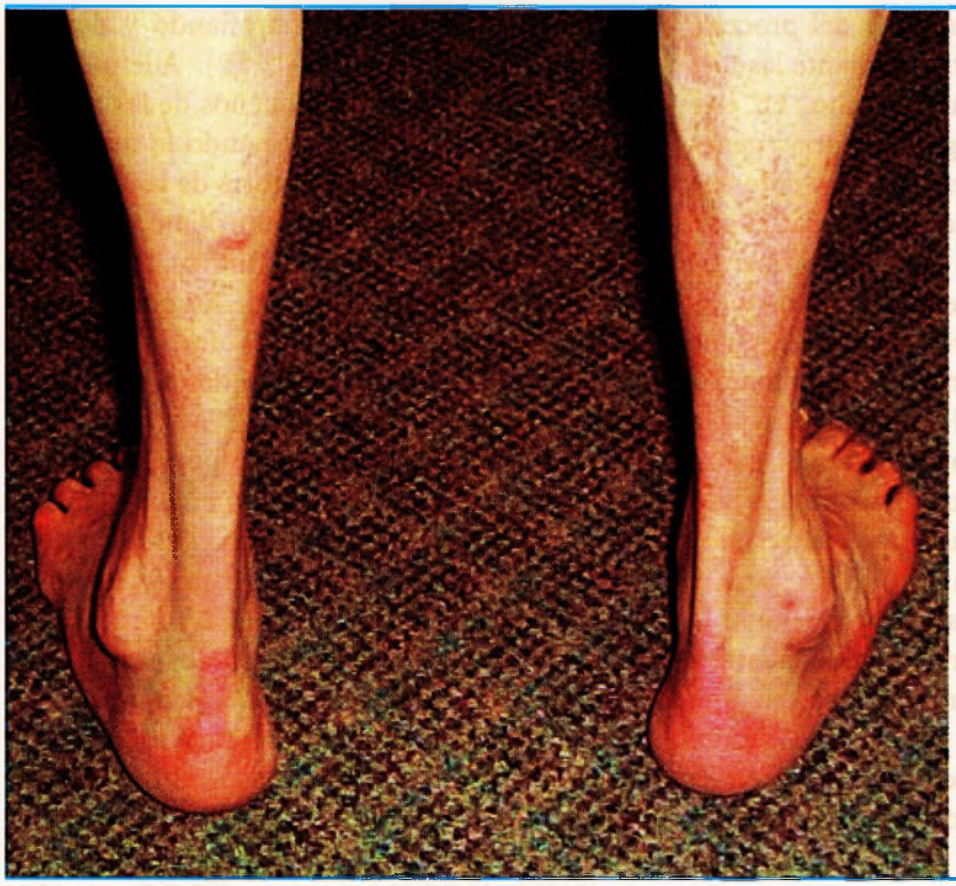


Fig. 2.12. Aspecto típico de las extremidades inferiores en un paciente de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Se aprecia la atrofia muscular, sobre todo peronea. (Reproducido con autorización de Myfootshop.com [http://www.myfootshop.com]).

ma con duplicación, de manera que parece intervenir en el proceso de la duplicación, la cual podría originarse por un entrecruzamiento ilegítimo en la meiosis (véase cap. 12) En la región de la duplicación se localiza un gen, el *PMP22* (de la proteína de mielina periférica de 22 kDa)

La duplicación citada del cromosoma 17 fue encontrada en estado homocigótico (es decir, en ambos cromosomas) al menos en un paciente con una forma clínica más acentuada de esta enfermedad. Además, se encontraron los síntomas de esta enfermedad en casos de

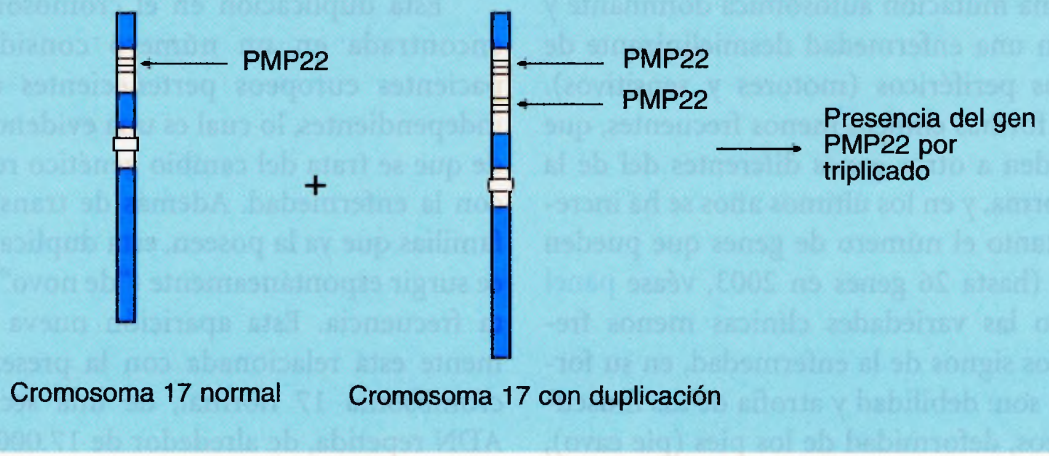


Fig. 2-13. Esquema de un cromosoma 17 portador de la duplicación de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y su homólogo normal, con la presencia de un total de tres genes *PMP22*.

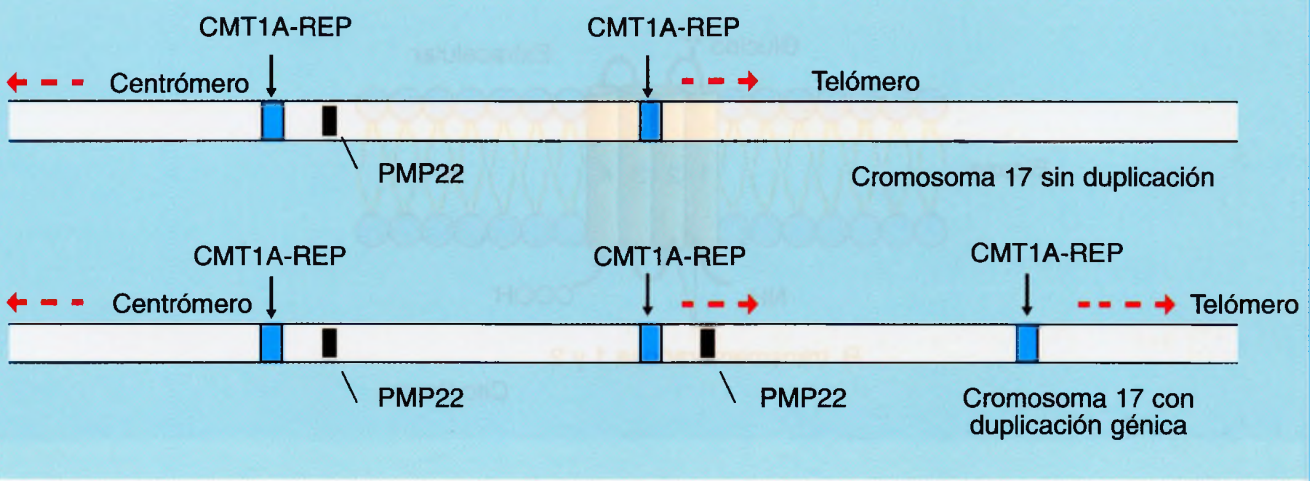


Fig. 2-14. Esquema de la región de duplicación en el cromosoma 17 en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. PMP22: gen de la proteína de mielina periférica 22; CMT1A-REP: secuencia repetida de 17 kb que flanquea la duplicación de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

una duplicación *microscópicamente visible*, es decir, mucho mayor, del brazo corto del cromosoma 17 Todos estos datos apoyan la idea de que la enfermedad expresa un desequilibrio génico producido por la presencia triple de un segmento del cromosoma 17 [22,23] Se encontró además un modelo animal de esta enfermedad. en el ratón, la mutación *trembler* (Tr, Tr^J) produce una lesión de los nervios periféricos muy parecida, en un animal, entonces, se pudo aislar el ARN y de él producir un ADN complementario o copia (ADNc, véanse caps. 3 y 4), que a su vez sirvió para identificar el ADNc humano homólogo en genotecas de ADNc de cerebro humano (véase genotecas, cap. 3) Tal como se había previsto, este ADN se localizaba en el cromosoma 17, dentro de la duplicación. Este gen se denomina, como su producto, *PMP22*. Además, se expresa (se transcribe) muy intensamente en los nervios periféricos, también de acuerdo con lo esperado. Su secuencia de bases contiene un *marco de lectura abierto* (condición de gen funcionante, véase cap. 5) que codifica teóricamente una proteína de 18 kDa (peso molecular), con 160 aminoácidos y cuatro dominios asociados teóricamente a membranas celulares; es decir, se previó qué tipo de proteína sería el producto del gen.

Proteína PMP22 y desarrollo de la neuropatía

Teniendo una idea teórica de cómo sería la proteína codificada por el gen *PMP22*, se buscó esa proteína entre las que forman parte de la mielina, que constituye las vainas de los nervios periféricos y resultó que su secuencia de aminoácidos es idéntica a la de una glucoproteína previamente aislada de tejidos bovinos, también coincidente con el producto PMP22, que presenta una secuencia apta para glucosilación en la región aminoterminal. La proteína PMP22 muestra un alto grado de *conservación*, es decir, su secuencia de aminoácidos es muy similar en diferentes especies. La proteína PMP22 fue finalmente localizada en la vaina de mielina, por métodos histoquímicos, en la región de la mielina compacta (fig. 2-15).[24]

Interpretación patogénica de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

Quedan todavía muchas incógnitas sin resolver en esta enfermedad, en especial con referencia a su mecanismo de producción del daño nervioso. Se ha observado que la proteína PMP22 no sólo es producida por las células de Schwann

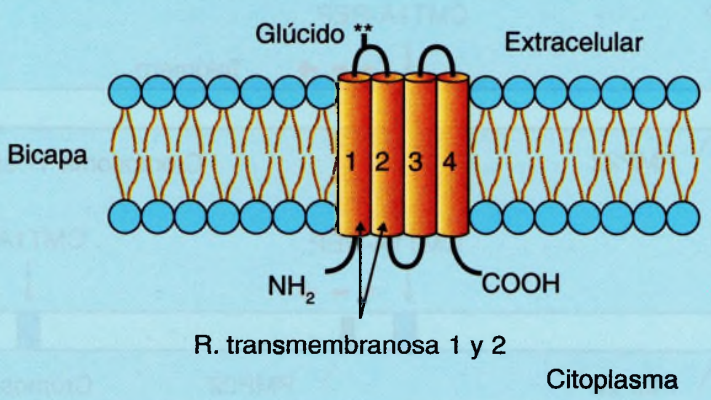


Fig. 2-15. Esquema de la proteína PMP22 ubicada en la membrana celular. Se señalan las cuatro regiones intramembranosas que atraviesan la bicapa; los extremos amino (NH_2) y carboxiterminal (COOH) son citoplasmáticos.

durante la formación de mielina, sino también por fibroblastos quiescentes, es decir, inhibidos de dividirse. La proteína PMP22 es un componente menor de las proteínas de la mielina (2-5%), a pesar de ello, las mutaciones en esta proteína, tanto en el ratón como en la especie humana, se expresan como deficiencias en la compactación y el mantenimiento de la vaina de mielina: muchas veces se observan dilataciones en "bulbo de cebolla" en las vainas de los nervios. Es sabido que la vaina de mielina sirve como aislamiento eléctrico para la conducción saltatoria del impulso nervioso, de ahí las fallas de conductibilidad nerviosa en esta enfermedad. Sin embargo, no está claro cómo el desbalance génico por triplicación puede actuar en forma de mutación dominante y por qué las mutaciones puntuales (cambios de bases) en el mismo gen parecen producir efectos similares a los de la duplicación. El avance extraordinario del conocimiento sobre esta enfermedad en unos pocos años es, sin embargo, indudable (panel 2-2)

Panel 2-2. Mecanismos patogénicos de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) de tipo 1A.

Panel

Recientemente se ha demostrado que la función del gen *PMP22* es sensible a la cantidad de dosis génica, es decir, a la cantidad de esos genes presentes en el genoma. En ratones, se ha estudiado la inactivación de uno o de ambos alelos del gen *PMP22*, esto es, heterocigotas y homocigotas para el gen "nulo" o inactivado, y se ha observado un grado creciente, del heterocigota al homocigota, en la desorganización de la vaina de mielina de los nervios periféricos, con la formación de dilataciones en bulbo de cebolla o catafilos, similares a las lesiones observadas en los pacientes humanos.[25] La presencia de tres genes (por la duplicación hallada en los pacientes) produce una desorganización similar de la mielina; es decir que el producto del gen *PMP22* es requerido en una cantidad adecuada para asegurar la estabilidad y el grosor normal de la vaina de mielina. Varios otros genes que además codifican otras proteínas de la mielina también son sensibles a la dosis génica.[25] Los más recientes estudios han revelado una insospechada cantidad de genes (treinta y seis en 2009) vinculados con diferentes variedades de esta enfermedad.[26-28] A su vez, esto ha permitido realizar una nueva y mucho más refinada clasificación clínica de las variedades de la CMT, pero donde la forma clásica CMT-1A, originada en una duplicación adicional de 1,5 Mb de ADN que contiene el gen *PMP22*, sigue siendo la forma más frecuentemente observada, en recientes estadísticas.[28]

RESUMEN

La Genética Médica estudia las enfermedades humanas considerando que los rasgos patológicos son consecuencia de la suma de dos variables: los cambios ambientales y los cambios genéticos. Los rasgos patológicos claramente vinculados a un factor genético son enfermedades mendelianas, originadas en la alteración de un solo gen (o segmento del ADN nuclear); es decir que son monogénicas y siguen las "leyes" de Mendel. Hay, sin embargo, efectos ambientales que simulan un cambio genético: son las fenocopias, como el raquitismo dietario respecto de la mutación que produce el raquitismo hipofosfatémico o las malformaciones embrionarias inducidas por la talidomida respecto de las mutaciones que afectan el desarrollo de los miembros, como la aquiropodia. Las fenocopias son un ejemplo de que el factor ambiental interviene tanto como el factor genético en la determinación del fenotipo, es decir, el aspecto y las características del enfermo. Con referencia a los cambios fenotípicos, debe usarse un promedio estadístico, la varianza, observándose que la varianza fenotípica es igual a la suma de las varianzas genotípica y ambiental. El raquitismo hipofosfatémico más común es determinado por una mutación de un gen del brazo corto del cromosoma X (gen *HYP*), pero hay otras mutaciones que producen un efecto parecido, originadas en otros genes, lo cual demuestra la *heterogeneidad genética* del raquitismo hipofosfatémico, es decir que el origen genético puede deberse a distintos genes o a distintas mutaciones. Esto es bastante común en las enfermedades hereditarias. Además de las enfermedades hereditarias mendelianas o monogénicas, hay un número de enfermedades cuya herencia no es claramente mendeliana, aunque tienen una frecuencia intrafamiliar mayor que en la población general, tales como la diabetes común, la hipertensión arterial y diversas malformaciones. Estas enfermedades son consideradas de herencia poligénica (o multifactorial), es decir, debidas a la acción concurrente de varios genes más la acción del ambiente. La herencia poligénica también determina los rasgos *continuos* (o métricos), por oposición a los rasgos discretos (presencia o ausencia), tales como la estatura, la presión arterial y el color de la piel. El estudio de los gemelos monocigóticos es útil para determinar la importancia del factor ambiental, dado que su genotipo es idéntico. Además, con los gemelos monocigóticos es posible estimar la "heredabilidad" de un rasgo continuo por la fórmula $H=V_g/(V_g+Va)$; estas estimaciones, cuando cumplen los requisitos debidos, revelan la tendencia heredable en la estatura, el coeficiente intelectual y otros rasgos continuos; y con respecto a rasgos discretos, el método de la concordancia permite establecer probabilidades de heredar enfermedades. Un rasgo cuantitativo útil es el recuento total de crestas dérmicas, que es resultado casi exclusivo del factor genético, y es casi idéntico en gemelos monocigóticos (95%); este recuento está alterado en varias enfermedades cromosómicas y disminuye con el aumento de cromosomas X. También los dibujos formados por las crestas ("dermatoglifos") son resultado del factor genético; los tres patrones principales (arcos, presillas y verticilos), más la localización de los trirradios y los pliegues de flexión, sufren cambios significativos en las alteraciones cromosómicas, en especial el síndrome de Down. Estas crestas se deben a la acción de varios genes con resultados aditivos; un caso parecido es el de la estatura. La identificación de los genes para rasgos continuos es más difícil que la de los rasgos discretos. Un gen para la estatura se localiza en la parte proximal del brazo largo del cromosoma Y. El número de genes que intervienen en un rasgo continuo puede estimarse por pruebas estadísticas; en el caso del color de la piel, debe ser superior a tres. El estudio de las progenies muestra que los caracteres continuos se originan por segregación de varios genes que actúan aditivamente. Un gen es pleiotrópico cuando determina alteraciones en distintos tejidos y órganos que aparentan no estar vinculados entre sí; se denomina "penetrancia incompleta" a la carencia de expresión de un gen en el 100% de sus portadores siendo dominante, lo cual sucede principalmente por la interacción del gen con otros genes en cada genoma. Se llama expresividad variable a la distinta intensidad del rasgo en diferentes personas portadoras de un gen. La heterogeneidad genética puede ser intraalélica (diferentes mutaciones) o interalélica (diferentes

genes). Muchas imprecisiones de la genética se van explicando con el enfoque molecular: se estudia el ADN de los enfermos para localizar alteraciones en la secuencia de ADN; se localiza el gen en una región cromosómica, se aísla su ARN mensajero, se crean genotecas de ADNc y se predice el tipo de proteína codificada. El conocimiento de esta proteína abre el camino para estudiar la función alterada. Un ejemplo es la atrofia muscular peronea (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth), que en el lapso de tres años quedó aclarada en gran parte, debido a que es causada por una duplicación de 1,5 Mb de ADN del cromosoma 17, el cual contiene el gen *PMP22*, que codifica la proteína de mielina periférica de 22 kDa y cuyo desequilibrio genera la desmielinización de los nervios periféricos.

REFERENCIAS

1 Sinnot EW, Dunn LC, Dobzhansky TH. Principles of Genetics, 4ª ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1950.

2. HYP consortium: A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. Nature Genet 1995;11·130-136.

3. Holm IA, Huang X, Kunkel LM. Mutational analysis of the PEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. Am J Hum Genet 1997· 60:790-797

4. Rowe PSN. The molecular background to hypophosphataemic rickets. Arch Dis Child 2000;83:192-194.

5. Quarles LD. FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. Am J Physioi Endocrinol Metab 2003; 285: E1-9.

6. Buyse ML. Encyclopedia of Birth Defects (Editor· Buyse ML). New York, 1990.

7 Ianakiev P van Baren MJ, Daly MJ et al. Acheiropodia is caused by a genomic deletion in C7orf2, the human orthologue of the Lmbr1 gene. Am J Hum Genet 2001 68: 38-45.

8. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. Science 1994; 265:2037-2048.

9. Smith C. Concordance in twins: methods and interpretations. Amer J Human Genet 1974; 26:454-466.

10. Lewontin RC. The analysis of variance and the analysis of causes. Amer J Human Genet 1974; 26:400.

11 Cavalli-Sforza LL, Bodmer WF The genetics of human populations. San Francisco: WH Freeman, 1971

12. Holt SB. Quantitative genetics of finger-print patterns. Brit Med Bull 1961 17:247-250.

13. Polani PE. Abnormal sex chromosomes and mental disorder. Nature 1969; 223:680-686.

14. Preus M, Fraser FC. Dermatoglyphics and syndromes. Amer J Dis Children 1972; 124:933-943.

15. Reed T Review: Dermatoglyphics in Medicine Problems and use in suspected chromosome abnormalities. Amer J Med Genetics 1981 8:411-429.

16. Plomin R., Haworth CM, Davis OS. Common disorders are quantitative traits. Nat Rev Genet 2009, 10:872-878..

17 Hong X, Tsai H-J, Liu X et al. A large-scale genome-wide linkage analysis to map loci linked to stature in chinese population. J Endocrinol Metab 2008, 93:4511-4518.

18. Hirschhorn JN, Lettre G. Progress in genome-wide association studies of human helght. Horm Res 2009, 71s: 5-13.

19. Sammalisto S, Hiekkalinna T, Schwander K et al. Genome-wide linkage screen for stature and body-mass index in 3.032 families Evidence for sex- and population-specific genetic effects. Europ J Hum Genet 2009, 17:258-266.

20. Salo P Kääriäinen H, Page DC, de la Chapelle A. Deletion mapping of stature determinants on the long arm of the Y chromosome. Hum Genet 1995; 95:283-286.

21 Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diersity. Hum Mol Genet 2009, 18:9-17

22. Patel PI. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: mutational mechanisms and candidate gene. Current Op Genet Develop 1993; 3:438-444.

23. Lemke G. The molecular genetics of myelination: an update. Glia 1993; 7:263-271

24. Snipes GJ, Suter U. Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system. J Anat 1995; 186:483-494.

25. Adikofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. Nature Gen 1995; 11:274-280.

26. Berciano J, Combarros O. Hereditary neuropathies. Curr Opin Neurol 2003; 16:613-622.

27 Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T et al. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myielin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. Brain 2003; 126: 134-151

28. Szigeti1 K, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease. Eur J Hum Genet 2009, 17·703-710

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

McClearn GE, Johansson B, Berg S et al. Substantial genetic influence on cognitive abilitles in twins 80 or more years old. Science 1997 276:1560-1563.

Deary IJ, Johnson W, Houlihan LM. Genetic foundations of human inteliigence. Hum Genet 2009, 126:215-232.

27. Hatton N, Yamamoto M, Yoshihara T et al. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. Brain 2003; 126: 134-151.
28. Szigeti K, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease. Eur J Hum Genet 2009; 12:703-710

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

McClearn GE, Johansson B, Berg S et al. Substantial genetic influence on cognitive abilities in twins 80 or more years old. Science 1997; 276:1560-1563.
Deary IJ, Johnson W, Houlihan LM. Genetic foundations of human intelligence. Hum Genet 2009; 126:215-232.

Capítulo 3

Fenómenos básicos y técnicas de genética molecular

Técnicas de Genética Molecular. Enzimas de restricción. Vectores. Clonado de ADN. Genotecas. Electroforesis de fragmentos de ADN. Improntas. Amplificación por RCP

En los últimos años, han entrado en la práctica médica un número de procedimientos técnicos (y su correspondiente terminología) que requieren una cabal comprensión y que no han sido contemplados en los programas de las carreras médicas. El impacto de estas técnicas sobre las Ciencias Biomédicas se incrementa cada vez más, y términos como *Polimorfismos de Longitudes en Fragmentos de Restricción* (PLFR=RFLP en inglés), *Microsatélites, Hibridación In Situ y Fluorescencia* (HISYF=FISH en inglés), *Terapia Génica, Reacción en Cadena de la Polimerasa* (RCP=PCR en inglés) y otros se incluyen en la práctica corriente. Este impacto sobre la medicina se acrecienta por los resultados que van surgiendo del proyecto sobre el Genoma Humano, iniciado en 1990 en los Estados Unidos y que se encuentra terminado en 2003. Además, los procesos biológicos implícitos en esas técnicas poseen una importancia propia. En este capítulo, se expone la base de un número de estas técnicas y se trata de subrayar la importancia de los fenómenos biológicos involucrados más que sus muy diversas aplicaciones. Estos fenómenos son esencialmente simples de comprender, puesto que gran parte del "misterio" de la biotecnología se basa en su terminología poco clara. Estos fenómenos corresponden, por ejemplo, a características de los ácidos nucleicos (véase cap. 4), procesos moleculares, enzimas naturales y propiedades de ciertos virus. El contenido de este capítulo es esencial para la comprensión de los siguientes. Los datos elementales sobre estructura del ADN pueden consultarse en el capítulo 4.

Técnicas de replicación, corte y repegado de ADN (técnicas de ADN recambinante)

El nombre poco afortunado de técnicas de ADN recombinante no se refiere a la recombinación génica meiótica o mitótica, sino a procedimientos por los cuales una molécula de ADN es cortada en un lugar determinado y luego pegada (con el mismo u otro fragmento) mediante el uso de ciertas enzimas de existencia natural en microorganismos (enzimas de restricción, ligasas), también se refiere a los procedimientos para multiplicar una molécula determinada de ADN (o un fragmento de ella), mediante su incorporación a elementos autorreproducibles en microorganismos (clonado) Dado que estas técnicas se basan en procesos que ocurren naturalmente en organismos vivos, es conveniente explicar la función biológica de estos elementos de la llamada "ingeniería genética" Las herramientas más básicas usadas son las enzimas de restricción, cuyo conocimiento es absolutamente necesario para comprender la biotecnología.

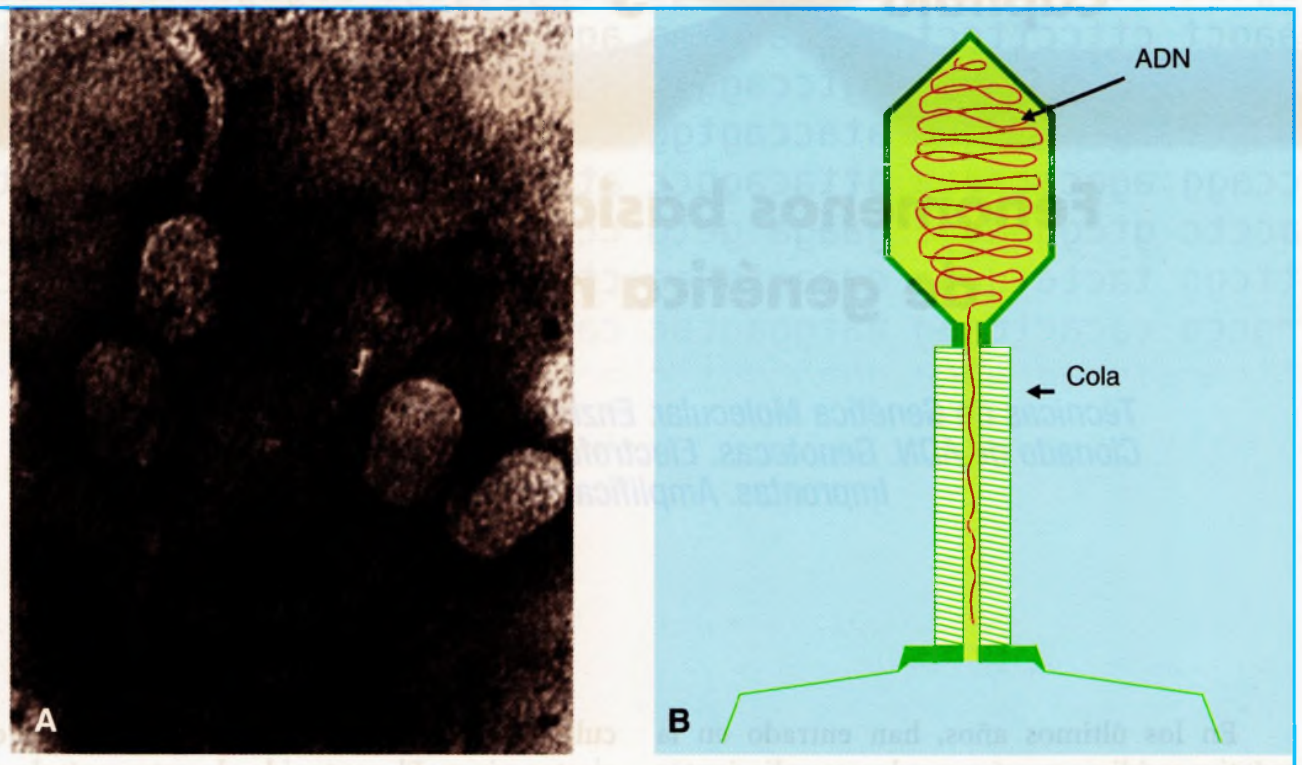


Fig. 3-1 Microfotografía electrónica (izquierda; 210.000×)[1] y esquema (derecha) de un bacteriófago. En el esquema se observa que el ADN forma un filamento enrollado en la cabeza del fago y que es inyectado a la bacteria a través de un canal en la cola. Una vez dentro de la bacteria, este ADN es capaz de replicarse y sintetizar nuevos fagos. Si este ADN es cortado por las enzimas de restricción de la bacteria, no se forman bacteriófagos.

Enzimas de restricción (endonucleasas de restricción)

Estas enzimas se encuentran en la naturaleza en numerosas especies de bacterias, en las cuales desempeñan un papel defensivo que, en cierta manera, puede ser equiparado al de un prototipo de sistema inmunitario. Las enzimas de restricción se denominan así porque restrin gen el crecimiento de los virus parásitos de bacterias: los bacteriófagos. El mecanismo se basa en que cortan la molécula de ADN de bacteriófagos y, de esa manera, los eliminan (fig. 3-1)

El tipo de corte del ADN que producen estas enzimas es muy específico: cada enzima de restricción corta solamente cuando encuentra una secuencia de bases determinada y específica para esa enzima de restricción (p. ej., para la enzima *Eco*RI es la secuencia de seis pares de bases GAATTC/CTTAAG (véase más adelante) Dado que estas enzimas cortan el ADN cuando encuen tran su secuencia específica a lo largo de la doble hélice y no en sus extremos, se denominan "endonucleasas de restricción" (cortan por dentro) Cuando una endonucleasa de restricción corta un ADN, produce "fragmentos de restricción", pero en la naturaleza esto ocurre exclusivamente en el ADN de los bacteriófagos y no ataca al ADN de la propia bacteria, porque simultáneamente los sitios o secuencias que reconoce la enzima han sido modificados (metilados) en el ADN de la bacteria. Se conocen más de 1.200 diferentes enzimas de restricción y cada una reconoce su especial secuencia de bases del ADN [2]

Nomenclatura

Los nombres de las endonucleasas de restricción se basan en los nombres científicos de la bacteria de la cual se extrajeron. Las primeras tres letras corresponden al nombre de la bacteria, de la siguiente forma. la 1ª letra es la inicial del género, la 2ª y la 3ª son letras del nombre de la especie, la 4ª letra designa la cepa especial y el

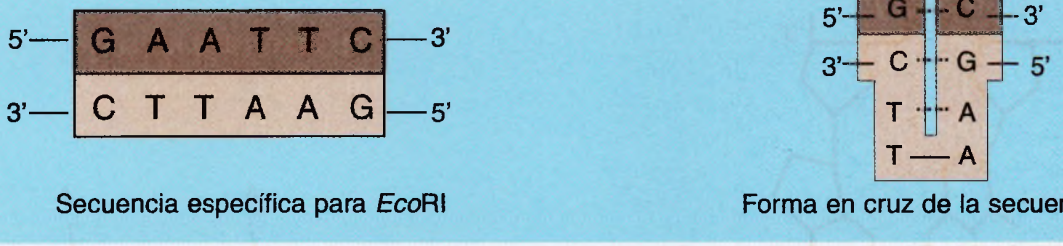


Fig. 3-2. Forma lineal (izquierda) y cruciforme (derecha) de la secuencia (palindrómica) de bases del ADN que es reconocida por la enzima *Eco*RI.

número (romano) indica el orden histórico de las enzimas descubiertas en esa bacteria. Así, la 1ª enzima de restricción descubierta en la cepa RY13 de *Escherichia coli* (bacteria usual en la flora intestinal) se designa *Eco*RI. Algunas otras de las enzimas de restricción más usadas son: *Hind*III (de *Haemophilus influenzae*, cepa Rd, 3ª en aislarse), *Not*I (de *Nocardia otitidis*) y *Bam*HI (de *Bacillus amyloliquefaciens* H)

Mecanismo de acción

Muchas enzimas de restricción actúan reconociendo una secuencia específica de bases del ADN que es palindrómica, es decir, que puede leerse, invertida, en la hélice complementaria (fig. 3-2)

Estas secuencias palindrómicas tienen otras propiedades extraordinarias:

a) tienen un eje de simetría en cada hélice, lo cual hace que cada hélice tenga autocomplementariedad en su secuencia, así, ese segmento palindrómico puede escribirse en formato cruciforme;
b) estas secuencias palindrómicas en general pueden adoptar más de una forma espacial cuando se encuentran en una molécula de ADN y en ciertas condiciones de su entorno.

A su vez, las enzimas que reconocen estos palíndromos, como la *Eco*RI, tienen una estructura particular. La *Eco*RI está constituida por dos subunidades simétricas (estructura cuaternaria), cada una de las cuales tiene un sitio (dominio) de reconocimiento (de la secuencia de una hélice) y un sitio activo de corte (catálisis) (fig. 3-3)

De esta manera, cada subunidad lleva a cabo un corte, es decir, una ruptura de unión fosfodiéster por hidrólisis en una hélice y, en conjun-

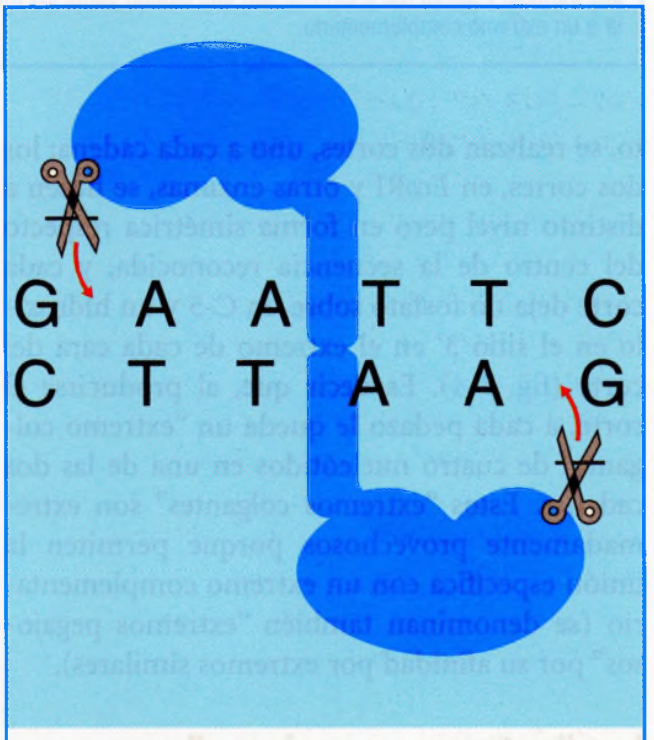


Fig. 3-3. Esquema de la enzima *Eco*RI colocada sobre la secuencia que reconoce en el ADN. La enzima es un dímero; cada unidad (en azul) posee un sitio de corte para una cadena (simbolizado por la tijerita), un sitio de reconocimiento de bases (muesca) y una prolongación interna.[3]

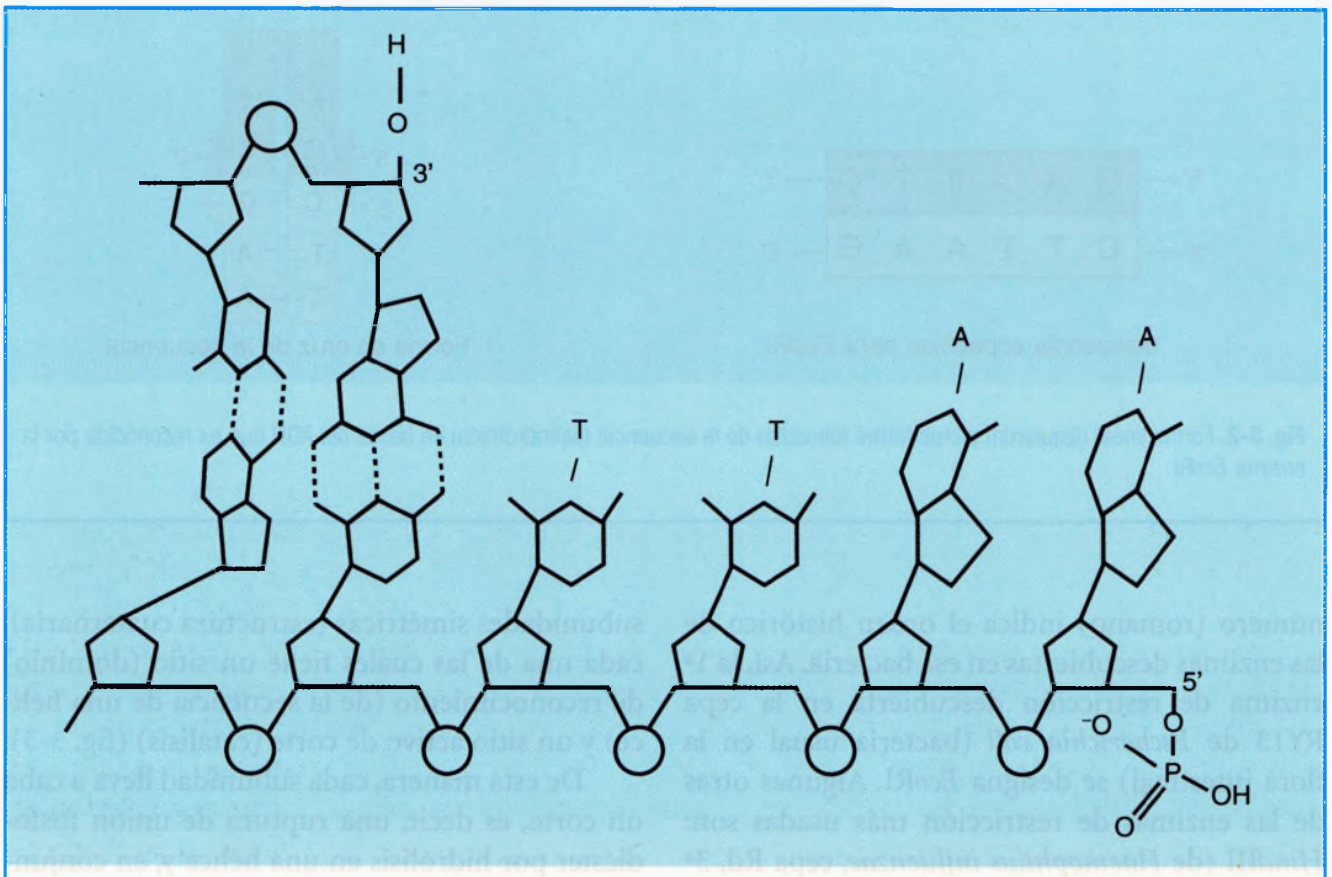


Fig. 3-4. Esquema de un extremo de ADN cortado con la enzima *Eco*RI. El "extremo colgante" de 4 nucleótidos tiene saliencias (de dos purinas) y pozos (de 2 pirimidinas) que actúan como las mellas de una llave con una cerradura, para aceptar unirse solamente a un extremo complementario.

to, se realizan dos cortes, uno a cada cadena, los dos cortes, en *Eco*RI y otras enzimas, se hacen a distinto nivel pero en forma simétrica respecto del centro de la secuencia reconocida, y cada corte deja un fosfato sobre un C-5 y un hidroxilo en el sitio 3' en el extremo de cada cara del corte (fig. 3-4) Es decir que, al producirse el corte, a cada pedazo le queda un "extremo colgante" de cuatro nucleótidos en una de las dos cadenas. Estos "extremos colgantes" son extremadamente provechosos porque permiten la unión específica con un extremo complementario (se denominan también "extremos pegajosos" por su afinidad por extremos similares).

Los "extremos pegajosos" permiten el corte y repegado de las moléculas de ADN

Las enzimas de restricción han hecho posibles casi todos los demás adelantos del conocimiento del genoma (humano y de otros organismos) por dos espectaculares propiedades: 1) son capaces de cortar regular e infalible mente el ADN en secuencias específicas y 2) muchas de ellas, al cortar el ADN, dejan en cada extremo un segmento pegajoso monocatenario, capaz de unirse exactamente a su complementario. Es decir que estas enzimas no sólo cortan específicamente, sino que dejan un puente específico y articulado para repegarse cuando se agrega una ligasa (véase más adelante)

Para que se produzca el repegado de las dos caras de corte inferidas por una enzima de restricción, es necesario el consumo de energía (provisto por ATP) y una enzima *ligasa* de ADN (p. ej., la ligasa T4) (fig. 3-5)

Por consiguiente, queda posibilitado el corte y repegado de moléculas de ADN de diferente origen usando la misma enzima de restricción (fig. 3-6)

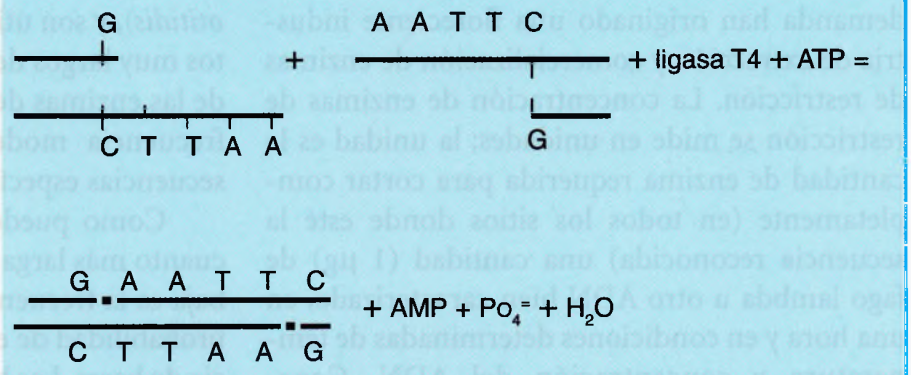


Fig. 3-5. Dos extremos de fragmentos de ADN cortados con *Eco*RI; debido a que poseen sus "extremos colgantes" complementarios, se unen permanentemente en presencia de ligasa T4 y ATP

Propiedades de las enzimas de restricción

No todas las enzimas de restricción tienen las propiedades descritas con anterioridad (es decir, cortar el ADN dentro de la secuencia reconocida, dejar "extremos pegajosos", reconocer secuencias palindrómicas) En realidad, las enzi mas de restricción pueden clasificarse en tres grupos: grupo I, endonucleasas (cortadoras de ADN), que además pueden metilar el ADN, lo cortan aproximadamente a 1.000 nucleótidos de distancia del lugar donde la enzima reconoce una secuencia y no tienen una secuencia predecible de corte. Además, requieren la presencia de ATP Las enzimas del grupo II son las actualmente usadas en Genética Molecular, cortan el ADN en secuencia específica, no requieren ATP y en su mayoría dejan extremos de corte pegajosos. Las del grupo III cortan el ADN en la cercanía del lugar reconocido por la enzima pero poseen acción metilante y requieren ATP

Las enzimas de restricción usadas en Genética Molecular son extremadamente termosensibles y pierden su actividad en pocos días o aun en horas si se mantienen a temperatura ambiente. Por ello, las enzimas de restricción se mantienen en una solución de 50% de glicerina y a –20 °C y se llevan a temperatura ambiente o a 37 °C sólo durante la reacción para cortar ADN La mayoría de estas enzimas se inactiva totalmente por calentamiento a 68 °C durante 10

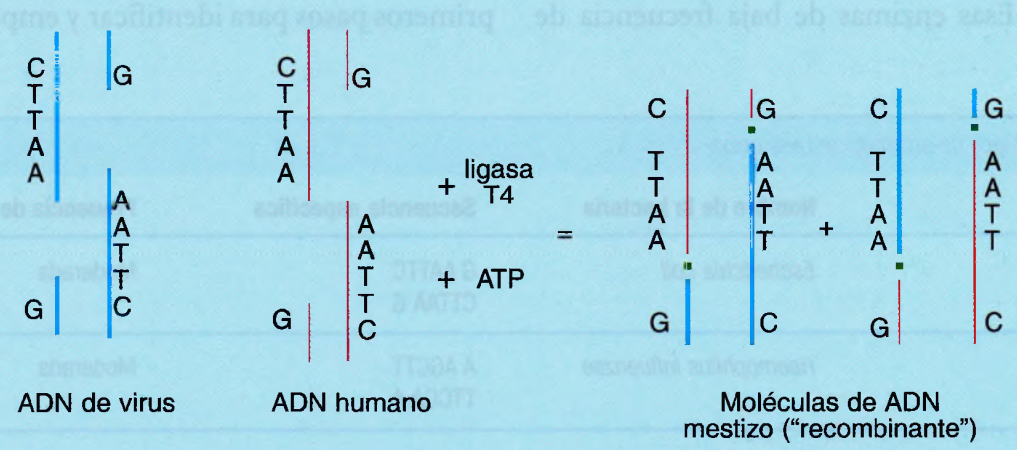


Fig. 3-6. Dos moléculas de ADN (una viral, línea gruesa, y una humana, línea fina), cortadas con *Eco*RI, pueden reunirse y formar dos moléculas de ADN mestizo o híbrido (humano-viral).

minutos. Esta termosensibilidad y su creciente demanda han originado una floreciente industria de extracción y comercialización de enzimas de restricción. La concentración de enzimas de restricción se mide en unidades; la unidad es la cantidad de enzima requerida para cortar completamente (en todos los sitios donde esté la secuencia reconocida) una cantidad (1 µg) de fago lambda u otro ADN bien caracterizado, en una hora y en condiciones determinadas de temperatura y concentración del ADN. Generalmente, se usan en concentraciones de 10 unidades de preparado comercial por λ(µL) o, en la práctica, 1 µL de preparado comercial por reacción de 50 µL. Las enzimas de restricción (grupo II) necesitan Mg^{++}, de modo que la mezcla de reacción contiene Cl_2Mg además de otras sales. Generalmente, se usa un buffer salino (estabilizador del pH) concentrado (10 ×) del cual se usan 5 µL por reacción de 50 µL.

Enzimas de restricción de alta y baja frecuencia de corte

Ya que cada enzima de restricción reconoce y corta sólo en una secuencia específica, es lógico que, si esa secuencia es muy rara en el ADN de un organismo, la enzima cortará en muy pocos lugares ese ADN y producirá entonces fragmentos de mucha longitud (o peso molecular) puesto que el ADN natural es muy largo (varios cm, el correspondiente a los cromosomas humanos medianos). Esas enzimas de baja frecuencia de corte existen, como la enzima *Not*I (de *Nocardia otitidis*), y son útiles para el clonado de fragmentos muy largos de ADN. Sin embargo, la mayoría de las enzimas de restricción cortan el ADN con frecuencia moderada o alta, puesto que sus secuencias específicas no son muy raras.

Como puede observarse en el cuadro 3-1, cuanto más larga es la secuencia reconocida, más baja es la frecuencia de corte y esto se basa en la probabilidad de encontrar, por azar, una secuencia de bases. Las bases del ADN no están dispuestas al azar pero al ser tan numerosas (3×10^9 en el genoma humano), para cada secuencia se puede hacer el siguiente planteo: si una enzima de restricción reconoce y corta una secuencia de cuatro bases (como la *Hpa*II, véase cuadro), la probabilidad de encontrar esa secuencia al azar es 1 en $4^4 = 1$ vez en 256 bases; pero la probabilidad de encontrar al azar una secuencia de 6 bases (*Eco*RI) es de 1 en $4^6 = 1$ en 4.096 bases y la probabilidad de encontrar al azar una secuencia de 8 (como *Not*I) es 1 en 4^8 1 en 65.536. Por ello, *Not*I es usada para cortar el ADN en grandes fragmentos (en realidad, mayores que 65.536 bases; corta aproximadamente a 100-150 kb).

Caracterización primaria de un ADN: sitios de restricción y mapas de restricción. Un ADN determinado, no muy largo (p. ej., el ADN de un virus o el ADN de una sub-banda de un cromosoma humano), puede caracterizarse en forma rápida y precisa, por la acción sobre él de una o más enzimas de restricción. Éste es uno de los primeros pasos para identificar y empezar a estu-

Cuadro 3-1. Tipos de enzimas de restricción

Sigla	Nombre de la bacteria	Secuencia específica	Freuencia de corte
*Eco*RI	*Escherichia coli*	G AATTC CTTAA G	Moderada
*Hind*III	*Haemophilus influenzae*	A AGCTT TTCGA A	Moderada
*Hpa*II	*Haemophilus parainfluenzae*	C CGG GGC C	Alta
*Not*I	*Nocardia otitidis*	GC GGCCGC CGCCGG CG	Baja

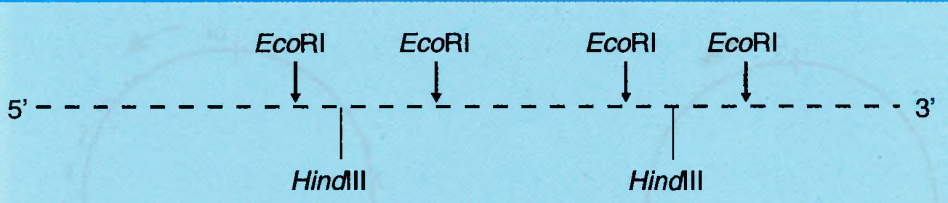


Fig. 3-7 Esquema de un mapa de restricción simple donde se utilizan dos enzimas de restricción.

diar un ADN Si un ADN es sometido a la acción de *Eco*RI y da cinco fragmentos, decimos que ese ADN posee cuatro (los extremos originales no cuentan) secuencias reconocidas de *Eco*RI, o *sitios* de restricción de *Eco*RI. Para precisar más la constitución de ese ADN, se agrega otra enzima (p. ej., *Hind*III) y se verifica que da tres fragmentos con ella; decimos que posee dos sitios de restricción para ella. Ahora, es posible combinar los datos de ambas enzimas y realizar un mapa de restricción de ese ADN, que por ejemplo será el que aparece en la figura 3-7

Si se agregan los datos de enzimas adicionales, es posible caracterizar la identidad de ese ADN con elevado grado de certeza.

Visualización de los fragmentos de ADN: electroforesis en agarosa y tinción con bromuro de etidio

Las publicaciones médicas actuales con frecuencia presentan fotografías que documentan la presencia de un ADN particular. Esas fotografías son de geles de agarosa –un hidrato de carbono derivado del agar– en los cuales los fragmentos de ADN "corren" con una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, es decir que los fragmentos pequeños corren con mayor rapidez. Los fragmentos de ADN se mueven en un campo eléctrico simplemente porque poseen las abundantes cargas negativas de sus fosfatos, los cuales están colocados regularmente a lo largo de la cadena. El gel de agarosa, usado en concentraciones que varían entre 0,2 y 3%, produce mallas de espacios menores cuanto mayor es la concentración. A una concentración dada, los fragmentos de ADN más chicos sortean con más facilidad las mallas y avanzan más rápidamente hacia el ánodo (polo positivo) mientras que los fragmentos más largos tardan más en atravesar las mallas, debido a que el ADN es una molécula relativamente rígida y con forma de filamento (fig. 3-8). De esta manera, en geles de agarosa es posible separar fragmentos de ADN que oscilan entre 50.000 nucleótidos y 100-200 nucleótidos. Debido a su gran densidad de cargas negativas, el ADN corre rápidamente y las electroforesis pueden realizarse en menos de una hora según el voltaje aplicado. Un colorante visi ble a simple vista (azul de bromofenol) sirve de guía para saber cómo avanza la electroforesis. Terminada ésta, se baña el gel en una solución muy diluida del colorante fluorescente bromuro de etidio (tóxico), que se introduce entre las dos

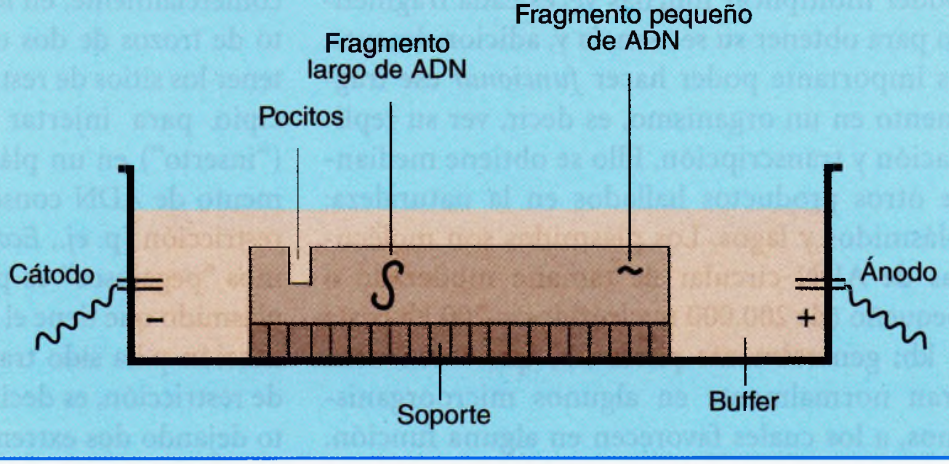


Fig. 3-8. Esquema de electroforesis en agarosa. Los fragmentos de ADN corren desde los pocitos hacia el ánodo, con velocidad inversamente proporcional a su longitud. La dirección de migración es hacia la derecha.

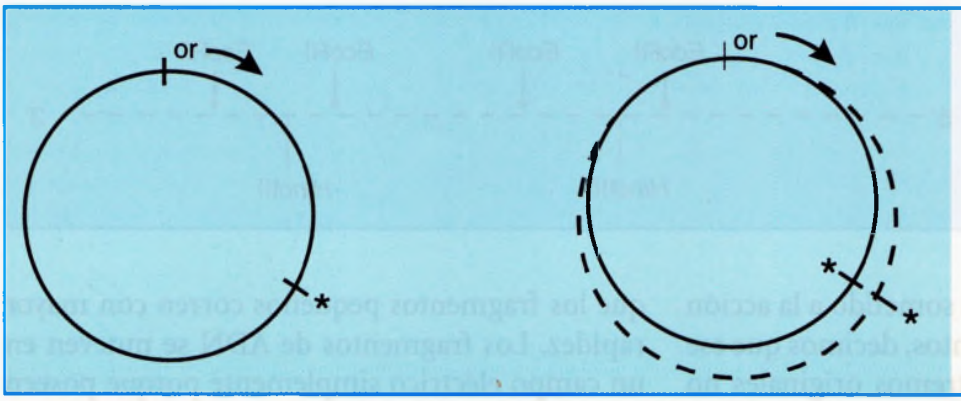


Fig. 3-9. Plásmido (molécula circular de ADN) con su origen de replicación (or) y la secuencia marcadora de resistencia a antibiótico (señalada con un asterisco). A la derecha, esquema de la replicación casi completa de un plásmido. La flecha indica la dirección de la replicación.

hélices del ADN y absorbe intensamente luz UV a 300 nm, emitiendo una luz anaranjada. El gel teñido con bromuro de etidio y lavado se coloca sobre una fuente de luz UV (altamente dañina para la vista y la piel no protegidas) y los lugares donde se encuentran los fragmentos de ADN se visualizan como bandas anaranjadas que deben ser fotografiadas para conservar la documentación. Mediante este procedimiento, se detecta hasta menos de un centésimo de µg de ADN, lo que representa entre 1 y 10 ng (nanogramos). A cada costado corren separadamente marcadores (estándar) de peso molecular conocido (o pares de bases = pb) que sirven para calibrar el tamaño de los fragmentos.

Los vehículos (vectores) paro transportar fragmentos de ADN: plásmidos, fagos y CAL (YAC)

Los fragmentos de ADN cortados a medi da con las enzimas de restricción y repegados con fragmentos de otros ADN no son demasiado útiles cuando están aislados; es preciso poder multiplicar muchas veces cada fragmen to para obtener su secuencia y, adicionalmente, es importante poder hacer *funcionar* ese fragmento en un organismo, es decir, ver su repli cación y transcripción. Ello se obtiene mediante otros productos hallados en la naturaleza. plásmidos y fagos. Los plásmidos son moléculas de ADN circular de tamaño moderado o pequeño (de 200.000 nucleótidos = 200 kb hasta 1 kb; generalmente pocas kb) que se encuen tran normalmente en algunos microorganismos, a los cuales favorecen en alguna función. Ciertos plásmidos son muy notorios, porque confieren a las bacterias *resistencia a un antibiótico*. De esa manera, un plásmido que con fiere resistencia a un antibiótico se hace ventajoso para la bacteria portadora y asegura la subsistencia del plásmido. Todo plásmido contiene una secuencia de nucleótidos particular, denominada "origen de replicación", que es reconocida por una polimerasa y permite la replicación del plásmido. Esta replicación se realiza en uno solo de los sentidos posibles del ADN circular de un plásmido (fig. 3-9)

Dado que ciertos plásmidos llevan la secuencia de un gen de resistencia a un antibiótico y son capaces de autorreplicarse dentro de una bacteria, son muy favorables para ser usados como transportadores de fragmentos de ADN Para ser usado como vehículo (*vector*), un plásmido debe poseer al menos un sitio (a veces más) de restricción idéntico al sitio de restricción de los extremos del fragmento de ADN foráneo que se quiere transportar. Ciertos plásmidos naturales cumplen estos requisitos pero además se han *construido* plásmidos artificiales, disponibles comercialmente, en los cuales mediante el injerto de trozos de dos o más plásmidos es posible tener los sitios de restricción requeridos. El principio para injertar un fragmento de ADN ("inserto") en un plásmido es sencillo: un fragmento de ADN conseguido con una enzima de restricción (p. ej., *Eco*RI) que deja sus dos extremos "pegajosos" es puesto en contacto con un plásmido que tiene el mismo (único) sitio de restricción y ha sido tratado con la misma enzima de restricción, es decir que el círculo se ha abierto dejando dos extremos pegajosos, y en presen-

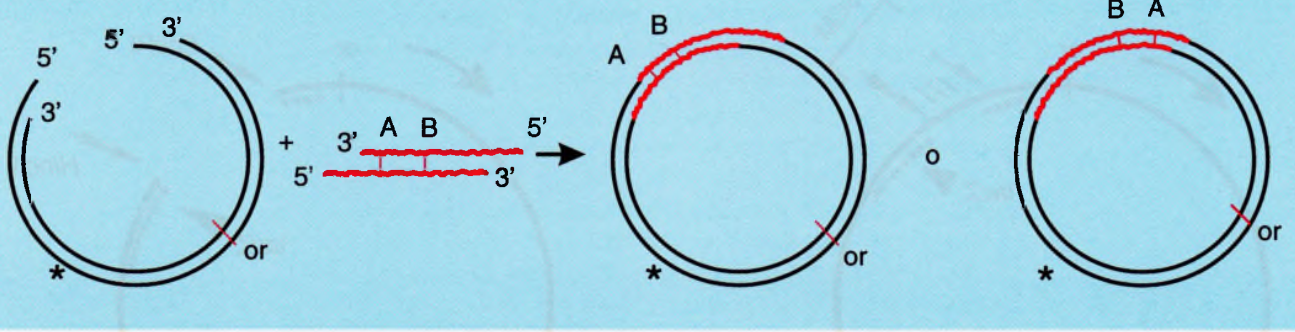


Fig. 3-10. Apertura de un plásmido con *Eco*RI e injerto de un fragmento de ADN cortado en sus dos extremos con *Eco*RI. El fragmento (líneas onduladas [rojas]), que lleva los marcadores A y B, puede insertarse de dos maneras: directo (AB) o invertido (BA). La dirección de la transcripción es del "origen" hacia el marcador (asterisco).

cia de la ligasa T4 de *E. coli*, se hace la reacción (fig. 3-10)

Obsérvese que es posible insertar el fragmento de ADN en dos direcciones: AB y BA, esto tiene importancia porque la replicación y la transcripción del plásmido se realiza en una dirección y, si se desea observar la transcripción en el fragmento foráneo, es necesario injertarlo en la dirección (o sentido) correcta. Para ello, se necesitan dos enzimas de restricción en vez de una, para cortar el fragmento y el plásmido; de esa manera, queda definida una única dirección del inserto. Este procedimiento se denomina "clonamiento direccional" porque permite la multiplicación de un fragmento (clonación) colocado en un único sentido que da lugar a su transcripción adecuada (fig. 3-11)

Plásmidos comerciales: pUC19 y vectores de expresión

Con el objeto de disponer de vehículos (vectores) que puedan acomodar fragmentos obtenidos con muy diversas enzimas de restricción, se han "construido" plásmidos tomando partes de dos de ellos, de lo que resulta un plásmido que contiene varios sitios de restricción (para diferentes enzimas) agrupados en un "sitio de clonación múltiple" Uno de estos plásmidos es el pUC19, usado para transportar y multiplicar (clonar) diversos fragmentos de ADN y, además, para observar los posibles productos génicos del fragmento, a través de su transcripción y traducción en la bacteria *E. coli*. Por esta última propiedad, a los plásmidos de este tipo que permiten

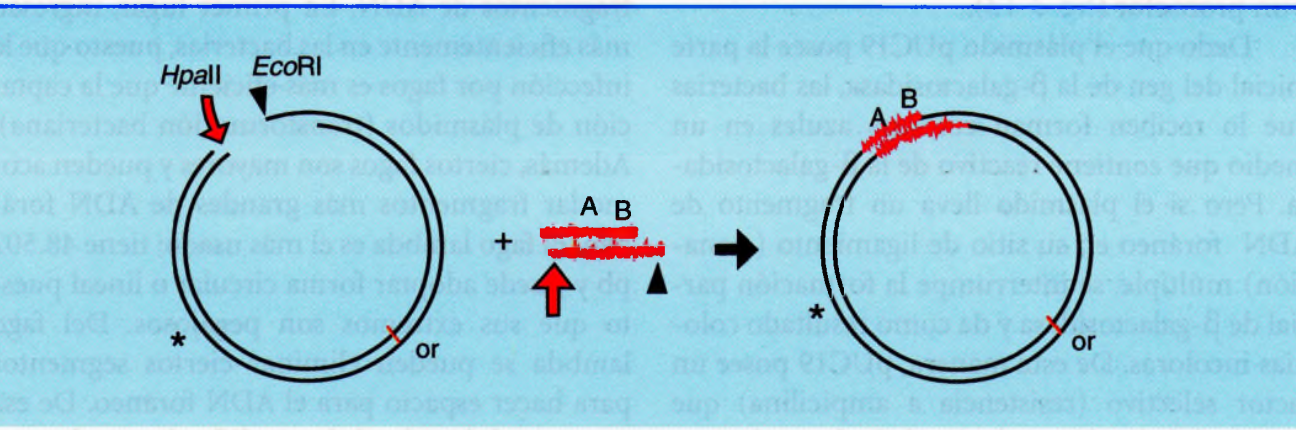


Fig. 3-11 Inserto direccionado de un fragmento (líneas gruesas) en un plásmido. Tanto el plásmido como el fragmento han sido cortados por dos enzimas, que dejan "extremos colgantes" diferentes, señalados por la flecha llena y la punta de flecha. Hay una única manera de inserción. *Hpa*II y *Eco*RI, enzimas de corte.

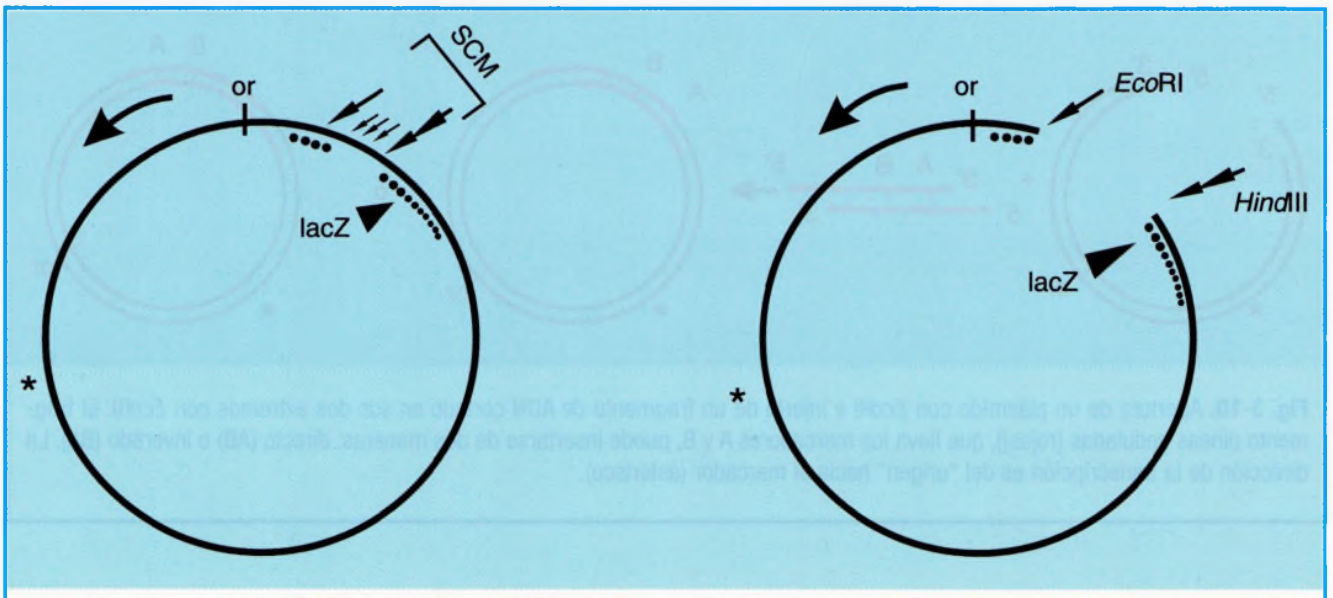


Fig. 3-12. Esquema simplificado del plásmido pUC19. A la izquierda, el pUC19 intacto; a la derecha, abierto por acción de *Eco*RI y *Hind*III, para recibir un inserto direccionado. SCM: sitio de clonación múltiple; lacZ: péptido de β-galactosidasa, que queda interrumpido cuando se inserta un fragmento de ADN en el SCM. Asterisco: sitio para resistencia a ampicilina.

estudiar el polipéptido, se los denomina "vectores de expresión" El plásmido artificial pUC19 (y otros similares de la "familia" pUC) es pequeño (2.686 pb), se replica en *E. coli* sin necesidad de replicación cromosómica de la bacteria (esta propiedad se denomina "de replicación relajada" y es, por consiguiente, un plásmido de alto número de copias por bacteria) y es un derivado del injerto de dos ADN (el ADN del plásmido artificial pBR322 y el ADN del bacteriófago M13 mp19) Contiene el gen de resistencia a la ampicilina y el principio del gen de la β-galactosidasa y un promotor (fig. 3-12)

Dado que el plásmido pUC19 posee la parte inicial del gen de la β-galactosidasa, las bacterias que lo reciben forman colonias azules en un medio que contiene reactivo de la β-galactosidasa. Pero si el plásmido lleva un fragmento de ADN foráneo en su sitio de ligamiento (clonación) múltiple, se interrumpe la formación parcial de β-galactosidasa y da como resultado colonias incoloras. De esta manera, pUC19 posee un factor selectivo (resistencia a ampicilina) que permite la selección exclusiva de las bacterias que han recibido el plásmido, más un marcador de la presencia del inserto de ADN foráneo (β-galactosidasa) En ciertas condiciones, el promotor promueve la transcripción del inserto foráneo más el principio de la β-galactosidasa y se puede formar una *proteína de fusión* que permite detectar el producto génico foráneo. Finalmente, el fragmento foráneo que queda entre las ramas del pUC19 es fácilmente secuenciable y amplificable por RCP (véase más adelante)

Bacteriófagos como vectores

Los bacteriófagos tienen ciertas ventajas sobre los plásmidos como transportadores de fragmentos de ADN En primer lugar, ingresan más eficientemente en las bacterias, puesto que la infección por fagos es más eficiente que la captación de plásmidos (transformación bacteriana) Además, ciertos fagos son mayores y pueden acomodar fragmentos más grandes de ADN foráneo. El fago lambda es el más usado; tiene 48.502 pb y puede adoptar forma circular o lineal puesto que sus extremos son pegajosos. Del fago lambda se pueden eliminar ciertos segmentos para hacer espacio para el ADN foráneo. De esa manera, el fago lambda modificado puede acomodar hasta 20 kb de ADN foráneo, mientras los plásmidos sólo acomodan usualmente unas 4 kb (cuadro 3-2) El límite superior de ADN foráneo

Cuadro 3-2. Tipos de inserto en genotecas

Vector	Tamaño promedio de inserto de ADN
Plásmido	4 kb
Fago lambda	20 kb
Cósmido	40 kb
CAL	hasta 1 Mb

está dado por la magnitud máxima de ADN acomodable en la cápside del bacteriófago (54 kb)

Los *cósmidos* son híbridos de un plásmido y un segmento del fago lambda. Pueden acomodar hasta 40 kb de ADN foráneo.

Cromosomas artificiales de levadura (CAL = YAC en inglés, *Yeast Artificial Chromosome*) y de bacteria (BACs, *bacterial artificial chromosomes*)

Un notable adelanto de la década de 1980 fue el descubrimiento de los tres elementos esenciales para la organización de los cromosomas en levaduras,[4] como tres secuencias específicas de ADN 1) los orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma SRA=ARS en inglés, 2) los centrómeros y 3) los telómeros (véase cap. 4) Además, es necesario un cierto umbral de tamaño para un cromosoma funcional. Basándose en ello, se han construido los llamados CAL, plásmidos de gran tamaño que pueden funcionar como un cromosoma dentro de células de levadura. Los CAL tienen tres secuencias menores de ADN de levadura: un origen de replicación, un centrómero y los dos telómeros fusionados, más algún gen marcador de levadura. Todo el resto del ADN es uno o más fragmentos foráneos que se ligan a este CAL de la misma manera que a un plásmido común. Estos CAL acomodan hasta un millón de bases (Mb) de ADN foráneo.

El ADN foráneo puede ser el bacteriófago lambda, en cuyo caso puede multiplicarse en bacterias como cualquier otro plásmido, pues tiene forma circular por fusión de sus telómeros. También el ADN foráneo puede ser de un eucarionte (humano), en cuyo caso el tamaño del

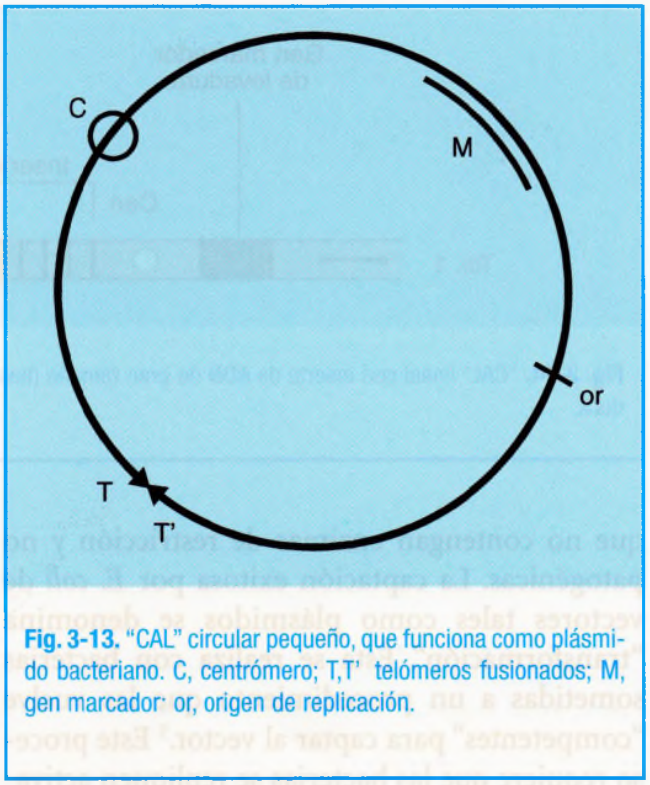


Fig. 3-13. "CAL" circular pequeño, que funciona como plásmido bacteriano. C, centrómero; T,T' telómeros fusionados; M, gen marcador· or, origen de replicación.

CAL es mucho mayor y se hace lineal por corte de la fusión telomérica con *Bam*HI, estos CAL se introducen en células de levaduras, donde se comportan como cromosomas y se multiplican con las células (figs. 3-13 y 3-14) De similar manera, los "crosomosomas artificiales de bacteria" o BAC son ADN "construidos" sobre la base del plásmido F (por fertilidad) de la bacteria *E. coli*, en el cual el sitio de inserción de un ADN foráneo puede acomodar hasta 350 kbp.

Clonación o multiplicación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN producidos por enzimas de restricción pueden ser vehiculizados en plásmidos, fagos o CAL y por cualquiera de esos vehículos o vectores es posible introducirlos en células (bacterianas o de levaduras) con el fin de multiplicar ese fragmento hasta obtenerlo en cantidades suficientes para estudiarlo. Este proceso se ha denominado "clonación" (en su sentido primitivo, clonación es la formación de células u organismos hijos sin reproducción sexual) La clonación de fragmentos de ADN generalmente se realiza en la bacteria *E. coli*, en cepas

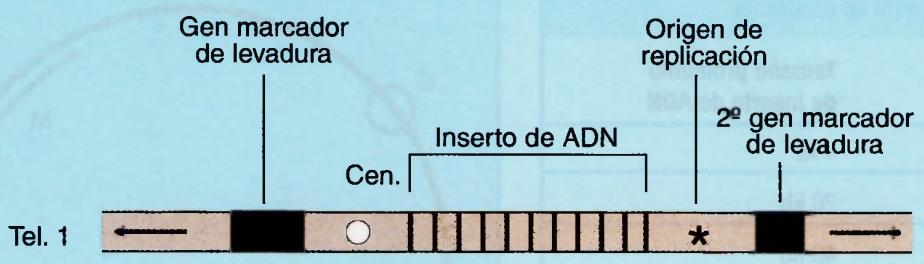


Fig. 3-14. "CAL" lineal con inserto de ADN de gran tamaño (hasta 1 Mb) y funcional como cromosoma artificial en células de levadura.

que no contengan enzimas de restricción y no patogénicas. La captación exitosa por *E. coli* de vectores tales como plásmidos se denomina "transformación" Ésta se realiza con bacterias sometidas a un procedimiento que las vuelve "competentes" para captar al vector.[5] Este proceso requiere que las bacterias se repliquen activamente (que estén en la fase logarítmica de crecimiento), un tratamiento con sales de Ca^{++} u otros cationes en frío y un breve pulso de calentamiento a 42 °C. Estas manipulaciones tienden a facilitar la entrada en la bacteria de las moléculas circulares del plásmido, lo cual se consigue en un rango de un 10% a un 0,001% de las bacterias. Sin embargo, como el plásmido lleva un marcador seleccionable (resistencia a un antibiótico), cuando las bacterias tratadas se siembran en un medio con el antibiótico, sólo aquellas que contienen plásmidos (transformadas) forman colonias.

Tomando bacterias de una de esas colonias y sembrándolas en un medio líquido, se puede multiplicar millones de veces un determinado plásmido que lleva un fragmento de ADN (clonación) El tamaño de los fragmentos clonados dependerá de las enzimas de restricción usadas y del vector.

Genotecas genómicas: colecciones de fragmentos de restricción que abarcan un genoma completo

Si el ADN de un organismo es sometido a la acción de una enzima de restricción, se forman numerosísimos fragmentos con un grado de repetición determinado por el número de células usado para preparar el ADN Esos fragmentos pueden ser ligados a un vector (plásmido) tratado con la misma enzima, de forma tal que se produce una colección de moléculas de vector que llevan todos los tipos de fragmentos; esta colección se llama genoteca genómica. Para hacer una comparación, es equivalente a trozar un libro al azar y pegar cada trozo en una página de papel en blanco. Muchas páginas contendrán un párrafo; otras, una frase o letras separadas, pero todo el libro estará comprendido en el total de las páginas en blanco con trozos pegados. Reconstruir el libro original puede parecer imposible, pero si los cortes se han realizado con reglas (siempre entre renglones o entre párrafos), es posible reconstruirlo. Por supuesto, cuanto más grandes sean los trozos más fácil será reconstruir partes (capítulos) del libro. Una tarea similar se lleva a cabo con las genotecas: se trata de reconstruir los fragmentos de cromosomas y, además, de leer cada fragmento y cada cromosoma. Esto último requiere considerable esfuerzo, porque un cromosoma puede estar cortado en más de 10.000 fragmentos. Las genotecas genómicas son colecciones de fragmentos de ADN presentes en colecciones de plásmidos o de fagos, que a su vez están contenidas en cultivos bacterianos (véase cuadro 3-2) Materialmente, esta genoteca es un conjunto de cápsulas o placas de Petri (20 o más) con cultivos, donde cada colonia contiene un fragmento de ADN (fig. 3-15) La genoteca también puede estar representada por *improntas* de cada cápsula, hechas en una membrana, o por un único cultivo donde están mez-

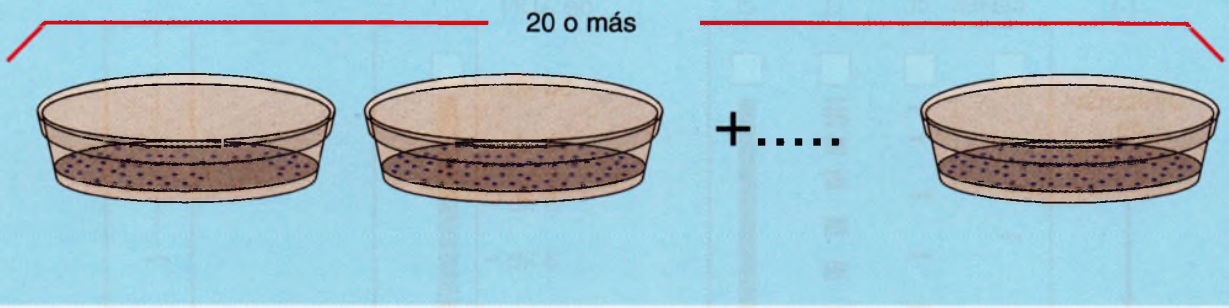


Fig. 3-15. Esquema de una genoteca genómica en cápsulas de Petri.

cladas colonias de bacterias que contienen diferentes fragmentos. La cantidad de ADN usada para crear la genoteca debe ser bastante mayor que un genoma para descontar las fallas en las distintas etapas (véase cuadro 3-2). Se considera que con 1/10 de mg de ADN (100 µg) es factible hacer una genoteca genómica. Generalmente, se usan genotecas basadas en el bacteriófago lambda (genotecas lambda)

Genotecas de ADN complementario (genotecas de ADNc)

Las genotecas (o bibliotecas; "library" en inglés) genómicas contienen muchos fragmentos que no poseen genes, dado que los exones de genes (que tienen secuencia única, véase el próximo capítulo) ocupan sólo alrededor de un 1,1% del genoma. Por ello, muchas veces es más útil construir una genoteca a partir de ARN mensajero: las llamadas "genotecas de ADN complementario" o ADNc. Éstas, a pesar de ser de construcción más trabajosa, tienen dos apreciables ventajas: 1) todos los fragmentos son copias de genes y 2) son específicas para el tipo de célula del cual se extrae el ARN de la genoteca. Por ejemplo: una genoteca de ADNc puede hacerse a partir de células hepáticas o de cualquier otro tipo. Si es de células hepáticas, representará la colección de todos los genes activos (que se transcriben) en el hepatocito y nada más que en ese tipo de célula. La construcción de una genoteca de ADNc se basa en algunos fenómenos naturales, como la existencia de una "cola" poliadenilada (o secuencia de un centenar de nucleótidos de adenina exclusivamente) en el extremo 3' de la mayoría de los ARN mensajeros. También se basa en el mecanismo de replicación de los retrovirus (virus del sida, del sarcoma de Rous y otros), que son capaces de copiar su genoma de ARN en una molécula de ADN porque poseen la codificación de una enzima llamada "transcriptasa inversa" que cataliza ese copiado. La construcción de una genoteca de ADNc se inicia con el aislamiento del ARN mensajero de un tipo de células (inhibiendo su degradación por RNasa) El aislamiento se basa en la afinidad de la "cola poliadenilada" por una secuencia complementaria de timidinas que se ligan al material (celulosa u otro) de una columna de separación cromatográfica. Los ARN mensajeros tienden a quedar asociados al material de la columna mientras otros tipos de moléculas atraviesan la columna sin ser retenidos.

Los ARNm detenidos y purificados se incu ban con desoxinucleótidos y transcriptasa inversa, $MgCl_2$ y un cebador o primero de polidesoxitimidina, con lo cual se "copia" la información del ARN mensajero en una cadena complementaria de ADN Luego de otros procedimientos, es posible vehiculizar o clonar estos ADNc en bacterias, con lo que se obtiene la genoteca de ADNc (colección de moléculas complementarias a los ARN mensajeros; no se trata de fragmentos) Dado que cada ADNc es posiblemente idéntico a los exones de un gen, cada inserto de un plásmi

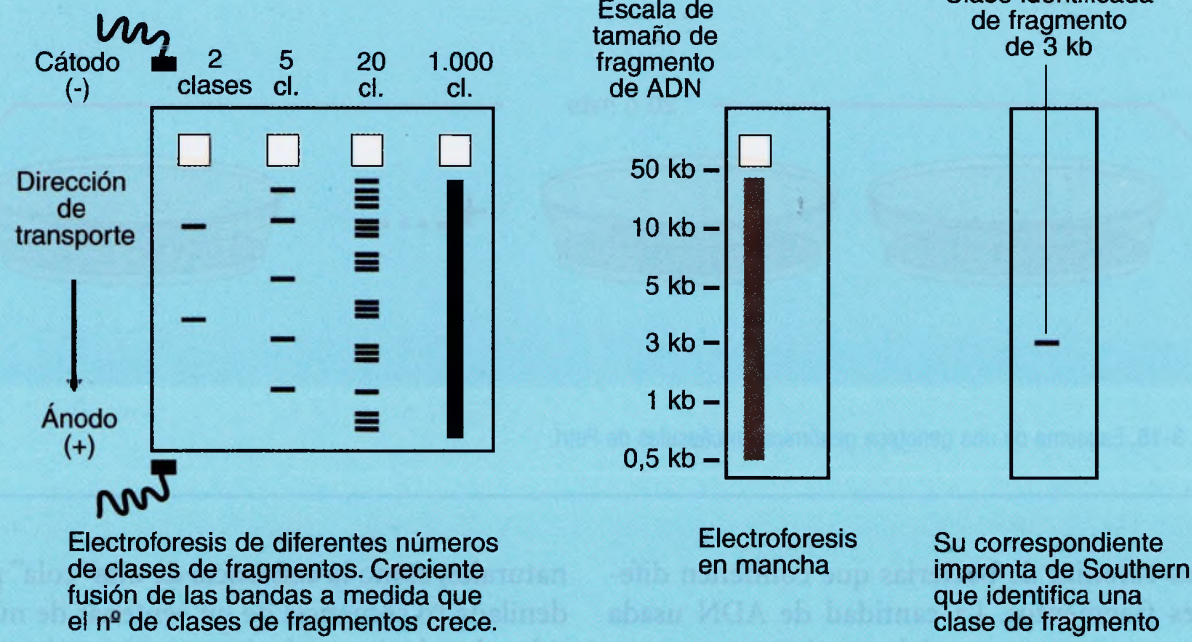


Fig. 3-16. Electroforesis en geles de agarosa y su correspondiente impronta de Southern.

do en una genoteca de ADNc podría transcribir un ARN mensajero y finalmente codificar un polipéptido. Para ello, se usan los vectores o plásmidos "de expresión" como el pUC19 descrito antes. Finalmente, una genoteca de ADNc es un conjunto de colonias de *E. coli*, cada una con un tipo de plásmido que contiene un inserto complementario a un ARN mensajero.

La identificación de fragmentos de ADN: sondas de ADN

Las técnicas citadas hasta ahora permiten cortar, repegar, multiplicar y seleccionar fragmentos de ADN Para identificar cada fragmento no es necesario (aunque es factible) determinar la secuencia total de sus bases. Los métodos más usados para identificar un ADN (o un ARN) se basan en su propiedad de hibridar, es decir, la propiedad de las cadenas simples de nucleótidos de unirse a una cadena con una secuencia estrictamente complementaria de bases (véase cap. 4)

Supóngase que se tiene una "sopa" de muchísimos fragmentos diferentes de ADN, producida por la acción de una enzima de restricción sobre el ADN extraído de células de un organismo. Si se hace una electroforesis de esa "sopa", en vez de verse bandas bien nítidas correspondientes a unos pocos tipos de fragmentos, los miles de fragmentos de diferente tamaño se superponen entre sí y generan una apariencia homogénea de mancha extendida donde no se identifica ninguna clase de fragmento (fig. 3-16)

La solución consiste en disponer de un patrón, una secuencia conocida (cadena simple), rotulada con un marcador. Esa secuencia conocida y rotulada se denomina *sonda de ADN* porque permite explorar o sondear un verdadero mar de fragmentos y solamente se unirá a un fragmento que posea una secuencia complementaria de bases. Pero si bien una sonda se une específicamente (hibrida) a su secuencia complementaria, por otra parte debe ser reconocible. Ello se logra al incorporar en la secuencia de la sonda isótopos radiactivos como ^{32}P, de tal manera que el híbrido emite radiación. Si se coloca cuidadosamente una membrana de nitrocelulosa o de nailon sobre el gel con la mancha electroforética y se la comprime sobre él, una alícuota de los fragmentos se pega a la membrana (es una *impronta* o huella; "blot" en inglés) Esta membrana con la impronta se calienta en un solvente para separar

las dos cadenas en cada fragmento y se pone en una solución que contiene la *sonda*, para que ésta forme un híbrido (si existe un fragmento con secuencia complementaria) La membrana lava da y secada se adhiere a una película sensible para radiografía, que luego se revela fotográficamente, y muestra una raya nítida de una banda donde la sonda encontró un fragmento complementario. Este método, inventado por E. Southern, se llama impronta (*blot*) de Southern y permite establecer rápidamente si en un organismo hay o no una secuencia determinada. No sólo es posible identificar secuencias en el ADN, sino también en el ARN (el ARNm se hibrida con el ADNc) Esta variante para ARN se conoce como impronta de Northern (por un juego de palabras en inglés, Southern, además de ser un apellido, significa sureño y por eso el segundo tipo de impronta se llamó norteño=Northern) Por extensión, se llama impronta Western a aquellas que identifican proteínas en geles.

Actualmente, se reemplazan los marcadores radiactivos (peligrosos y de vida corta) por marcadores fluorescentes, que permiten hacer improntas de Southern sin necesidad de equipos especiales.

Las "sondas" de ADN son muy útiles para fines diagnósticos, por ejemplo, para detectar si en un paciente se encuentra o no la secuencia normal de un gen y para revelar parentesco o la presencia de polimorfismos que sirven como marcadores de una enfermedad. Las sondas se preparan pero, además, en todo el mundo numerosos laboratorios de investigación se intercam bian "sondas" gratuitamente, generalmente enviando un plásmido que contiene la sonda (sin marcador radiactivo) como inserto.

Secuenciación del ADN

En la actualidad es posible *secuenciar*, es decir, obtener la secuencia exacta de las bases de fragmentos cada vez mayores, ya sea manualmente o con dispositivos automáticos y, por lo general, por el método de didesoxinucleótidos. Varios centenares de bases se pueden secuenciar manualmente en dos días. Las secuencias se en vían a "bancos de datos" Para la medicina es importante saber que prácticamente todas las secuencias ya conocidas del ADN humano están registradas en esos bancos de datos, como el GenBank o el de la Organización Europea de Biología Molecular (base de datos EMBL) y que estas secuencias son accesibles, por medio de ordenadores conectados a Internet, para todos los profesionales e investigadores.

Termacicladores para reacción en cadena de las polimerasas termorresistentes (RCP = PCR, en inglés)

Esta técnica, inventada por K. Mullis (a quien le ha dado una fortuna y un premio Nobel) a mediados de la década de 1980, ha faci litado muchos trabajos en Biotecnología y Genética. Es un procedimiento extraordinariamente simple que permite copiar millones de veces una secuencia de ADN en un tubo. Otra gran ventaja es que la secuencia por copiar (ADN matriz o templado) puede estar en muy pocas e incluso en una sola molécula. Es decir que se puede amplificar el ADN partiendo de una sola célula o de unas pocas células. La extraordinaria sensibilidad de la técnica ha permitido amplifi car ADN prehistóricos y hacer estudios que previamente eran considerados imposibles, tales como identificar a una persona con unas pocas células.[6] En medicina, la RCP tiene numerosas aplicaciones diagnósticas y posiblemente tendrá aplicaciones terapéuticas. La RCP se basa en el mecanismo usual de replicación del ADN, en sus propiedades de hibridación y en la presencia de enzimas de síntesis de ADN (polimerasas) en bacterias termofílicas, que son resistentes a altas temperaturas (70 °-90 °C).[7]

El ADN que va a ser copiado (templado) se coloca en un microtubo de 0,5 mL (el total del líquido en el tubo es 50-100 µL) en baja concen tración, en presencia de un buffer a pH 8,3, $MgCl_2$ y los cuatro desoxinucleótidos que se incorporan al nuevo ADN (dCTP, dATP, dGTP y dTTP) Se agrega una escasa cantidad de polimerasa termorresistente Taq (extraída de la bacteria *Thermus aquaticus)* y dos pequeños oligonucleótidos (18-25 bases) que sirven como cebadores o

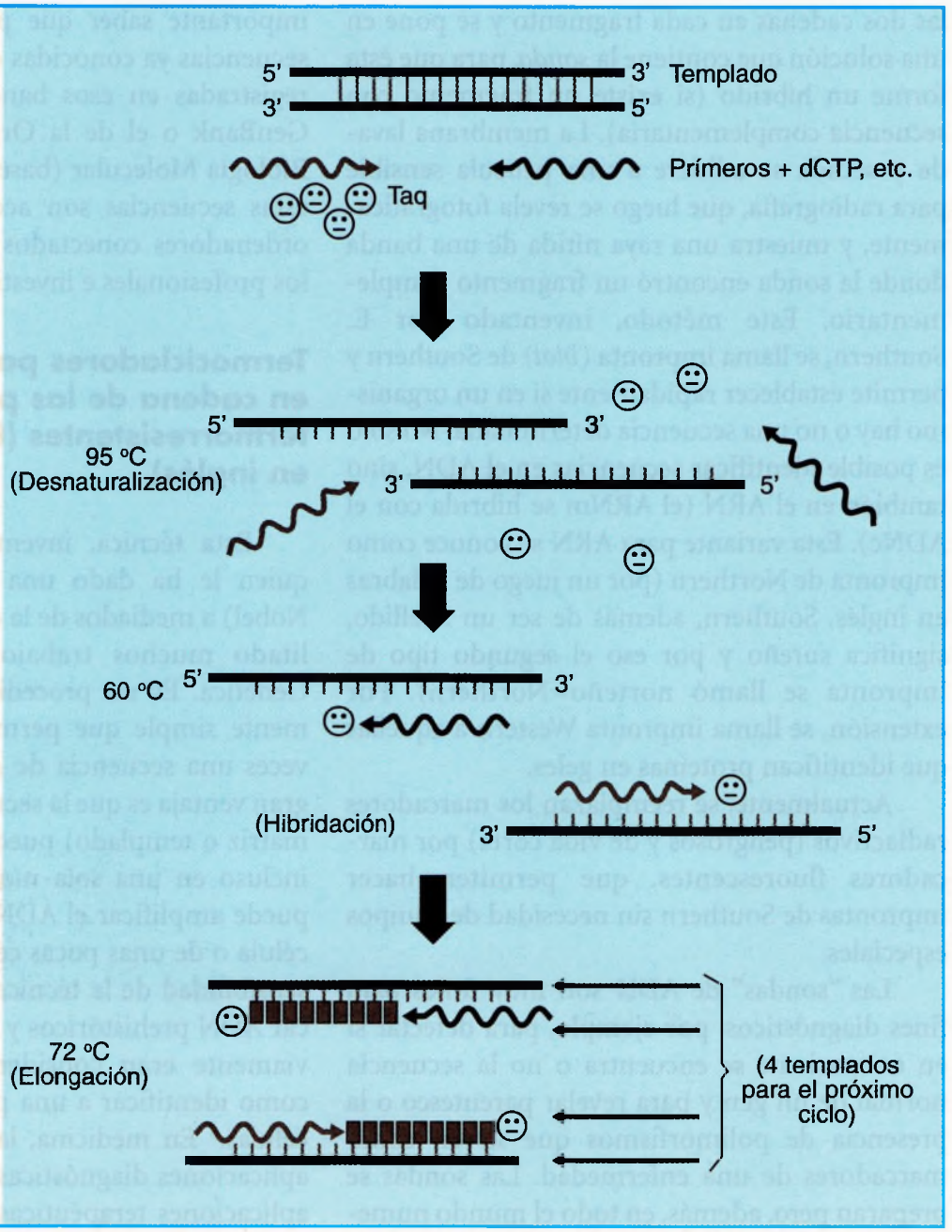


Fig. 3-17 Esquema del primer ciclo en la reacción en cadena de la polimerasa. El sentido de los prímeros (o cebadores) está dado por su cabeza de flecha.

prímeros, uno en una cadena y el restante en la otra, y que por crecer en sentidos opuestos se denominan prímero delantero y prímero trasero. Esta mezcla en el tubo, todavía sin reaccionar, se pone en la máquina de RCP, que consiste en un aparato capaz de calentar y enfriar rápida y repentinamente, en ciclos, los tubos (ciclador térmico) Las tres temperaturas que usa el aparato son generalmente:

- 95 °C para desnaturalizar el ADN,
- 60 °C para hibridar,
- 72 °C para incrementar la longitud del nuevo ADN

La base del mecanismo es (fig. 3-17)

1) Al calentar a 95 °C, se separan las dos cadenas del ADN templado.
2) Al enfriar a 60 °C, cada cadena puede hibri darse, en su secuencia específica, con el prí mero delantero o trasero.
3) Al calentar a 72 °C, la Taq (polimerasa) empieza a extender, desde el extremo de un prímero, una nueva cadena unida al prímero; esta cadena va copiando la secuencia del templado.

En el siguiente ciclo, a 95 °C, se separan templados y cadenas nuevas y cada una de ellas sirve

ahora de templado, usando otros prímeros libres. De esa manera, con cada ciclo, prácticamente se duplica la cantidad de ADN y en 30 ciclos es posible, en teoría, realizar 22^9 copias.

En 1994, se perfeccionó la RCP para copiar secuencias mayores (con la técnica usual no se pasa de 4 kb), llegando a copiar secuencias mayores de 35 kb (panel 3 1) [8] Posteriormente se inventaron nuevas modificaciones de esta técnica, que la han convertido en un instrumento básico de diagnóstico molecular (panel 3 2)

Panel 3-1 Variaciones de la amplificación del ADN con RCP y sus aplicaciones

Las aplicaciones de esta reacción son numerosísimas y van desde la identificación de personas a partir de unas pocas células (como un pelo, restos óseos, manchas de sangre), especialmente utilizadas en Medicina Forense, hasta el diagnóstico de una mutación específica causante de una enfermedad hereditaria, con muestras de sangre de la persona, en improntas puntuales ("dot blots"). Además, la reacción (RCP) es muy usada para fabricar sondas y, mediante algunas modificaciones, para fabricar ADN con mutaciones específicas de un sitio o base determinada. Una aplicación importante es la amplificación de ADNc, la llamada "RCP-TI" = RT-PCR, en inglés. En este procedimiento, primero se aísla de un tejido un ARNm (estos ARNm son relativamente fáciles de aislar, por poseer una "cola polladenilada" (véase cap. 4) que tiene gran afinidad por resinas ligadas a politimina. Este ARNm es usado como molde, con una transcriptasa Inversa (TI = RT, en inglés), como la TI del virus de mieloblastosis aviaria (VMA = AMV, en Inglés), para sintetizar unas primeras coplas de ADNc. Estos ADNc, que son generalmente menores de 10 kb, son amplificados con la reacción (RCP) y, como todo el proceso comenzó con una transcripción Inversa, al proceso completo se lo denomina reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RCP-TI). Con este procedimiento, se fabrica ADNc en cantidades significativas, sin necesidad de clonación. Un ejemplo del uso de la RCP es la determinación de la presencia de una mutación específica (deleción 2944del5) en los portadores y enfermos de la enfermedad recesiva *epidermólisis ampollar atrófica generalizada benigna*, con detección mediante improntas puntuales (fig. 1).[9]

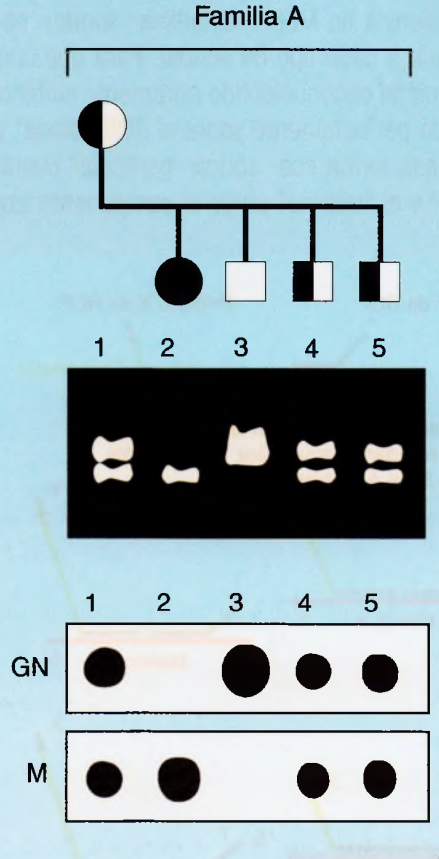


Fig. 1. Genealogía de casos de epidermólisis ampollar atrófica generalizada benigna y prueba de improntas puntuales (*dot-blots*) de cada una de las personas mediante ADN amplificado con RCP y detectando con sondas (oligómeros) específicas para el gen normal (GN) y el gen mutante (M). La paciente (2) y el hermano sano no portador (3) tienen una sola marca; los demás son heterocigotas y tienen las dos marcas. El gráfico intermedio representa una electroforesis.

Panel 3-2 La técnica de MLPA y sus aplicaciones

En los últimos años se ha popularizado una técnica que combina la reacción en cadena de la polimerasa, el uso de ciertas sondas prefabricadas y la secuenciación rápida de segmentos de ADN. Es un derivado de la técnica de amplificación *multiplex.* En la RCP=PCR multiplex se introducen varios prímeros o cebadores en una única mezcla para amplificación, con lo cual se obtienen simultáneamente varios productos amplificados, que se pueden separar entre sí por su tamaño (fig. 2). La nueva técnica MLPA también permite amplificar varios productos, pero los restringe a solamente aquellos que permitan una ligadura de dos tipos de sondas. Esta técnica se denomina *amplificación de sondas múltiples dependiente de ligadura* o MLPA (de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Lo que se amplifican son las sondas ligadas (que pueden ser de varios tipos, hasta 40) porque todas comparten en cada extremo, un sector para el primero delantero y otro para el primero trasero, mientras las partes intermedias pueden variar según el ADN blanco.

La técnica de MLPA amplifica *sondas*, no el ADN objeto de estudio (que contiene un segmento complementario a cada tipo de sonda). Para que una sonda determinada sea amplificada, sus dos componentes, el *izquierdo* (el oligonucleótido puramente sintético) y el derecho (el derivado del vector viral M13) deben haber hibridizado perfectamente sobre el ADN "diana" y haber sido ligados entre sí por la ligasa.

De esa forma esa sonda particular cuenta con los dos prímeros, el "delantero" unido al componente "derecho" y el "trasero" unido al componente izquierdo, y está en condiciones de ser amplificada por la PCR.

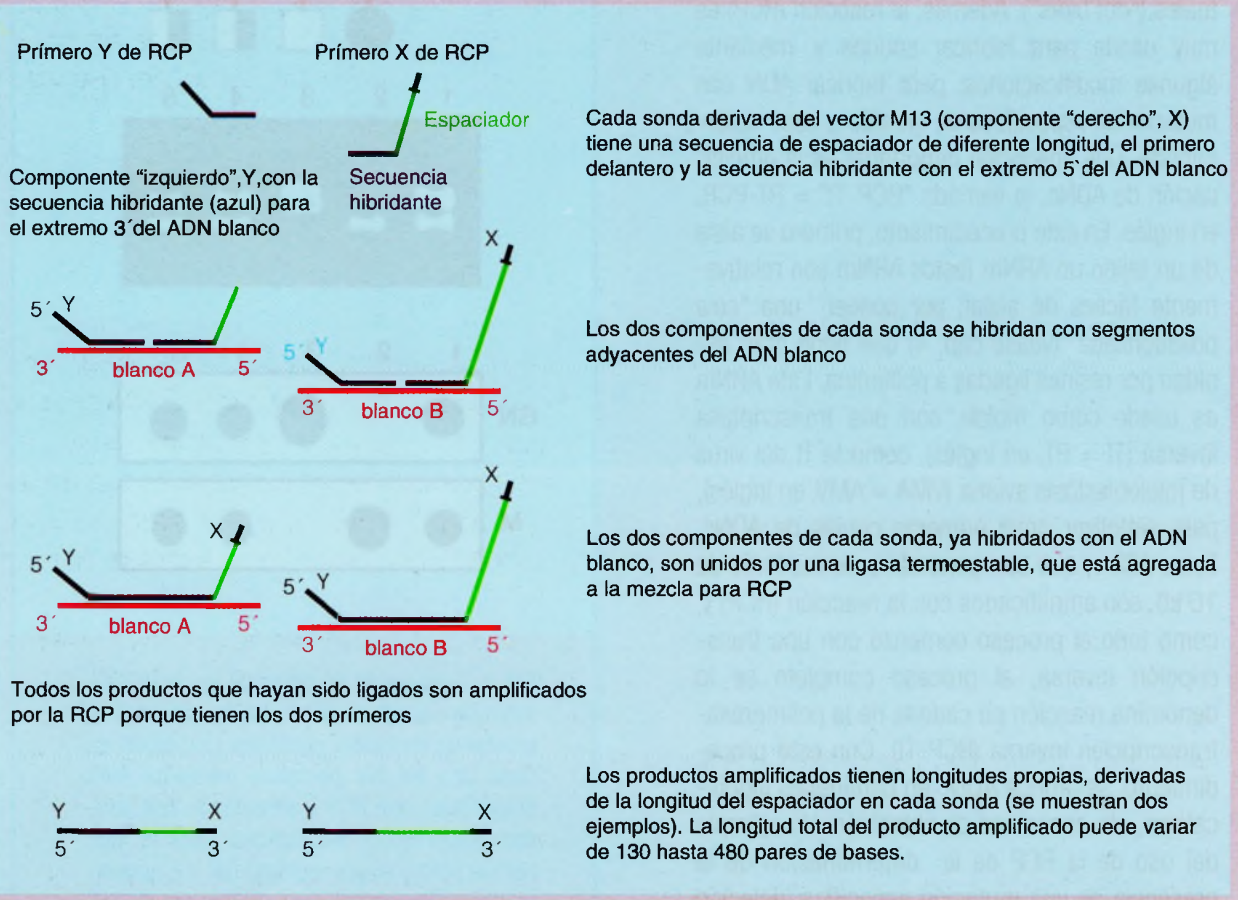


Fig. 2. Los productos amplificados por la RCP son separados y reconocidos mediante electroforesis. La amplificación de una sonda específica refleja la presencia, en el ADN blanco, de la secuencia complementaria; y además, la cantidad amplificada refleja cuál es el número de copias de dicha secuencia en el ADN blanco (p. ej., si hay una duplicación en el ADN, la cantidad amplificada será el doble de una normal).

Si, en cambio, no han ocurrido la hibridación perfecta y la unión por la ligasa, esa sonda particular no será amplificada porque permanecerá como dos componentes separados, cada uno con un prímero, no siendo aptos para ser amplificados por la PCR.

Esto se repite con cada una de las posibles sondas que se coloquen en la reacción para MLPA (hasta 40), que se diferencian por su tamaño, específicamente por la longitud del segmento "espaciador" (en inglés "stuffer" o "spacer").

¿Qué puede impedir que una de esas sondas dobles se hibridice sobre el ADN *blanco* y sea amplificada? Básicamente, la presencia de deleciones, o de duplicaciones en la secuencia del ADN *blanco,* es decir que la técnica de MLPA básicamente detecta *deleciones y duplicaciones,* aunque también, con ciertas modificaciones, detecta regiones metiladas.

La técnica de MLPA no se indica para detectar mutaciones puntuales de un nucleótido por otro, sino para deleciones y duplicaciones, y también para detectar la falta total o parcial de un cromosoma o su duplicación, es decir que puede usarse para detectar *aneuploidía, pero no puede usarse con una única célula, lo cual la excluye del diagnóstico genético preimplantario, que se hace con la técnica de FISH* (véase cap. respectivo). En la detección de aneuploidías en general, donde pueda usarse una muestra de tejido, la MLPA puede reemplazar al FISH, y también en numerosas enfermedades en las cuales hay deleciones o duplicaciones de múltiples nucleótidos, como la *distrofia muscular de Duchenne* (véase cap. de ligamiento al sexo) o la *enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.*

Debe señalarse que la MLPA requiere aparatos costosos (un termociclador de PCR cuantitativa y un secuenciador de ADN por electroforesis capilar) de modo que está restringida a centros con gran número de análisis. Requiere también conocer la secuencia exacta del ADN normal del gen por detectar y la fabricación de las sondas a pedido para dicho gen (o genes), que puede planificarse con programas especiales (Pantano L, Armengol L, Villatoro S, Estivill X. Proseek: a web server for MLPA probe design. BMC Genomics 2008;9:573-577).

RESUMEN

Se conoce con el nombre de "técnicas de ADN recombinante" un conjunto de procedimientos para cortar y repegar, en sitios específicos, moléculas de ADN de cualquier origen. Para cortar el ADN se usan las enzimas de restricción, que reconocen secuencias de bases del ADN (entre 4 y 8 pares de bases, en general) y que dejan extremos colgantes que facilitan el repegado. Los fragmentos de ADN así cortados son unidos a moléculas de ADN que les sirven de vehículo ("vectores") y que pueden ser plásmidos, cósmidos, fagos lambda o cromosomas artificiales de levadura ("CAL") y los cromosomas artificales de bacteria ("BACs").

Los fragmentos de ADN son identificados por electroforesis en gel de agarosa, por su tamaño o número de pares de bases (pb). Un fragmento puede "clonarse", es decir, puede ser introducido por un vector en una bacteria y multiplicarse, para luego poder aislar muchas copias del vector con el fragmento incluido. Las genotecas son colecciones de fragmentos de ADN que pueden abarcar todo el genoma. Las "sondas" de ADN son fragmentos de ADN marcados con isótopos o con reactivos que pueden identificarse por fluorescencia. Mediante el procedimiento de la "reacción en cadena de la polimerasa" (RCP) es posible replicar en un tubo hasta un millón de veces un fragmento de ADN, generalmente menor de 4.000 bases, pero que puede ser mayor con una técnica perfeccionada.

REFERENCIAS

1 Parada JL, La Vía MI, Solari AJ. Isolation of *Streptococcus lactis* bacteriophages and their interaction with the host cell. Appl Environ Microbiol 1984;47·1352-1354.

2. Kessier C, Neumaier PS, Wolf W. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases a review. Gene 1985;33:1 102.

3. Heitman J. How the *Eco*RI endonuclease recognizes and cleaves DNA. Bioessays 1992;14:445-454.

4. Murray AW, Szostak AW. Construction of artificial chromosomes in yeast. Nature 1983;305:189-193.

5. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. Gene 1990;96:23-28.

6. Ehrlich H, Arnheim N. Genetic analysis using the PCR. Ann Rev Genet 1992;26:479-506.

7 Linz U. Protocol optimization and the need for standardization of the polymerase chain reaction. Meth Mol Cell Biol 1991;2:98-102.

8. Cohen J. "Long PCR" leaps into larger DNA sequences. Science 1994;263:1564-1565.

9. Gatalica B, Pulkkinen L, Li K, Kuokkanen K, Rynanen M, McGrath JA, Vito J. Cloning of the humnan type VII collagen gene (COL17A1), and detection of novel mutations in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. Am J Hum Genet 1997;60:352-365.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Mickios DA, Freyer GA, DNA Science. A first course in recombinant DNA technology. New York: Coid Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

Sambrook J, Fritsch EF Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. Vols. I, II y III. New York: Coid Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Schouten JP McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Reiative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res 2002;30:12-57

Redeker EJW, de Visser, ASH, Arthur AB, Bergen AAB, Mannens MAM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders. Molec Vision 2008;14:836-840.

Capítulo 4

El material genético: ADN y cromosomas

La molécula de ADN. Desnaturalización e hibridación. Tipos de secuencias en el ADN humano. El ADN en el cromosoma. empaquetamiento. ADN centromérico y telomérico, orígenes de replicación

Los factores de Mendel o genes son segmentos de una de las moléculas más peculiares que existen. el ácido desoxirribonucleico o ADN Los ácidos nucleicos fueron descubiertos por el químico Friedrich Miescher, contemporáneo de Mendel, en la segunda mitad del siglo XIX (aunque desconocían ambos la proyección que tendrían sus trabajos) Solamente a partir de 1944 se asignó un papel genético al ADN en las bacterias y nueve años después, en 1953, James Watson y F. H. Crick propusieron su modelo de la estructura molecular del ADN, que señala el comienzo de la Genética Molecular. El ADN, a su vez, se encuentra en las células en paquetes organizados como "cromosomas", estructuras perfectamente visibles con el microscopio de luz y que fueran descritas por numerosos biólogos durante el siglo XIX.

Tanto el ADN como los cromosomas tienen una organización compleja, que se describe en este capítulo, dado que esta información estructural se refleja en la función génica.

ESTRUCTURA DEL ADN

Componentes del ADN

El ADN está compuesto por unidades (o monómeros) que se repiten muchos miles de veces a lo largo de la molécula: estas unidades se llaman *nucleótidos* y, por consiguiente, el ADN es un *polímero* muy grande de nucleótidos, es decir, un enorme *polinucleótido.*

En realidad, el ADN está formado por *dos* enormes polinucleótidos, cada uno de ellos con forma de hélice, es decir, es una doble hélice. El hecho de que la molécula de ADN sea en realidad doble resulta esencial para comprender sus funciones replicativas y transcripcionales, y además para comprender sus propiedades básicas, la "desnaturalización" y la "renaturalización" (véase más adelante)

Cada nucleótido es un compuesto orgánico formado a su vez por tres componentes: un radical del ácido fosfórico (o fosfato), un azúcar y una base nitrogenada. Para el ADN, el azúcar es la desoxirribosa y las bases nitrogenadas usualmente son sólo cuatro: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) Las dos primeras bases, que son mayores y están formadas por dos ciclos, se llaman bases púricas o *purinas*, mientras que las dos últimas, más pequeñas, son llamadas bases pirimídicas o *pirimidinas* (fig. 4-1).

Estas bases nitrogenadas (de ambos tipos, púricas y pirimídicas) absorben intensamente la luz ultravioleta corta en la longitud de onda de 259 nm, debido a su estructura en anillo con uniones covalentes dobles que poseen resonancia. El grado de absorción específica en 259 nm depende de las condiciones fisicoquímicas en las

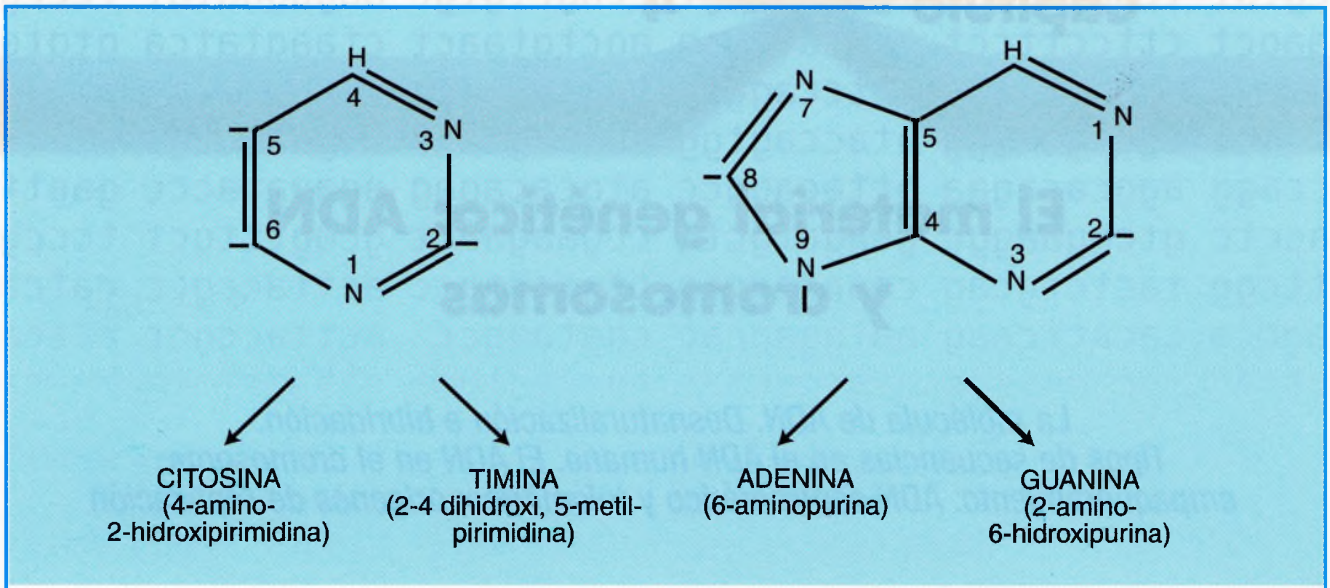


Fig. 4-1 Estructura básica y numeración de los átomos de los anillos de las pirimidinas (izquierda) y de las purinas (derecha). El N-1 se une a las pentosas en las pirimidinas y el N-9 lo hace en las purinas..

que se encuentran estas bases. Esto es importante porque la absorción en 259 nm, además de constituir un medio para el *dosaje rápido de ácidos nucleicos* en un espectrofotómetro, también permite determinar ciertas condiciones de la molécula de ADN, especialmente su "desnaturalización" (véase más adelante), por el aumento de absorción UV, también llamado *hipercromicidad.*

Las bases nitrogenadas intervienen en otros importantes componentes del metabolismo y son sintetizadas por el organismo. Estas bases nitrogenadas pueden formar "uniones de hidrógeno" (uniones relativamente lábiles) en algunos de sus átomos, al encontrarse en la inmediata cercanía de otro compuesto similar, y éste es el fundamento para las uniones complementarias entre las bases de las dos hélices.

Otro componente de los nucleótidos es la desoxirribosa (y en el ARN, la ribosa) La desoxirribosa (*2-desoxirribosa*) carece del oxhidrilo que posee la ribosa en el segundo carbono. Ambas son pentosas (de 5 carbonos) y poseen una estructura cíclica por el oxígeno del grupo aldehído del primer carbono, que se cierra sobre el carbono 4; por consiguiente, el último carbono (el 5') está *afuera del anillo.* Dos de estos carbonos, el 5' y el 3', por medio de sus oxhidrilos, se unen a 2 ácidos fosfóricos diferentes en cada cadena del ADN (fig. 4-2) y determinan la *polaridad* de cada cadena en el ADN dado que cada azúcar tiene uniones *diferentes* con dos fosfatos, se puede distinguir una cara "superior" y otra "inferior" en cada desoxirribosa en el ADN. Esta polaridad es una propiedad fundamental, puesto que muchas enzimas "leen" el ADN en el sentido 5' a 3' únicamente.

El otro elemento de los nucleótidos es el ión fosfato, con 3 valencias capaces de combinarse. En un nucleótido de desoxirribosa, una valencia del fosfato se une al azúcar, que puede ser una unión al carbono 5' o al carbono 3' (el 2' no puede combinarse por carecer de oxhidrilo) Todos los nucleótidos usados en la síntesis de ácidos nucleicos poseen el fosfato unido al carbono 5', de modo que sólo pueden agregarse a un extremo con un carbono 3' En el ADN, 2 valencias de cada fosfato se unen con 2 desoxirribosas distintas y queda una valencia libre por cada fosfato, lo cual le da un carácter fuertemente ácido y la característica carga negativa del ADN

El fosfato de cada nucleótido convierte al ADN en un polímero *cargado negativamente*, es decir, un *polianión.* Por ello, el ADN es sensible a otras cargas eléctricas: las cargas negativas (como las de otro ácido nucleico) lo repelen, en cambio,

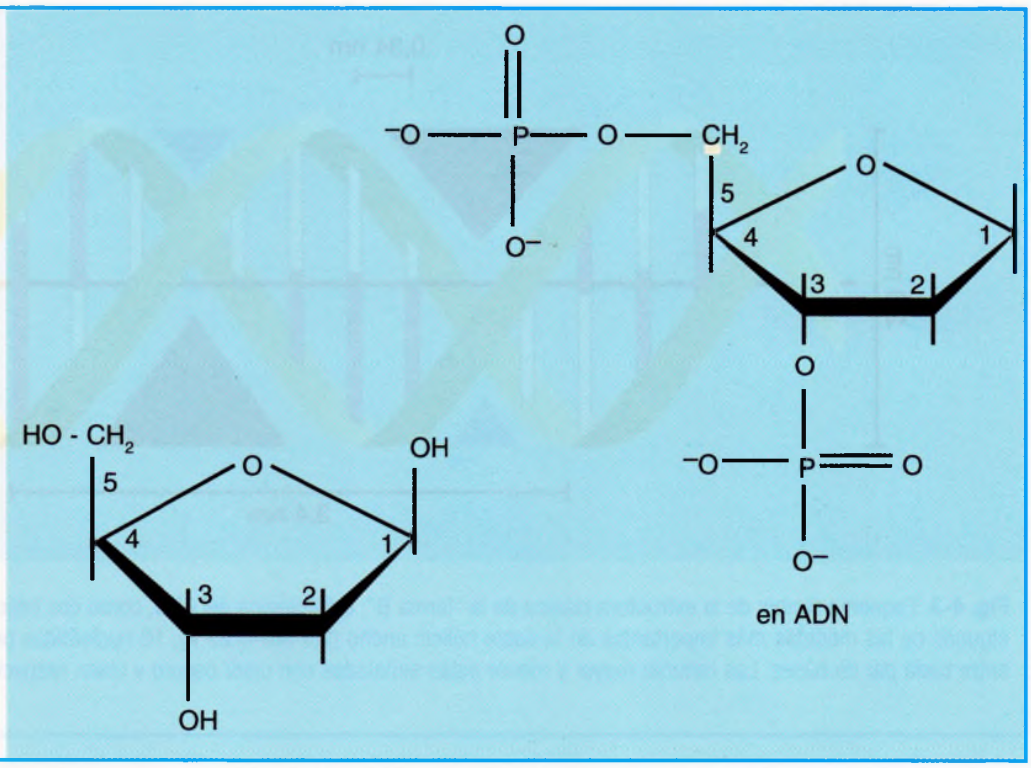


Fig. 4-2. Estructura de la desoxirribosa (izquierda) y sus uniones con ácido fosfórico en el ADN (derecha).

atrae cargas positivas, que pueden ser las de cationes, como los comunes Na^+, K^+ (monovalentes) y mucho más los divalentes como Ca^{++} o Mg^{++} (estos últimos, en cantidades pequeñas, hacen precipitar los ácidos nucleicos)

Estructura de la molécula de ADN

Los nucleótidos se van colocando en fila en cada una de las dos hélices del ADN y siguen en el espacio un trayecto de *hélice derecha*, es decir, las hélices giran en sentido de las agujas del reloj (en una hélice izquierda lo harían en sentido inverso al del reloj), como las espiras de un tornillo común (fig. 4-3)

En el ADN en condiciones normales ("forma B") las dos cadenas son hélices derechas pero, en ciertas condiciones y en segmentos que poseen secuencias alternadas de bases (C-G), se pueden formar hélices izquierdas en lo que se ha denominado la "forma Z" del ADN, cuyo papel en la función celular no es bien conocido. Sin embargo, en la enorme mayoría de los casos, el ADN, en condiciones fisiológicas, se encuentra en la forma clásica de hélice derecha (forma B) Varios hechos muy importantes son ya visibles en un esquema o modelo simple del ADN

a) en primer lugar, la gran *regularidad* de esta estructura un tanto engañosa, puesto que cada secuencia de bases puede alterarla ligeramente),
b) la capacidad de crecer o *alargarse indefinidamente*: en efecto, la doble hélice natural puede alcanzar longitudes totalmente extraordinarias para una molécula, tales como 10 cm o más; este hecho desconcertó totalmente a los bioquímicos entre los años 1950 y 1970;
c) la constitución de una molécula que está formada por *dos hélices, no iguales*, sino exactamente *complementarias* una con respecto a la otra, es decir que son como una llave y su cerradura (o un molde y la pieza moldeada) Estas dos hélices son denominadas (por convención) positiva (+, la que corre y se lee en el sentido desde el telómero del brazo corto hacia el centrómero) y negativa (–, la que se lee en sentido opuesto), en ambas hélices hay codificación génica y por ello de cada gen se especifica si está localizado en la cadena positiva o en la negativa. Generalmente, en un punto determinado un gen está en una hélice y la complementaria no codifica para proteína, y en ese caso la hélice no codificante, que es complementaria de la codificante, tiene

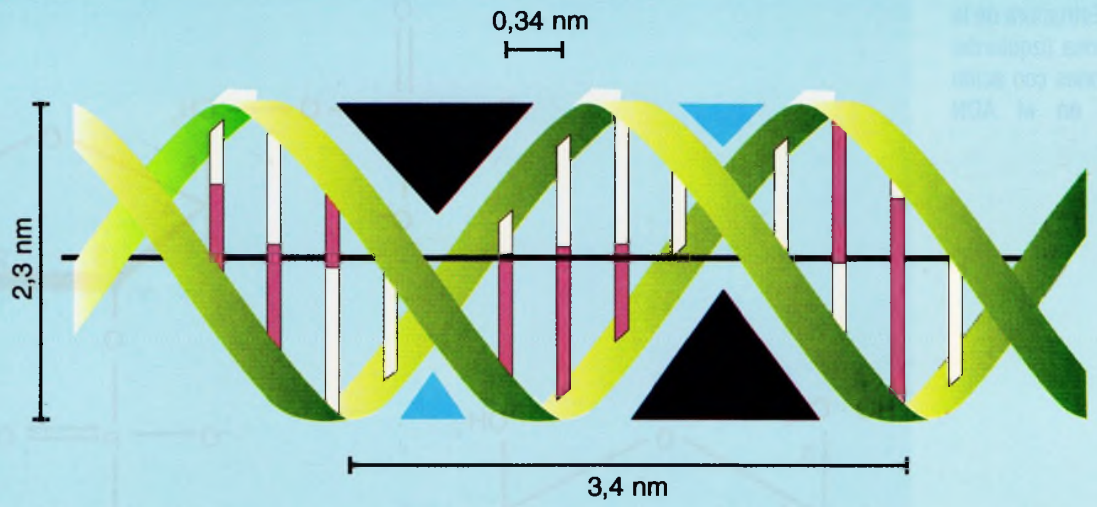


Fig. 4-3. Esquema simple de la estructura clásica de la "forma B" o fisiológica del ADN, como dos hélices derechas (en verde), con algunas de las medidas más importantes de la doble hélice: ancho (2,3 nm = 23 Å), 10 nucleótidos por giro completo, y 0,34 nm entre cada par de bases. Las ranuras mayor y menor están señaladas con color oscuro y claro, respectivamente.

una secuencia "de sentido", igual a la del ARN mensajero. Por convención, cuando se describe la secuencia de bases de un ADN, se escribe sólo la de la hélice "de sentido", ya que su secuencia es la misma que la del ARNm (con timina en vez de uracilo) (véase cap. 5),

d) la única forma de unión entre cada una de las dos hélices son las *uniones hidrógeno* entre bases de una y otra cadena, uniones que son muy débiles individualmente pero que, sumadas a lo largo de un segmento que contiene cientos o miles de bases, pueden unir firmemente las dos hélices. Al mismo tiempo, la labilidad de estas uniones hidrógeno permite su fácil ruptura en cada segmento pequeño (el ADN "respira" abriéndose y cerrándose en segmentos pequeños), lo cual es fundamental para la función del ADN;

e) además, dos hélices *derechas*, para ser complementarias, deben "caminar" en sentidos opuestos: las dos hélices (la + y la –) son *antiparalelas*, lo cual se advierte mejor al mirar la posición de las desoxirribosas en cada una de las dos cadenas: mientras una "avanza" (de abajo hacia arriba) con el carbono 5' hacia arriba del ciclo de la pentosa, la otra lo hace con el carbono 3' (fig. 4-4);

f) la columna vertebral de cada hélice está formada por los iones fosfato que establecen uniones con dos desoxirribosas contiguas (uniones fosfodiéster), de tal manera que la ruptura de una unión fosfodiéster significa *cortar una de las dos cadenas o hélices* (función que cumplen las endonucleasas, véase cap. 3);

g) las bases nitrogenadas, en el espacio, quedan situadas hacia el *centro* de la columna formada por la doble hélice, mientras las columnas vertebrales de fosfatos quedan hacia afuera;

h) el espacio entre las dos columnas vertebrales exteriores, formadas por las uniones fosfodiéster, acomoda exactamente un *par de bases*, una grande (purina) y una chica (pirimidina), es decir que el espacio sólo permite, en un sitio, alguna de cuatro alternativas:

C-G; G-C; A-T y T A

i) no hay ninguna restricción para la *secuencia* de bases a lo largo de cada cadena y, por consiguiente, en esa secuencia se puede codificar información indefinidamente;

j) por último, las dos cadenas o hélices están relativamente próximas a lo largo del ADN, por lo cual forman dos "ranuras": una gran-

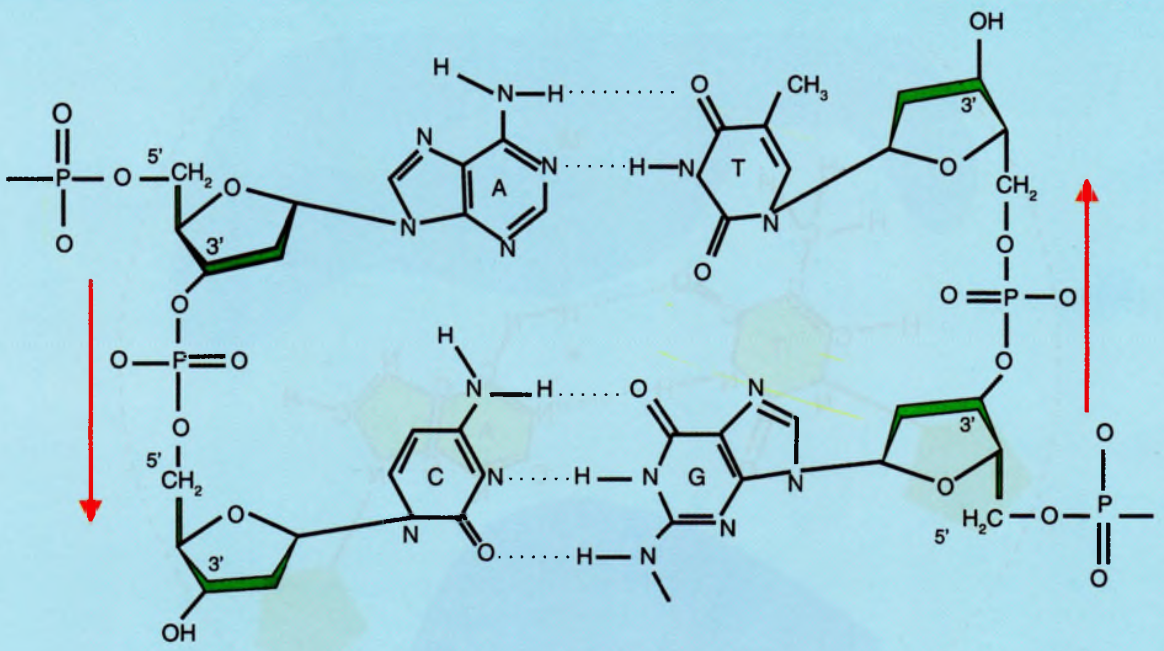


Fig. 4-4. Esquema plano de la estructura de un segmento de la doble hélice. La polaridad de cada cadena está dada por la posición de las pentosas y señalada por flechas.

de (o ranura mayor) y una ranura menor. Estas "ranuras" son los espacios abiertos por los cuales el ADN se "comunica" con las proteínas más importantes que regulan la transcripción del ADN y el reconocimiento de sus señales.

Los únicos pares de bases posibles son A-T y G-C (o sus inversas T-A y C-G) Ahora bien, estos dos tipos de parejas difieren en sus uniones hidrógeno; mientras la pareja A-T forma *dos* uniones hidrógeno, la pareja C-G forma *tres*; es decir que esta última pareja está ligada un poco más firmemente (en realidad *una sola* pareja no resistiría la disociación a temperatura fisiológica). Esto significa que las *regiones* del ADN donde hay gran frecuencia de pares C-G están más unidas que las regiones donde hay gran frecuencia de pares A-T, lo cual permite que haya regiones que "respiran" más fácilmente que otras (fig. 4-5).

Las bases (o pares de bases, si se consideran las 2 hélices) están colocadas transversalmente al eje de la doble hélice, de tal manera que, al ser moléculas más bien achatadas, se disponen como *pilas* de fichas o cartas (un poco torcidas y parcialmente sin superponer) a lo largo del ADN Este *apilamiento* de las bases hace que puedan interactuar con las contiguas, a través del espacio de separación entre una pareja y la siguiente. Sin embargo, el espacio es suficiente como para que otras moléculas planas entren en ese espacio: son las sustancias *intercalantes*, importantes modificadores y colorantes artificiales del ADN

Finalmente, se debe considerar la conclusión de que el *grado de torsión* de la hélice no es absolutamente fijo, sino que varía con la secuencia de bases que están en cada segmento y tiene una *medida media* para todo un ADN (que es de casi 36° para la forma B, es decir, 360° por vuelta de hélice de 10 pares de bases) [1] Esto tiene importancia debido a que el grado de torsión del ADN influye sobre su capacidad transcripcional.

MORFOLOGÍA DEL ADN

Morfología con microscopia electrónica

El ADN sólo es visible con microscopia electrónica. Esto es a causa de su ancho, de 2,3 nm,

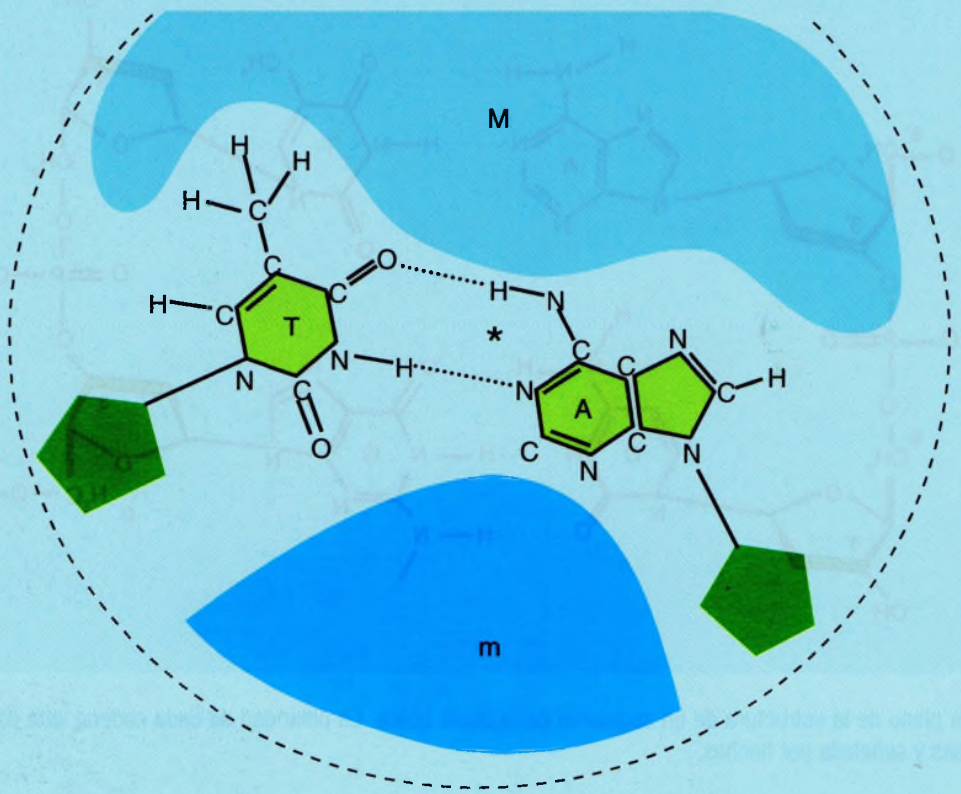


Fig. 4-5. Esquema de una de las dos parejas de bases, vistas desde arriba de la doble hélice (corte transversal de ésta). El eje longitudinal del ADN está señalado por un asterisco y pasaría perpendicular a esta hoja. La ranura mayor (M) y la ranura menor (m) están señaladas en celeste y azul.

que está muy por debajo del límite de resolución del microscopio de luz. Pero además se trata de moléculas enormemente largas (centímetros), por lo cual son extremadamente frágiles. Los procedimientos químicos habituales (pipeteo, agitación y otros) cortan las moléculas de ADN nativas en fragmentos pequeños. Por, eso es necesario usar técnicas especiales, como las técnicas de extensión sobre superficies líquidas.

El ADN nativo se ve con esas técnicas como filamentos muy largos con cierta elasticidad, que le permiten tomar formas con curvaturas pronunciadas y gran regularidad en el ancho, el cual se puede medir directamente (figs. 4-6 y 4-7)

Mapas de desnaturalización y de hibridación: lazos R y D

Dado que las dos hélices del ADN se separan a temperaturas variables entre 70 y 95 °C (de acuerdo con el medio ambiente, véase más adelante) y que los segmentos más ricos en pares A-T se separan a menores temperaturas, es posible hacer "mapas de desnaturalización parcial" del ADN a una temperatura determinada: se observan ojales en las regiones ricas en A-T, donde las hélices simples, por su menor ancho, tienen menor contraste (se estabilizan con formaldehído para que no se renaturalice el ADN durante la preparación) Otras observaciones directas pueden hacerse cuando se desnaturalizan dos ADN diferentes y luego se asocian (se renaturalizan o hibridan entre sí, véase más adelante) De esta manera, es posible observar regiones de asociación entre dos cadenas simples de ADN diferentes, porque son complementarias, y regiones sin asociación, porque no está presente la secuencia complementaria. Las regiones no complementarias de 2 ADN pueden formar lazos de cadena simple, similares a los de desnaturalización, lla-

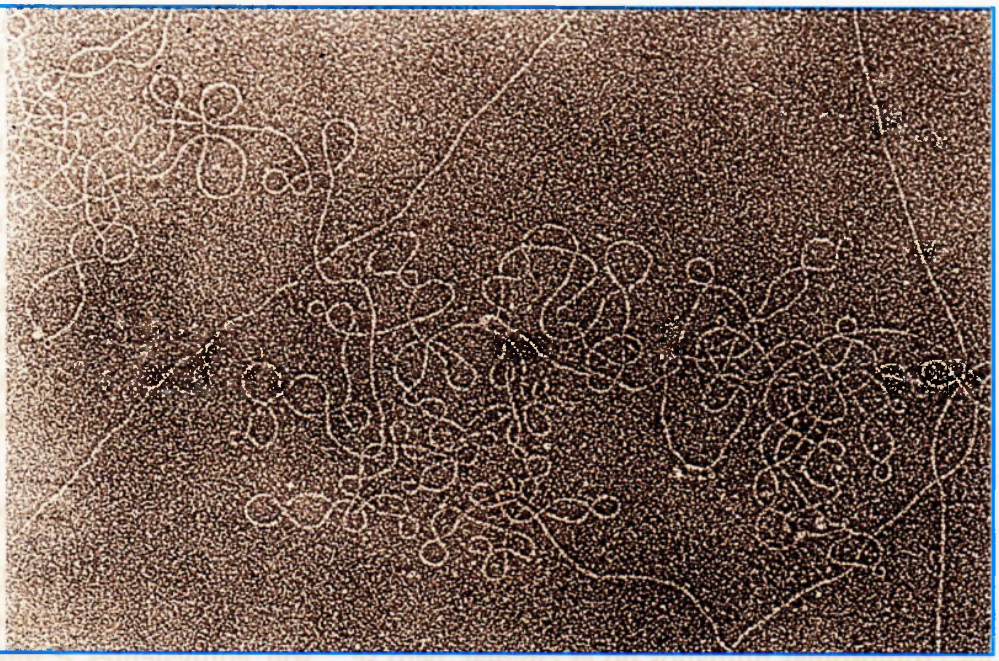


Fig. 4-6. Molécula de ADN nativo de espermatozoides de erizo de mar. No se observan extremos libres. Técnica de esparcido y sombreado metálico rotatorio. Microfotografía electrónica.[2]

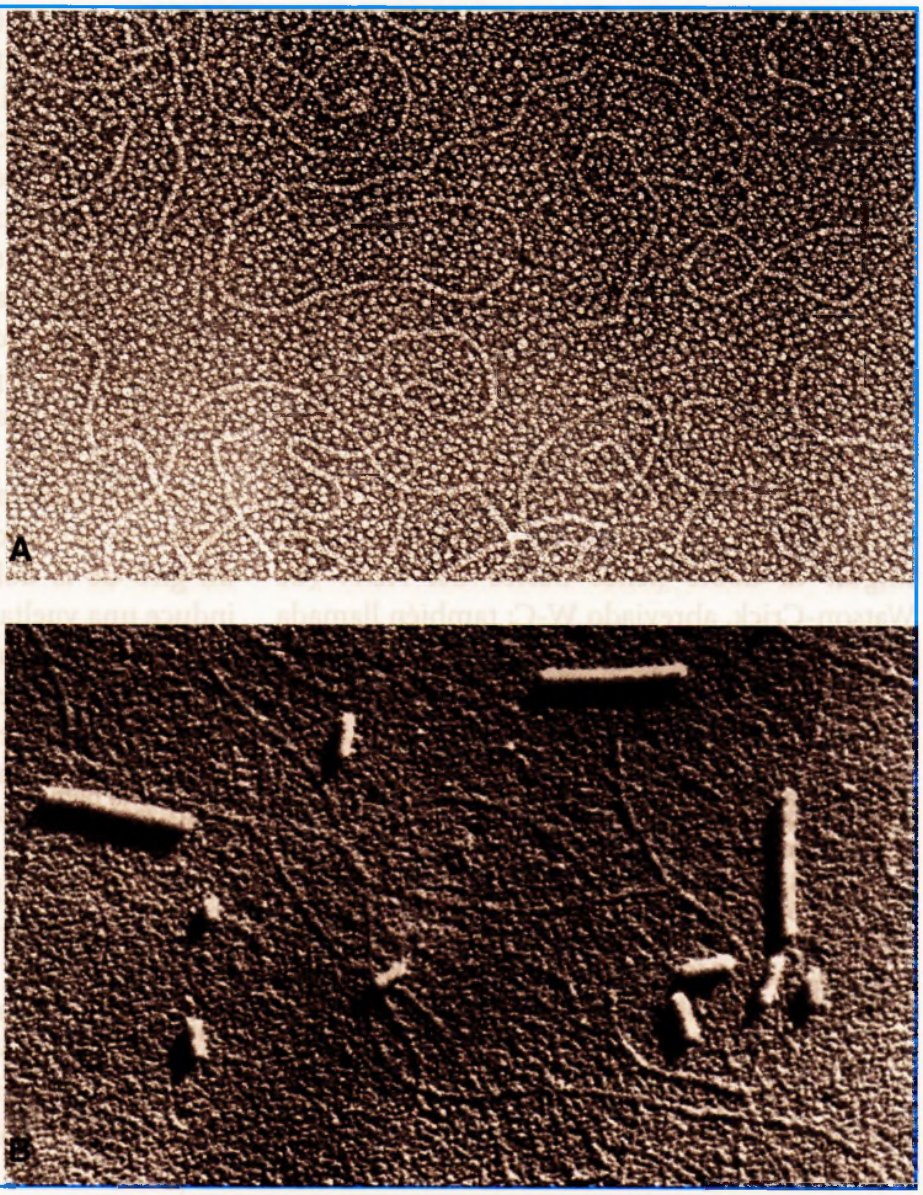


Fig. 4-7 A. Fragmentos de ADN producidos por manipulaciones químicas habituales. **B.** Determinación del ancho de moléculas de ADN por sombreado metálico unidireccional. Se compara la magnitud de la sombra arrojada por un virus cilíndrico conocido (VMT virus del mosaico del tabaco) con la de los filamentos de ADN.[2]

mados "lazos-D" (de desoxirribonucleico) Por otra parte, un ARNm se asocia (se hibrida) exclusivamente con los exones del ADN de los cuales se transcribió y deja los intrones como lazos de cadena simple unidos a una doble hélice híbrida de ARN con ADN, estos lazos se llaman "lazos-R" (de ribonucleico) y son útiles para estudiar estos intrones.[3]

Conformaciones especiales: ADN circular

Hay numerosos casos de ADN circular en la naturaleza. El ADN de las mitocondrias humanas es circular, como lo es el ADN de plásmidos, el ADN bacteriano y el de ciertos virus. El ADN de los cromosomas humanos no es circular, pero se comporta como si lo fuera, en segmentos o lazos que poseen un sitio de adhesión a una proteína en su base, que hace puente entre dos sectores del ADN Estos "lazos" de ADN son uno de los órdenes fundamentales de empaquetamiento del ADN en el cromosoma (véase más adelante y fig. 4-14).

Por consiguiente, las propiedades del ADN circular son importantes para comprender su función. Un ADN circular puede encontrarse sin ninguna torsión adicional, a eso se lo llama el estado "relajado" Pero en las células, los lazos de ADN presentan una torsión adicional, que causa un *superenrollamiento* (o una *superespiral*) en el ADN, por el cual la molécula se tuerce y se entrecruza consigo misma (fig. 4-8) Es necesario distinguir la doble hélice básica del ADN (de Watson-Crick, abreviado W-C; también llamada hélice "secundaria" por corresponder a la estructura secundaria o espacial de la cadena) del superenrollamiento (llamado hélice "terciaria") donde la molécula cilíndrica formada por la doble hélice es la que se tuerce en espiral.

En la célula, el ADN de la cromatina presenta superenrollamiento *negativo*, porque los giros de la superespiral tienen sentido contrario al de las hélices derechas de la molécula de ADN, cuando el sentido de los giros de la superespiral coincide con los de la molécula de W-C, se denomina *superenrollamiento positivo*. En la célula, al ser negativo, tiende a destorcer los giros de las hélices de Watson-Crick. El superenrollamiento se debe a una variación de la torsión que tendería a hacer más giros de las hélices de Watson-Crick en el positivo, y a destorcerlas en el negativo. Existe una relación matemática que define el estado de superenrollamiento del ADN sobre la base de L, el llamado "número de enlace" (es el número de veces que una de las dos cadenas de W-C cruza a la otra en la molécula, y es constante mientras no se corte ninguna cadena); N, el número de giros de la hélice de W-C, y W, el número de vueltas de superenrollamiento (de la hélice terciaria)

$$L = N + W$$

Es decir que al ser L constante, el número de giros de la hélice secundaria y los de la terciaria son equivalentes e interconvertibles con signo opuesto. Dado que una forma superenrollada tiende a relajarse (es decir, a que W sea cero), un superenrollamiento *negativo*, como el que existe in vivo, al aproximarse a 0 (relajarse) tiende a producir un menor número de vueltas en la hélice de W-C, es decir, tiende a desnaturalizar o "abrir" el ADN con un significado funcional, ya que procura que se lleve a cabo la transcripción (que requiere la "apertura" de la doble hélice).[4,5]

La equivalencia topológica entre giros de la cadena de W-C y giros de superenrollamiento de signo opuesto hace que una disminución del número de giros de las cadenas de W-C pueda ser compensada por un aumento de superenrollamiento positivo; una proteína que destuerza un giro de la doble hélice (10 pares de bases) induce una vuelta positiva de superenrollamien to (o una disminución en una vuelta de un superenrollamiento negativo) El ADN en la cromati na se encuentra enroscado alrededor del centro de los nucleosomas, con la forma de una superhélice negativa o izquierda; para la transcripción, el ADN debe desenroscarse momentáneamente del nucleosoma, lo cual es favorecido por una proteína que suprima giros de W-C e induzca la desaparición del superenrollamiento negativo. La transición de la forma usual (B) de W-C a una forma Z de ADN, que es una hélice izquierda (levógira), es equivalente a destorcer giros de la doble hélice de W-C. Un ejemplo sería el de un ADN circular de 1 kb (1.000 bases), como cada

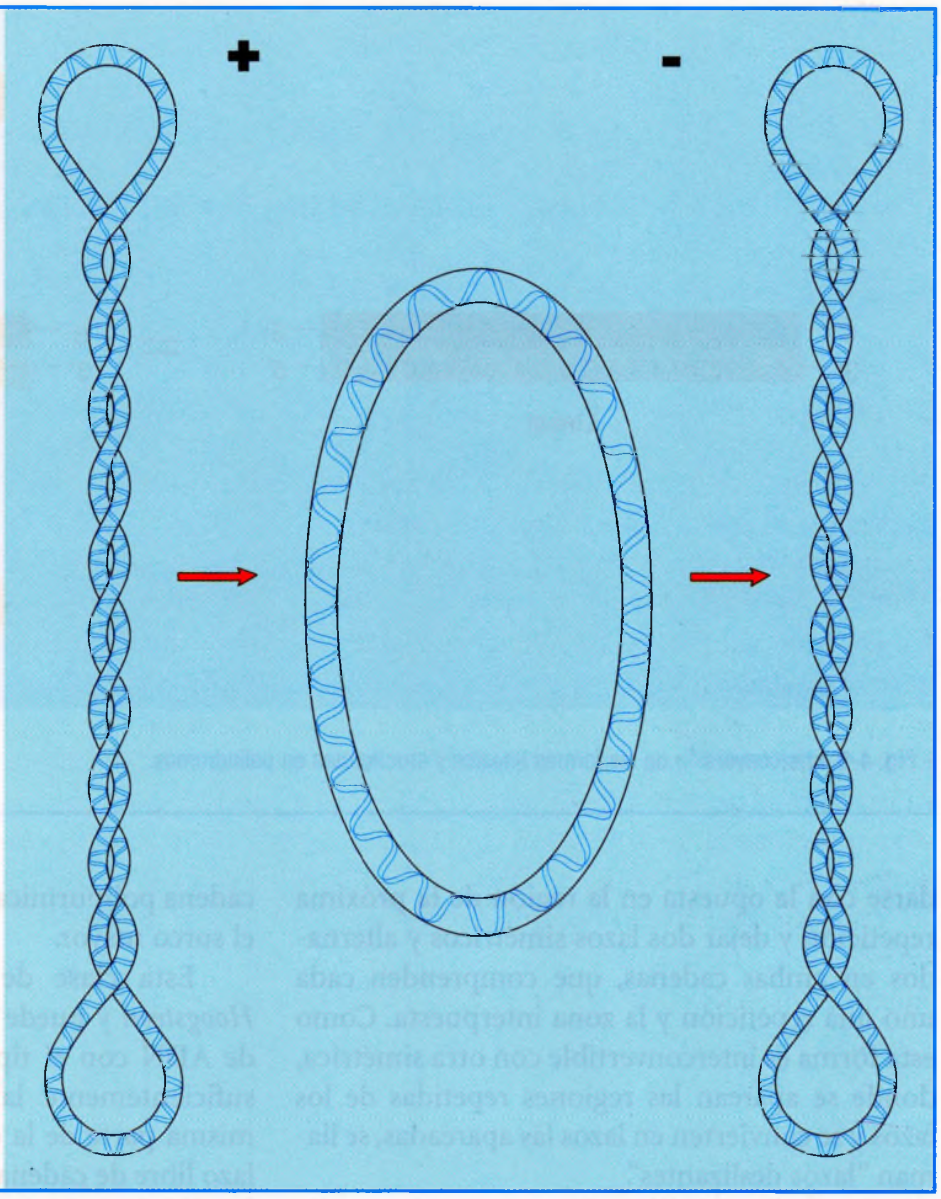


Fig. 4-8. Forma relajada del ADN circular (centro) y las superenrolladas positiva (izquierda) y negativa (derecha).

vuelta de hélice de W-C ocurre cada 10 bases, en estado *relajado* este ADN tiene 100 giros (N = 100) y el número de enlace es L = 100 + 0 − 100 (sin superenrollamiento) Si se desnaturaliza un segmento de 100 pares de bases, se destuercen 10 giros de W-C y por eso se inducen 10 giros de superenrollamiento positivo:

$$100 = L = (100 \quad 10) + 10$$

ADN cruciforme, ADN de lazos deslizantes y ADN de retorcimiento irregular

La presencia de regiones del ADN con secuencias palindrómicas de bases, es decir, secuencias repetidas e invertidas, no es infrecuente.[6] Las secuencias pueden ser cortas (como las reconocidas por enzimas de restricción, véase cap. 3) o más largas y separadas por una región de secuencia no repetida. En este último caso, si esta región del ADN se desnaturaliza, las cadenas pueden aparearse consigo mismas y determinar un tipo cruciforme (fig. 4-9) Este tipo de conformación produce tallos y lazos en los extremos de los tallos. A su vez, los cruciformes son convertibles en formas lineales, de tal manera que existe una equivalencia entre ambas formas.

De manera similar, en regiones donde hay repeticiones directas, separadas por una corta secuencia no repetida, una cadena puede hibri

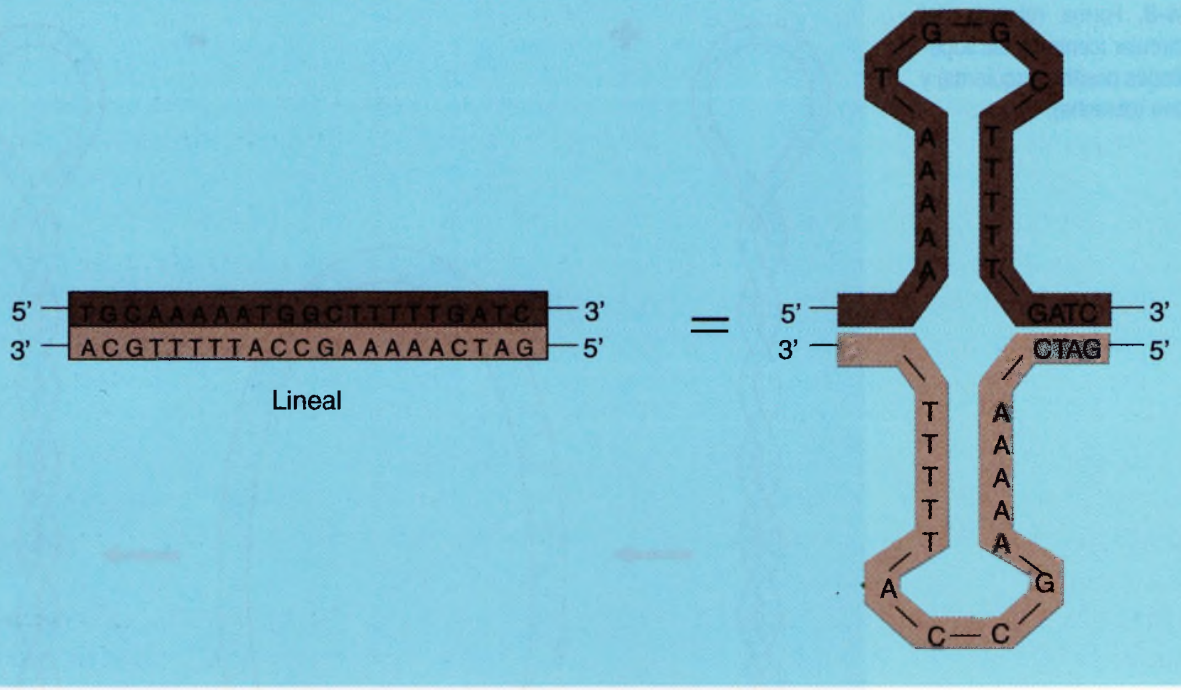


Fig. 4-9. Interconversión de las formas lineales y cruciformes en palíndromos.

darse con la opuesta en la región de la próxima repetición y dejar dos lazos simétricos y alternados en ambas cadenas, que comprenden cada uno una repetición y la zona interpuesta. Como esta forma es interconvertible con otra simétrica, donde se aparean las regiones repetidas de los lazos y se convierten en lazos las apareadas, se llaman "lazos deslizantes"

En forma más general, numerosas proteínas con afinidad por el ADN, al asociarse a él lo distorsionan y tuercen la doble hélice en forma más o menos irregular.

ADN de hélice triple

En ciertas regiones del ADN es posible la formación de hélices triples. En esas regiones, una de las dos cadenas posee una secuencia exclusivamente purínica, con una alternancia regular de ambas purinas (tipo AGAGAGAG) Los otros dos segmentos de hélices que forman estas regiones son exclusivamente pirimídicos. En dichas regiones se producen uniones entre tres bases en el mismo plano, de las cuales un tipo se establece entre dos de las hélices y es del estilo W-C, y el segundo tipo se establece entre la cadena polipurínica y la tercera hélice, que ocupa el surco mayor.

Esta clase de uniones se denomina de *Hoogsteen* y puede producirse en una molécula de ADN con el tipo citado de secuencia (si es suficientemente larga), al replegarse sobre sí misma parte de la cadena pirimídica y dejar un lazo libre de cadena simple polipurínica. Un tipo similar de uniones sería importante en las zonas teloméricas.

PROPIEDADES FUNCIONALES DEL ADN: DESNATURALIZACIÓN E HIBRIDACIÓN

Desnaturalización del ADN: temperatura de "fusión" (T_m)

Las dos cadenas del ADN de doble hélice están unidas entre sí sólo por las uniones hidrógeno entre sus bases nitrogenadas; estas uniones son débiles individualmente y están permanentemente amenazadas de romperse por agitación térmica, aun con moderados ascensos de temperatura. A una cierta temperatura, llamada "temperatura de fusión" (T_m), o de transición hélice-

ovillo, hay en promedio un 50% de uniones hidrógeno rotas en una molécula o fragmento de ADN y, a 7 10 °C por encima de esa temperatu ra, el 100% de las uniones están rotas; es la llamada "temperatura de separación de cadenas" (T_{ss}) (fig. 4-10)

Estas temperaturas, en especial la T_m, caracterizan el proceso de "desnaturalización" de un ADN, que equivale a la separación de las cadenas. El proceso de desnaturalización ocurre en la célula viva y a temperatura fisiológica por la intervención de enzimas, que se asocian al ADN y catalizan el destorcimiento de las cadenas con disolución de los puentes hidrógeno. La apertura (localizada) de las hélices es necesaria para la replicación y para la transcripción del ADN, así como para todos los métodos de diagnóstico que se basan en la hibridación de ácidos nucleicos.

La T_m de un segmento de ADN depende de su secuencia de bases y de las condiciones del medio que lo rodea. La T_m, por ejemplo, crece 0,41 °C por cada aumento de la concentración de pares G-C en un 1% y decrece con la dismi nución de longitud del segmento. Por otra parte, si existen bases mal apareadas, cada 1% de incremento en fallas de apareamiento dismi nuye 0,72 °C la T_m. Las condiciones del medio también son importantes para la desnaturaliza ción, aparte de la temperatura, en especial la concentración de cationes (Na^+ y divalentes) que saturen las cargas negativas de los fosfatos de las dos hélices. Esas cargas negativas se repelen y, en ausencia de cationes, tienden a separar las dos hélices, es decir, a desnaturalizar el ADN, lo cual tiende a ocurrir si es disuelto en agua destilada. El proceso inverso a la desnaturalización es la "renaturalización" o hibridación, es decir, es la formación de dobles hélices a partir de cadenas sencillas. Se usa el término renaturalización generalmente cuando se reasocian dos cadenas simples de ADN con perfecta complementariedad, e hibridación cuando se asocian una cadena de ADN y otra de ADN o de ARN que se usan como "sondas" (véase cap. 3), y que no necesariamente tienen complementariedad perfecta (véase fig. 4-10)

En técnicas diagnósticas de hibridación, se denomina *estrictez* (*stringency*) de las condiciones de hibridación, a las condiciones que más disminuyen la posibilidad de asociaciones azarosas que no poseen secuencias estrictamente complementarias. Las condiciones de hibridación de *alta estrictez* (temperatura más elevada, menor fuerza iónica, presencia de sustancias como la formamida que rompen puentes de hidrógeno entre las bases) tienden a asegurar que la hibridación se hace entre secuencias específicas y estrictamente complementarias. Por otro lado, cuando se precisa reconocer una similitud parcial (p. ej., de sólo el 50% de la secuencia) entre moléculas

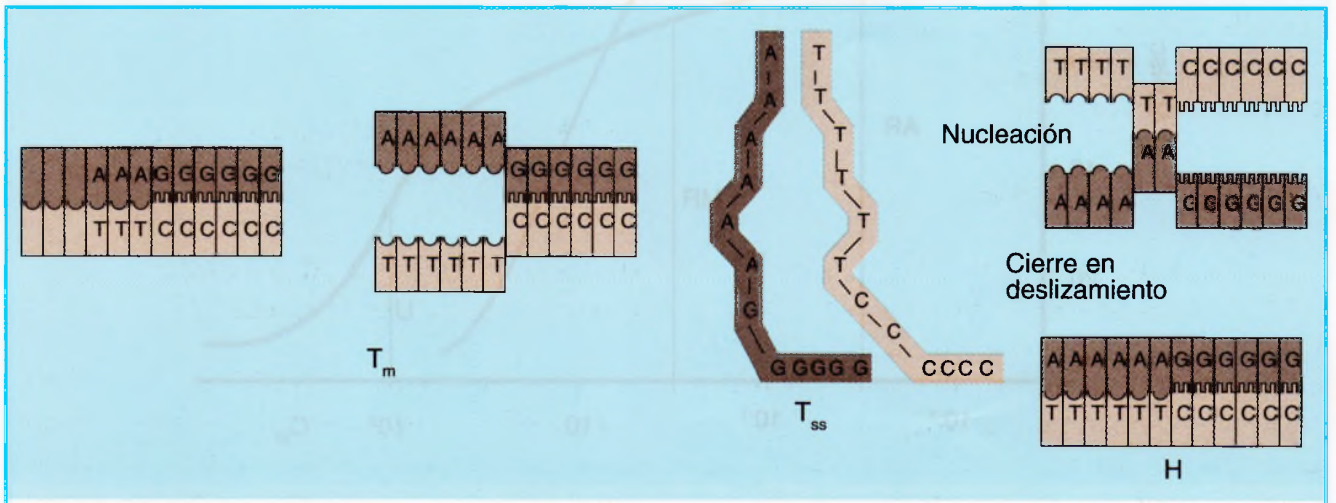


Fig. 4-10. ADN nativo, desnaturalización y reasociación o hibridación (H). Se representan los estadios intermedios a las temperaturas T_m y T_{ss}, en la hibridación la primera fase es de formación de cortos segmentos hibridados ("nucleación) y luego de cierre "en deslizamiento"

de ADN diferentes, se usan condiciones de hibridación "relajadas"

Pasos de la hibridación

En la desnaturalización y en su inversa, pueden distinguirse dos fases: mientras la desnaturalización no es total, la apertura de las hélices puede revertirse con cierta rapidez (en la T_m); pero cuando se separan totalmente las dos cadenas (T_{ss}), la reasociación es mucho más trabajosa o lenta. Esto es así porque las cadenas separadas, para hibridar, deben realizar dos pasos cualitativamente diferentes: primero, lograr la coincidencia de acercamiento y unión complementaria por primera vez entre un pequeño grupo de bases; éste es el paso de *nucleación*,[7] y su cinética es de segundo orden (es decir su velocidad de reacción es más lenta); luego, rápidamente se va extendiendo como un cierre el "abrochamiento" de las demás uniones; este paso es el de cierre en deslizamiento y su cinética es de primer orden (más rápida). El paso de nucleación será tanto más rápido cuanto más probable sea encontrar secuencias complementarias entre las hélices; si las hélices tienen (cada una de ellas) secuencias repetidas, el encuentro será más probable que si todas las secuencias son diferentes. A la inversa, si los datos experimentales muestran una nucleación rápida, esto indicaría la presencia de secuencias repetidas. En esta propiedad se basa el análisis de la *complejidad* del genoma humano.

Determinación del grado de reiteración de secuencias. Curvas "Cot"

El estudio de la reasociación de segmentos del ADN luego de su desnaturalización ha permitido determinar la existencia de *secuencias reiteradas* (o repetidas) en el ADN y establecer aproximadamente su grado de repetición. Estos análisis generalmente se representan en gráficos "Cot" (derivado de C_{0t}, que es el producto de la concentración inicial multiplicada por el tiempo) (fig. 4-11) Ésta es una forma de graficar la velocidad con la que los segmentos de cadena única se van hibridando a medida que varía la

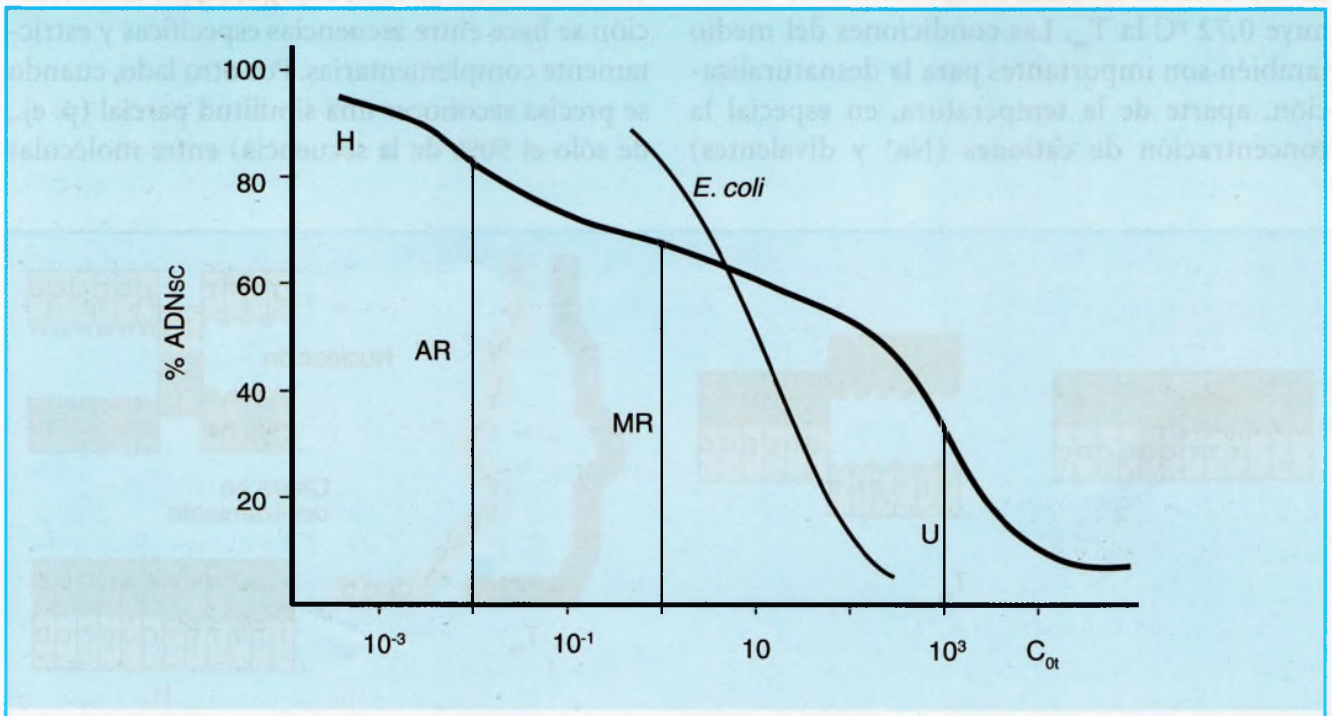


Fig. 4-11 Curvas C_{0t} del ADN de *E. coli* y de ADN humano (H). El ADN de *E. coli* casi no posee secuencias repetidas y da una curva simple, en S invertida. El humano presenta dos hombros, debido a la presencia de secuencias altamente reiteradas (AR) y de secuencias moderadamente reiteradas (MR), además de secuencias únicas (U).

Cuadro 4-1. Tipos de secuencias del genoma humano de acuerdo con su grado de repetición

Tipo	Denominación	Características y ejemplos
De alta repetición	ADN satélites	10^6 copias*; ejemplos: Alfoide (centrómeros; unidad = 171 pb) DYZ1 DYZ2 (Heterocromatina Y) Satélite β (unidad = 68 pb)
De moderada repetición	Retroposones	LINEs, SINEs, pseudogenes procesados 10-10^4 copias o más
	Transposones	Transposón THE humano; 10-10^2 copias
	Familias génicas	$ARNr^{18s}$ $ARNr^{28s}$ ARNt, etc., 10^2 copias
	ADN telomérico	(TTAGGG)n, 10^4 copias
	ADN minisatélite	Muy polimórfico; 10^2-10^3 copias
	ADN microsatélite	(CA)n; (TG)n; 10^5 copias, muy polimórfico
De secuencia única	Genes de proteínas	Copia única Estructura génica
	ADN intergénico no repetido	Función desconocida

*Se indica sólo el orden de magnitud de las repeticiones.

concentración de ADN o el tiempo de contacto; las curvas miden el porcentaje de ADN remanente de cadena simple, por cada variación del producto C_{0t} (en escala logarítmica) Las curvas de un ADN que sólo posee secuencias únicas son de tipo S invertida (simple) y si el número de bases en la secuencia es pequeño, están cerca del origen. Las curvas Cot del ADN humano no son simples y están alejadas del origen. Esto implica el gran tamaño de las secuencias únicas y la presencia adicional de secuencias repetidas con variados grados de repetición. La complejidad del genoma es la cantidad total de pares de bases que no se encuentran en secuencias repetidas en ese genoma; las curvas Cot permiten determinar esa complejidad.

CLASIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL ADN HUMANO

El genoma humano, constituido por 3.000 megabases (3×10^9 bases), posee una estructura compleja que, además de las secuencias de bases que codifican genes estructurales de ARN (de ARNr, ARNt) y las que codifican proteínas, posee numerosos segmentos con otras significaciones, que constituyen alrededor del 90% del ADN total. Las secuencias del genoma humano pueden clasificarse por su grado de repetición o por su significado funcional.

Tipos de secuencias de acuerdo con el grado de repetición

De acuerdo con los datos obtenidos primero por las curvas de renaturalización (curvas Cot, véase apartado anterior) y luego por los análisis de secuencias, se pueden clasificar las secuencias de bases en tres grandes grupos: de alto grado de repetición, de moderado grado de repetición y secuencias únicas (cuadro 4-1)

Tipos de secuencias según su función

Las secuencias del ADN humano se pueden clasificar en *codificantes* y *no codificantes*. A su vez, cada tipo puede dividirse; hay secuencias codificantes de elementos *propios* del organismo humano (ARN y proteínas propias) y elementos *accesorios* o ajenos al organismo; del mismo modo, las secuencias no codificantes pueden ser *estructurales, regulatorias* o *de función desconocida* (cuadro 4-2)

Cuadro 4-2. Clasificación funcional de las secuencias del ADN humano

Codificantes	De elementos propios	ARNr, ARNt, ARN_{5s}, proteínas
	De elementos accesorios	Retroposones Transposones
No codificantes	De función estructural	ADN satélites, centromérico y telomérico
	De función regulatoria	Promotores, estimuladores, etc.
	De función desconocida	ADN intergénico (mayoría)

La presencia de una vasta cantidad de secuencias de ADN que no codifican proteínas o ARN propios llevó al concepto inicial de un "ADN desperdicio" ("junk DNA") pero gradualmente se han ido encontrando funciones para algunas de estas secuencias, aparentemente inútiles; por ejemplo, el principal ADN satélite humano, el α o alfoide, participa en las estructuras centroméricas. La mayoría de las secuencias altamente repetidas tienen un papel estructural, y algunas de las secuencias moderadamente repetidas poseen un papel similar (las repeticiones teloméricas) Por otro lado, hay secuencias previas o posteriores a los genes, que son necesarias para su funcionamiento, puesto que estas secuencias son reconocidas por factores de transcripción (los promotores) o de modificación del ARN transcripto (como las señales de poliadenilación), además de secuencias que son reconocidas por otras proteínas intranucleares. Sin embargo, queda una gran cantidad de ADN que podría codificar para ARN o proteínas extrañas al organismo, o que se transcribe y se desconoce su función. Para este caso, se pensaba en la designación de *ADN egoísta*, puesto que este ADN es vehiculizado por el ADN humano replicado cada vez que se replica el genoma, pero no intervendría en el funcionamiento del organismo humano. Sin embargo, actualmente este concepto está abandonado, puesto que cada vez se encuentran más posibles funciones a los segmentos de ADN "no codificantes" de proteína. Estos conceptos se han modificado porque actualmente se sabe que el 80% del ADN se transcribe, y esos transcriptos primarios que en su gran mayoría no corresponden a genes de proteínas, son ahora considerados ARN largos no codificantes (de proteínas), pero con un sentido funcional, muchas veces de regulación génica, por lo cual se los considera "genes de ARN funcionales", del tipo del gen *XIST* (véase cap. 11) Por otra parte, hay numerosos ARN "cortos" (de menos de 100 nucleótidos) que intervienen en fenómenos de interferencia de ARN (véase cap. 7)

ADN de funciones estructurales: ADN satélites, centroméricos y teloméricos

Estas secuencias de ADN tienen localizaciones definidas: se encuentran en los centrómeros (cuadro 4-3) (ADN satélites) y en los telómeros (ADN telomérico) de los cromosomas humanos. Sus unidades de repetición son relativamente simples, y generalmente se encuentran las repeticiones seguidas unas de otras (en tándem) Las más simples son las del ADN *telomérico*, que son repeticiones exactas del hexanucleótido TTAGGG, dispuestas de 2.000 a 10.000 veces seguidas. Estas repeticiones terminan el extremo lineal de cada cromosoma humano, con una estructura particular, y son precedidas por una región subtelomérica con secuencias especiales (véase más adelante)

Los ADN satélites son de varios tipos (véase cuadro 4-3) pero el principal es el *ADN α o alfoide*, que se encuentra en los centrómeros de todos los cromosomas humanos, en bloques que ocupan varias megabases de ADN El nombre de "satélite" de estos ADN deriva de haberse identificado alguno de ellos originalmente como picos secundarios o "satélites" en los diagramas de centrifugación isopícnica (de acuerdo con su densidad) de ADN , en esta técnica, el ADN se separa

Cuadro 4-3. Tipos de ADN de las regiones centroméricas humanas[8]

Tipo	Unidad (pb)	Localización cromosómica
Alfoide	171	Todos los cromosomas
β	68	Acrocéntricos 13-15, 21-22; 9, 1 Y
–	48	Pericentromérica, #21-22, Y
Satélite 1	42	Mayoría de cromosomas; pericentromérica
Satélite 2-3	5	Mayoría de cromosomas, conservado
ADN disperso	Variable	Variable

por su densidad, y dado el alto grado de repetición del ADN satélite, es posible que su densidad no coincida con la densidad media de todo el ADN, sino que sea menor (si es rico en A + T) o mayor (si es rico en C + G), y por eso el satélite se separa como un pico secundario.

El ADN alfoide se encuentra sólo en los primates y en el ser humano; en otras especies hay otros tipos de ADN satélites centroméricos. El ADN alfoide consta de unidades de 171 pares de bases. La cantidad total de ADN alfoide es variable según cada cromosoma, y, además, las unidades de 171 pb no son todas iguales, sino que poseen variantes, originadas en la secuencia primitiva ("secuencias divergentes") Los grupos formados por repeticiones en tándem pueden ser más o menos numerosos y forman estructuras de "segundo orden" separadas por otro tipo de ADN Esto hace que cada ADN alfoide de cada cromosoma en particular sea diferenciable del resto, de tal forma que existen sondas específicas para el ADN alfoide de cada uno de los cromosomas humanos.

El ADN alfoide es el ADN satélite de mayor importancia actual, porque se sabe que contiene un "motivo" o secuencia especial de 17 pb que es reconocido por una proteína específica del centrómero, la CENP-B (véase más adelante)

ADN de secuencias accesorias: secuencias invasoras o "egoístas"

Un número considerable de secuencias del genoma humano tienen un origen o significación diferentes de las del propio organismo y están relacionadas con las actividades propias de los retrovirus; más específicamente, con la actividad de la transcriptasa inversa, enzima que es típica de los retrovirus y que sintetiza ADN a partir de ARN

Sin embargo, pocas de estas secuencias tienen la estructura exacta de un retrovirus, como el THE-1, la mayoría presenta sólo vestigios de secuencias retrovirales o de actividad de transcriptasa inversa. Estas secuencias se clasifican en *retroposones* y en *transposones*, según posean evidencia de movilidad actual (transposones) o sólo vestigios de una actividad similar y un origen a partir de ARN (retroposones)

Los retroposones comprenden varios tipos de secuencias: LINEs, SINEs y pseudogenes procesados.

Secuencias repetidas cortas y dispersas (SINEs): familia Alu

Este tipo de secuencia es típico de los primates y está relacionado con el patrón de bandeado G de los cromosomas. Su nombre proviene del inglés (*S*hort *I*nterspersed repeated sequenc*es*) y en la especie humana están representadas por la familia de secuencias *Alu*, llamada así porque presentan en sus extremos sitios de restricción para la enzima *Alu*I (extraída de *Arthrobacter luteus*, sitio 5' AGCT-3')

Alu es muy abundante; hay unas 500.000 copias de esta secuencia de 300 pb, pero están localizadas casi exclusivamente en las bandas R (o reversas), esto es, las bandas que aparecen claras en el bandeado G de los cromosomas huma-

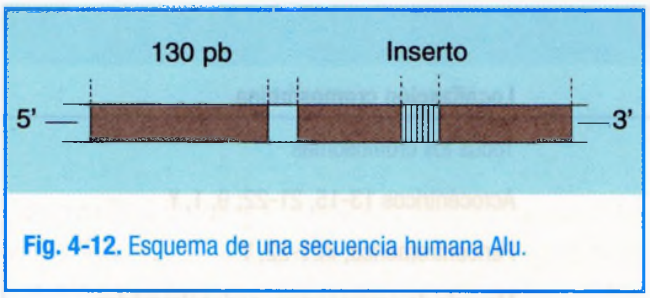


Fig. 4-12. Esquema de una secuencia humana Alu.

nos, es decir, que se encuentran en las regiones cromosómicas más ricas en genes activos; al corresponder a la composición de las bandas R, la secuencia *Alu* es rica en G + C. El total de secuencias *Alu* ocupa alrededor de 300 megabases, es decir, el 10% del genoma humano.

La secuencia *Alu* tiene una estructura especial, porque presenta una repetición directa de 130 pb y una secuencia insertada, además de un promotor para la ARN polimerasa III (fig. 4-12) La secuencia *Alu* parece originada a partir de un ARN 7SL, de 300 nucleótidos, que está relacionado con la síntesis de proteínas de membrana (codifica la parte de ARN para la partícula de reconocimiento de señal, PRS). Este ARN duplicado sería copiado por una transcriptasa inversa e insertado en el ADN, pero se desconoce el mecanismo real de su origen. Sin embargo, su gran frecuencia y su cercanía a muchos genes, considerando su posible movilidad, sugieren su importancia para la evolución humana.

Secuencias repetidas largas y dispersas: LINEs

Estas secuencias LINEs (*L*ong *In*terspersed repeated sequenc*es*) están representadas en el genoma humano por las secuencias llamadas *L1Hs* (de *L*argas, tipo 1, de *H*omo *s*apiens) que tienen 6,4 kb y se encuentran repetidas 10.000 veces. Están localizadas en las bandas G (positivas o coloreadas) y, por consiguiente, tienen una localización inversa a la de las *Alu*. Las LINEs humanas (como las de otros mamíferos, único taxón en que se encuentran) son retroposones, por haberse originado en secuencias de ARN que posteriormente se integraron al genoma por acción de una transcriptasa inversa. Este origen está evidenciado por la región terminal 3' de las L1Hs, que poseen una "cola" poli(A) (poliadenilada, como los ARNm) Algunas LINEs poseen estructura génica, ya que presentan marcos abiertos de lectura ("MAL", véase cap. 5) que aparentan codificar una transcriptasa inversa. Si bien la codificación de una transcriptasa inversa se encuentra en el genoma humano, su real transcripción y funcionamiento no eran evidenciables hasta 1991, cuando se demostró la transposición de un segmento L1 de un cromosoma 22 al gen del factor VIII de la coagulación en el cromosoma X de dos pacientes con hemofilia A.[9]

De esta manera, parece comprobada la posibilidad de activación de una transcriptasa inversa (ya sea de L1 o de los escasos retrotransposones humanos THE-1) Esta actividad, aunque sea sumamente infrecuente, podría explicar la acumulación de secuencias de tipo retroposón, tales como las *Alu* y los pseudogenes procesados (véase más adelante) La actividad infrecuente de esta transcriptasa puede obedecer no sólo a la frecuente distorsión por pérdida de sus secuencias delanteras (del lado 5'), sino también a la ausencia de una secuencia promotora. Sin embargo, hay cierto grado de transcripción de secuencias L1 en las células humanas, aunque estos ARN transcriptos son lábiles y no abandonan el núcleo. En términos generales, podría considerarse a las secuencias L1Hs como "restos fósiles" de retrovirus insertados en el genoma humano.

Pseudogenes y pseudogenes procesados

Los "pseudogenes" son genes incompletos y no funcionales, originados por una duplicación de un gen, cuya copia se torna no funcional por deleciones o inserciones que cambian el marco de lectura (véase cap. 5) u otras mutaciones que mutilan la estructura del gen, tal como la inserción de codones terminales. Esto puede ocurrir, ya que una copia de un gen existente, sin su promotor, no ejerce actividad ni produce beneficio a la especie (salvo en casos especiales) y, por consiguiente, queda sujeta a la presión de mutación que más o menos rápidamente empieza a intro-

ducir cambios en su secuencia, algunos de los cuales la tornan no funcional. Pseudogenes típicos se encuentran en las familias α y β de las globinas humanas.

Existe otro tipo diferente de los pseudogenes propiamente dichos, que son los *pseudogenes procesados* y que se hallan con mucho mayor frecuencia en el genoma humano. Estos pseudogenes procesados se originan por un mecanismo distinto: provienen de ARN mensajeros y son integrados al genoma por un mecanismo de retroposición, similar al usado por los retrovirus. Los pseudogenes procesados no tienen la estructura génica normal: presentan una región terminal (del lado 3') con una secuencia homogénea de 50 o más adeninas (poliadenilada = poli[A]), no presentan intrones (parecen haber sido "procesados" con eliminación de los intrones, como el ARNm) y, muy frecuentemente, se encuentran truncados en sus secuencias iniciales (del lado 5') Las dos primeras propiedades indican su origen en un ARNm; la tercera parece indicar una falla terminal de la transcriptasa inversa. En este sentido, los pseudogenes procesados se parecen a las secuencias LINEs (L1Hs), que también presentan con frecuencia el corte de sus secuencias iniciales. Hay numerosos pseudogenes procesados, entre otros, los de β-tubulina y los de inmunoglobulinas.

El mecanismo de transposición de los pseudogenes procesados requiere actividad de transcriptasa inversa (fig. 4-13)

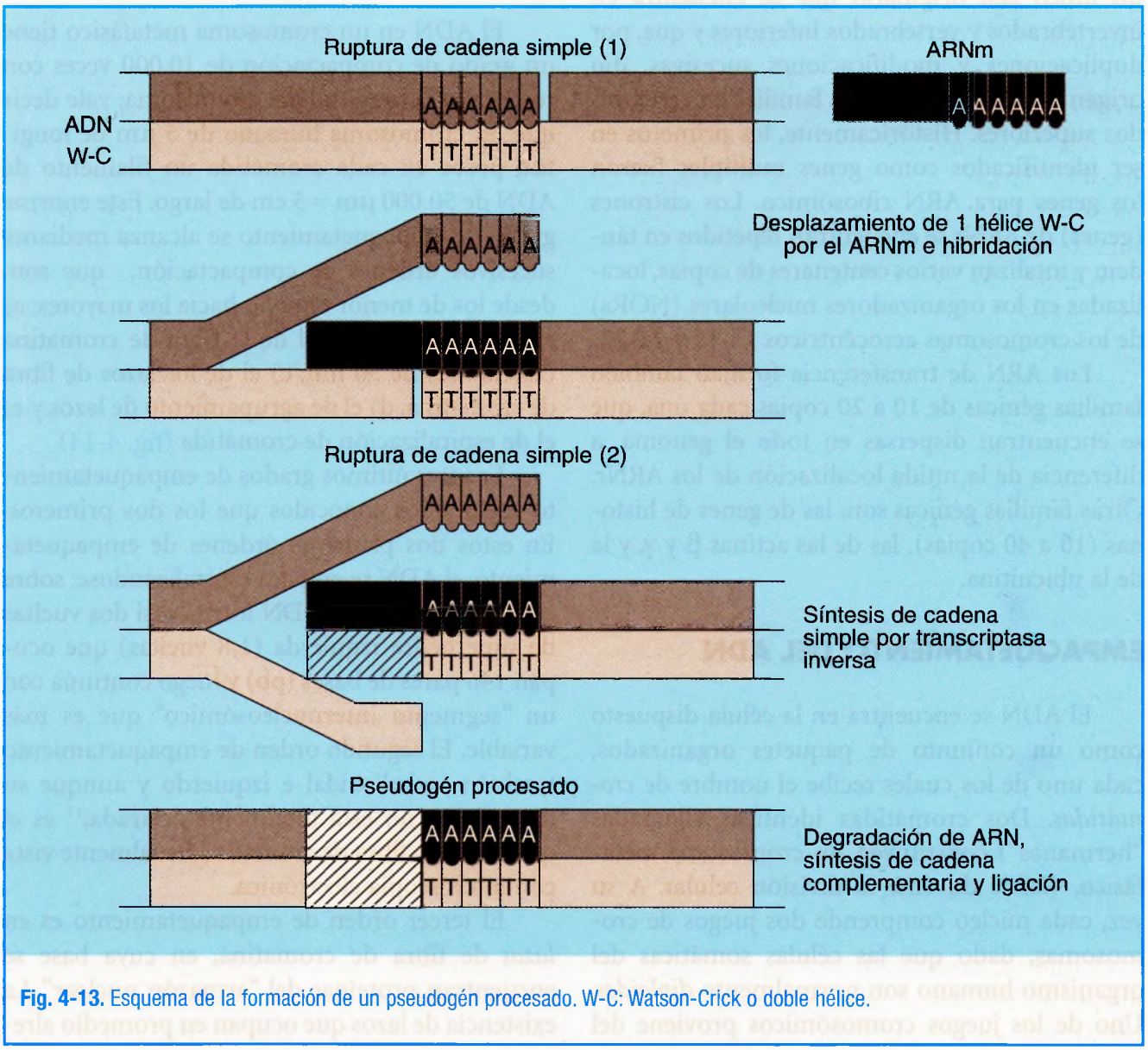


Fig. 4-13. Esquema de la formación de un pseudogén procesado. W-C: Watson-Crick o doble hélice.

Duplicación génica y familias génicas

La presencia de pseudogenes implica la duplicación de genes; esta última se ha constata do como una importante herramienta evolutiva en los eucariontes superiores, en especial en los vertebrados.[10] Un caso clásico de duplicación génica es el de los genes de las globinas (de la hemoglobina) La principal hemoglobina adulta está compuesta por cuatro polipéptidos de dos tipos, α y β, cuyos genes están en los cromosomas 16 y 11, respectivamente, pero *acompañados* de otros genes de globinas, incluidos algunos pseudogenes, de tal forma que hay dos "familias" génicas de globinas (las familias α y β) Evolutivamente, ambas familias descienden de un único gen originario que se encuentra en invertebrados y vertebrados inferiores y que, por duplicaciones y modificaciones sucesivas, dio origen a los genes de las dos familias en vertebrados superiores. Históricamente, los primeros en ser identificados como genes múltiples fueron los genes para ARN ribosómico. Los cistrones (genes) de ARNr se encuentran repetidos en tándem y totalizan varios centenares de copias, loca lizadas en los organizadores nucleolares (NORs) de los cromosomas acrocéntricos 13-15 y 21 22.

Los ARN de transferencia forman también familias génicas de 10 a 20 copias cada una, que se encuentran dispersas en todo el genoma, a diferencia de la nítida localización de los ARNr. Otras familias génicas son. las de genes de histonas (10 a 40 copias), las de las actinas β y γ, y la de la ubicuitina.

EMPAQUETAMIENTO DEL ADN

El ADN se encuentra en la célula dispuesto como un conjunto de paquetes organizados, cada uno de los cuales recibe el nombre de *cromátidas.* Dos cromátidas idénticas (llamadas "hermanas") constituyen un cromosoma meta fásico, visible durante la división celular. A su vez, cada núcleo comprende dos juegos de cromosomas, dado que las células somáticas del organismo humano son normalmente *diploides.* Uno de los juegos cromosómicos proviene del padre y el otro de la madre, de tal forma que el contenido de ambos juegos es diferente; los cromosomas de un juego son "homólogos" de los del otro juego. Cada par de cromosomas puede ser distinguido por su tamaño, sus características de forma y su patrón de bandas luego de un procedimiento de coloración para "bandeado" El conjunto típico de cromosomas conforma el "cariotipo"

Dentro de cualquier cromosoma, el ADN está compactado en varios órdenes sucesivos de empaquetamiento, de los cuales los mejores conocidos son los primeros: el nucleosómico y el de la fibra de cromatina de 30 nm de espesor.

Órdenes sucesivos del empaquetamiento del ADN

El ADN en un cromosoma metafásico tiene un grado de compactación de 10.000 veces con respecto a la longitud del cromosoma, vale decir que un cromosoma humano de 5 µm de longi tud posee en cada cromátida un filamento de ADN de 50.000 µm = 5 cm de largo. Este enorme grado de empaquetamiento se alcanza mediante sucesivos órdenes de compactación, que son, desde los de menor tamaño hacia los mayores: a) el nucleosómico, b) el de la fibra de cromatina (solenoide) de 30 nm, c) el de los lazos de fibra de cromatina, d) el de agrupamiento de lazos y e) el de espiralización de cromátida (fig. 4-14)

Los tres últimos grados de empaquetamien to son menos conocidos que los dos primeros. En estos dos primeros órdenes de empaquetamiento, el ADN se empaca espiralizándose: sobre cada nucleosoma, el ADN forma casi dos vueltas de superhélice izquierda (1,8 vueltas) que ocu pan 146 pares de bases (pb) y luego continúa con un "segmento internucleosómico" que es más variable. El segundo orden de empaquetamiento también es helicoidal e izquierdo y aunque su disposición no está totalmente aclarada,[11] es el que forma la fibra de cromatina usualmente vista con microscopia electrónica.

El tercer orden de empaquetamiento es en *lazos* de fibra de cromatina, en cuya base se encuentran proteínas del "armazón nuclear" La existencia de lazos que ocupan en promedio alre-

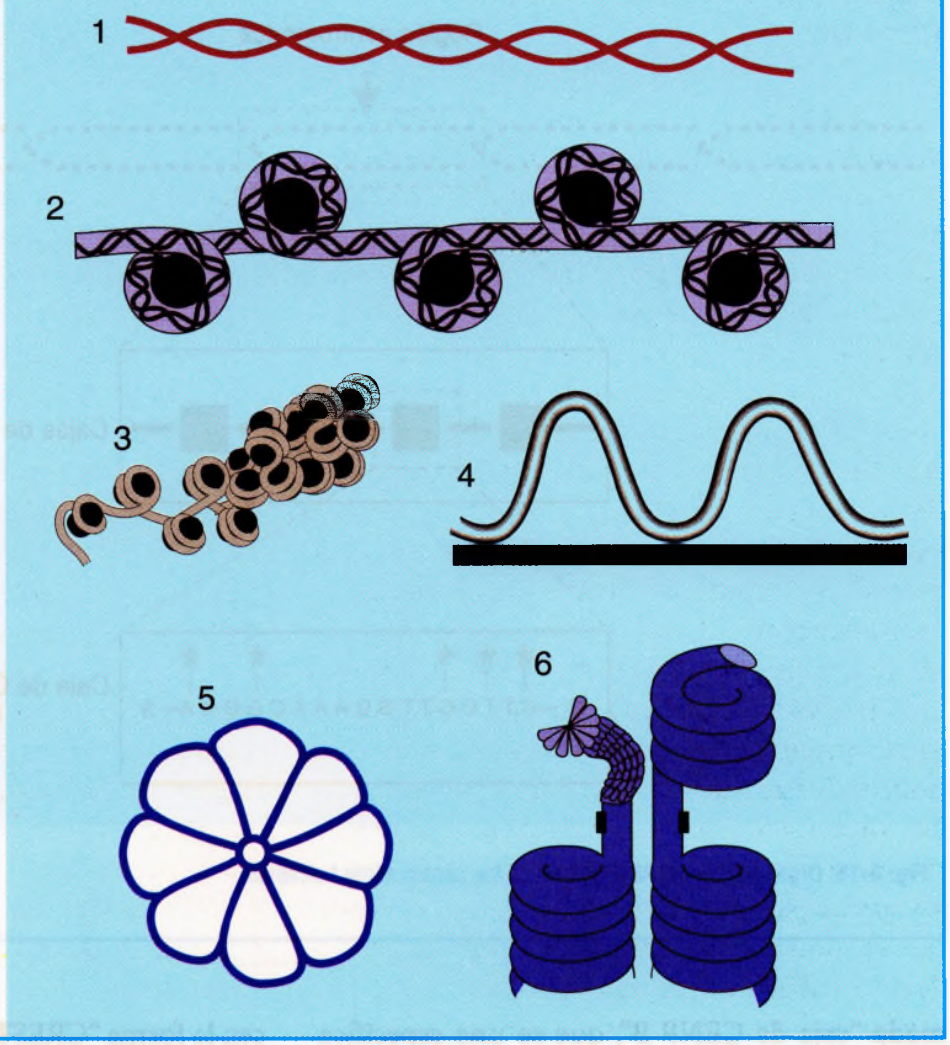


Fig. 4-14. Órdenes sucesivos de empaquetamiento del ADN hasta la cromátida del cromosoma metafásico. 1: ADN; 2: orden nucleosómico; 3: solenoide de 30 nm; 4: lazos de fibras cromatínicas; 5: agrupación de lazos; 6: enrollamiento de cromátidas y zona centromérica.

dedor de 60 kb está bien apoyada por varios tipos de evidencia, el cuarto orden, sin embargo, es poco conocido. Finalmente, la cromátida posee una cierta espiralización, visible con varias técnicas citológicas. Los empaquetamientos elementales en hileras de nucleosomas (aproximadamente un factor de 6 veces de empaquetamiento) y el de la fibra de cromatina de 30 nm (factor de empaquetamiento total de 40 veces) son descritos en textos de Biología Celular y sólo se mencionan brevemente aquí.

ELEMENTOS BÁSICOS DEL CROMOSOMA: CENTRÓMEROS, TELÓMEROS Y ORÍGENES DE REPLICACIÓN

En la década de 1980 se descubrió en la levadura común (eucarionte primitivo) que ciertas secuencias de ADN son fundamentales para la organización de cualquier cromosoma: son las secuencias centroméricas, las teloméricas y las que forman los orígenes de replicación del ADN Esta organización fundamental es compartida por los cromosomas humanos y, como se vio previamente, hay secuencias especiales de tipo "estructural" dedicadas a esos fines.

ADN centromérico

Tal como se mencionó previamente, el ADN alfoide es el principal componente de todos los centrómeros de los cromosomas humanos. El ADN alfoide se dispone en conjuntos de repeticiones en tándem de unidades elementales de 171 pb, que no son todas iguales (hay numerosas variantes) El componente mejor definido en cada unidad es la secuencia de 17 nucleótidos lla-

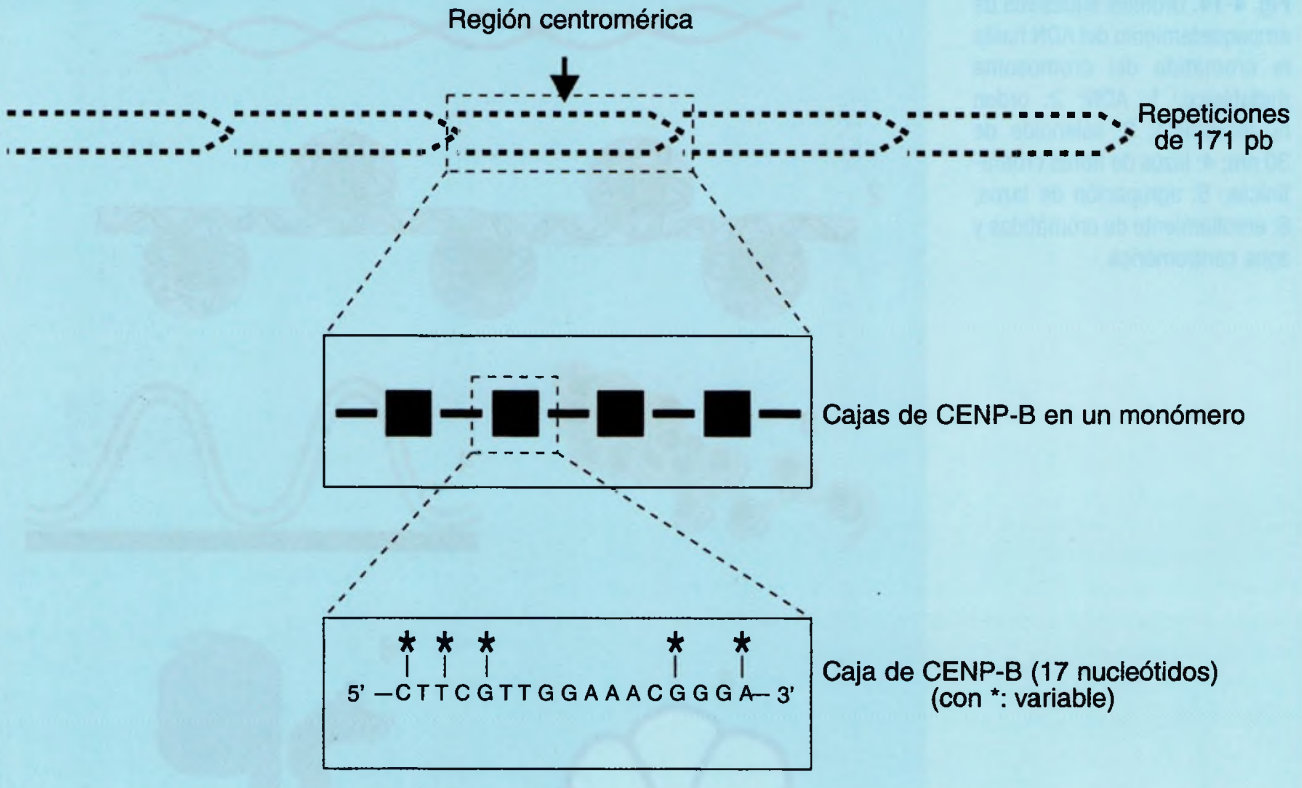


Fig. 4-15. Organización del ADN alfoide en los centrómeros humanos.

mada "caja de CENP-B", que se une específicamente a la proteína centromérica CENP-B (fig. 4-15).

Proteínas centroméricas

El ADN en la región centromérica está asociado con proteínas específicas. Estas proteínas han podido estudiarse gracias al descubrimiento de anticuerpos contra ellas en enfermos que padecen la forma "CREST" (de *c*alcinosis, fenómero de *R*aynaud, disfagia *e*sofágica, *e*sclerodactilia y *t*elangiectasia) de esclerodermia. Estos anticuerpos se fijan a la zona centromérica en cromosomas metafásicos, y en núcleos interfásicos dan un aspecto moteado. A partir de estos anticuerpos, se ha logrado aislar y purificar al menos seis proteínas centroméricas o "CENPs"[12] (cuadro 4-4).

La región centromérica, en general, comprende el centrómero propiamente dicho, o

Cuadro 4-4. Proteínas centroméricas

Nombre	Peso molecular (10^3 Da)	Localización	Características
CENP-A	17	Centrómero, general	Variante de histona H3
CENP-B	80	Región central	Se asocia al ADN alfoide por la "caja" de 7 pb
CENP-C	107	Placa interna del cinetocoro[13]	Presente sólo en cinetocoros activos
CENP-D	47	Cinetocoro	Regulador de condensación cromosómica
INCENPs	135, 155	Región medial	Asociación de cromátidas

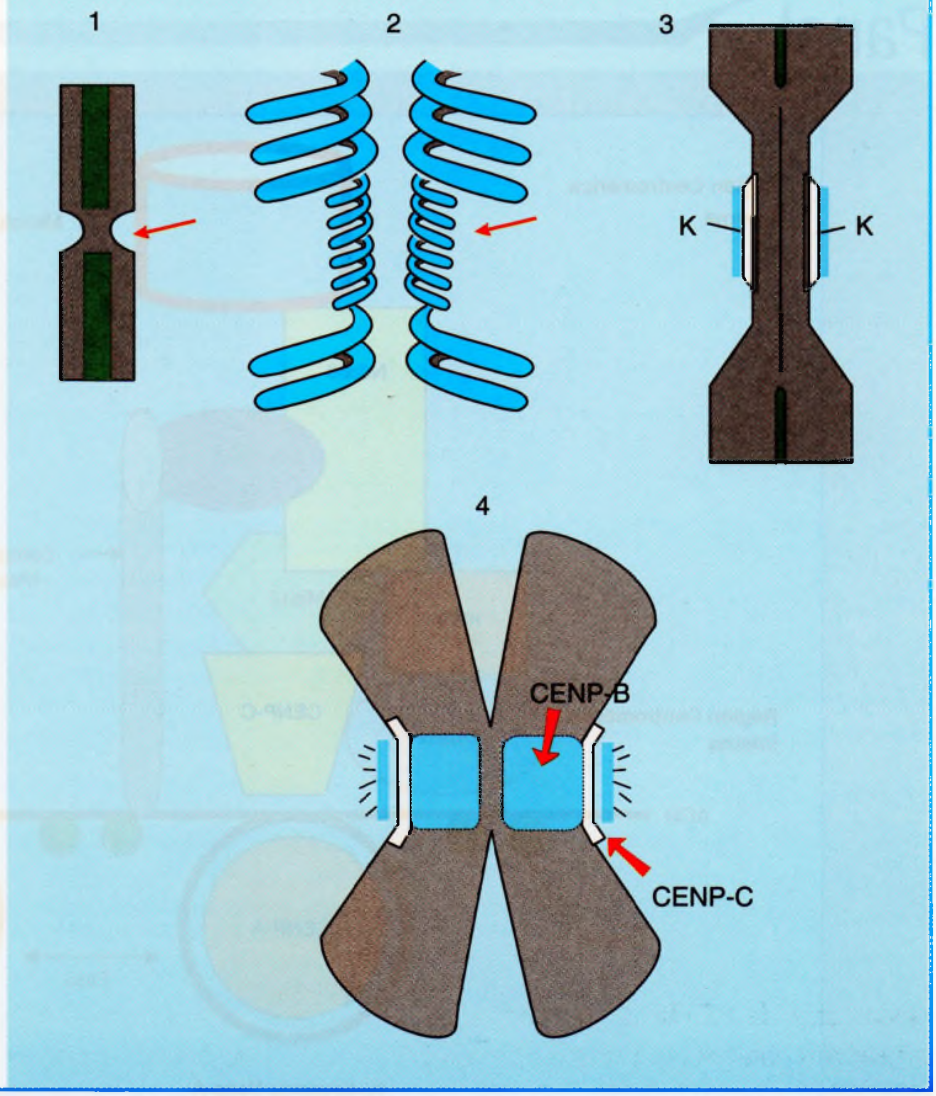


Fig. 4-16. Esquema de la región centromérica. 1 y 2: cromosoma y zona centromérica (flechas); 3: región cinetocórica (K); 4: proteínas del centrómero.

constricción primaria, que es una región estrechada de la cromatina y en la que están íntimamente asociadas las cromátidas hermanas, y los *cinetocoros* (uno en cada lado del centrómero en la metafase), que son elementos cupuliformes que se observan en la mitosis y en los cuales se insertan los microtúbulos. La estructura fina del cinetocoro es típicamente trilaminar, con su placa o lámina interna apoyada sobre la cromatina central del centrómero (fig. 4-16) El cinetocoro es esencialmente una estructura proteínica, en la cual se distingue ADN sólo en su placa interna.

En la región más periférica de los centrómeros se ha identificado una proteína con actividad ATPásica, la *dineína*, a la cual se le adjudica un papel funcional en el movimiento. También la *kinesina*, otra proteína relacionada con los microtúbulos, parece asociada a los centrómeros de ciertos organismos, y una proteína similar ha sido designada como CENP-E.

La estructura de los centrómeros humanos es compleja pero al menos tres componentes son esenciales para un centrómero funcional: una cantidad umbral de ADN alfoide, la proteína CENP-B que se asocia al anterior, y la CENP-C que es propia del cinetocoro funcional. Además, es obvio que los centrómeros humanos son poliméricos, formados por un número de unidades repetidas, posiblemente en relación con el número de microtúbulos insertados por cromosoma (una docena) y la necesidad absoluta de su funcionalidad para conservar el genoma. Actualmente el número de proteínas centroméricas conocidas se ha incrementado notablemente (panel 4-1)

Panel 4-1 Adelantos en el estudio de los centrómeros

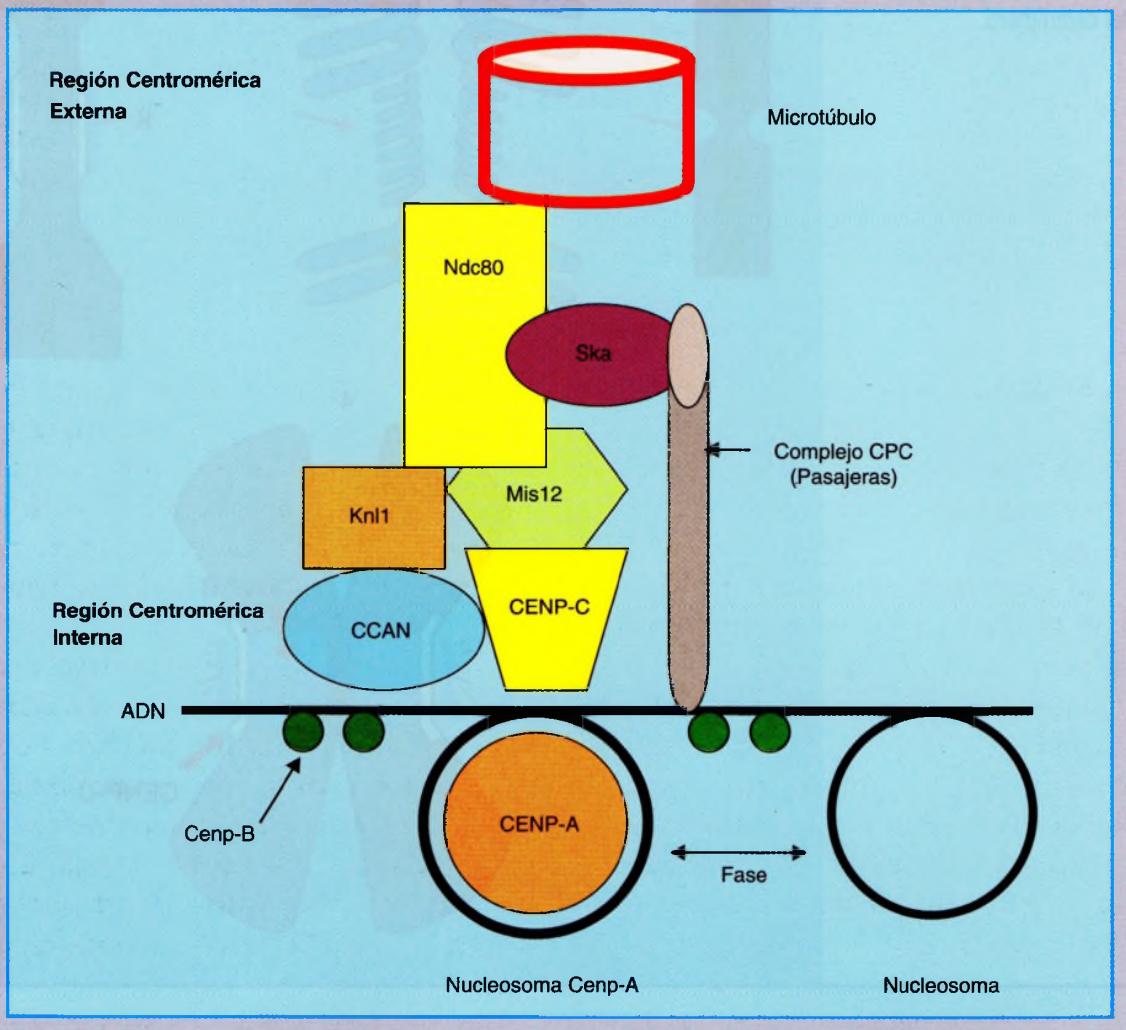


Fig. 1. Esquema de la ubicación de los complejos proteínicos de la región centromérica en vertebrados. En el ADN centromérico (línea y bucles negros) se ubican nucleosomas especiales que contienen CENP-A, espaciados ("en fase") por segmentos donde se ubica la CENP-B sobre las "cajas para CENP-B" de 17 pb. Por encima se establecen ordenadamente, desde adentro hacia afuera, siete complejos de proteínas, de los cuales los más periféricos (Ndc80, Ska y CPC) se relacionan con los microtúbulos del huso.[14]

El centrómero más simple es el de los cromosomas de la levadura, que se asocia a un único microtúbulo y ocupa solamente 118 pares de bases del ADN de la levadura. Sin embargo, ese centrómero "simple" contiene 60 proteínas.[14]

La enorme complejidad proteínica de los centrómeros humanos ha sido revelada desde el año 2000 y aún continúa en estudio.[14] En los centrómeros, la proteína CENP-A desempeña un papel básico (fig. 1).

La proteína fundamental del centrómero es la CENP-A, también llamada CENH3, porque es una variante de la histona nucleosomal H3. La CENP-A (o CENH3) es una histona de 18 kDa, que tiene 140 aas con un 51% de identidad con la histona regular H3, y con un dominio especial, llamado CATD (CenpA targeting domain), que es esencial para ubicar esta proteína sobre el ADN centromérico.[15] La CENP-A forma nucleosomas diferentes de los habituales, reemplazando a la histona H3. Estos nucleosomas centroméricos especiales son diferentes de los regulares, porque sus tetrámeros de histona son más compactos, más rígidos y más cortos que los regulares.[15] Además, los nucleosomas centroméricos están "espaciados" o "en fase" por la intercalación de la proteína CENP-B sobre las "cajas" correspondientes de ADN (véase fig. 1). Los nucleosomas con CENP-A pueden estar intercala-

dos con nucleosomas regulares (de H3 regular), pero aun así los nucleosomas "regulares" del centrómero tienen la cola de la H3 con una lisina-4 dimetilada, que la distingue de la heterocromatina no centromérica. Los nucleosomas con CENP-A son los que reclutan un primer complejo proteínico adyacente, el complejo constitutivo asociado en red (CCAN) que tiene al menos 14 subunidades proteicas[14] (CENP-H a W). La cromatina con nucleosomas con CENP-A más el complejo adyacente CCAN, forman la capa interna de los cinetocoros. A su vez, estos complejos proteínicos reclutan a los demás complejos, que son periféricos y algunos de los cuales se asocian al extremo positivo de los microtúbulos del huso mitótico.[15] Uno de los complejos (el CPC) contiene proteínas "pasajeras" del centrómero, que no son constitutivas, porque sólo se asocian al centrómero en ciertas etapas de la división, por ejemplo la quinasa Aurora B.

ADN telomérico humano

El ADN telomérico es el mejor conocido de los ADN estructurales del cromosoma, en parte por su simplicidad. El ADN telomérico está constituido por repeticiones en tándem del hexanucleótido TTAGGG, hasta formar conjuntos de longitud variable, de un promedio de 10 kb (1.600 monómeros),[16] aunque en células de placenta puede ser de 20 kb. La longitud de las repeticiones teloméricas ha cobrado reciente interés por su relación con el envejecimiento y el daño celular (véase más adelante) El extremo de la molécula de ADN en el telómero no es usual. una de las cadenas tiene una extensión mayor que la otra, en 12 nucleótidos, que forma un sobretecho sobre la más corta y que se vuelve sobre sí misma para formar una estructura diferente de la doble hélice de Watson-Crick (donde hay uniones de tipo Hoogsteen entre bases) La cadena sobreextendida es la *rica en guanina*, que termina en 3' (fig. 4-17)

La estructura especial del extremo telomérico es una consecuencia de su imposibilidad de replicarse por el mecanismo habitual de la horquilla de replicación, porque cuando tal horquilla llega a un extremo, la cadena molde (paterna) que termina en 3' no tiene una secuencia adicional para servir de apoyo al primero de ARN necesario para sintetizar los últimos nucleótidos

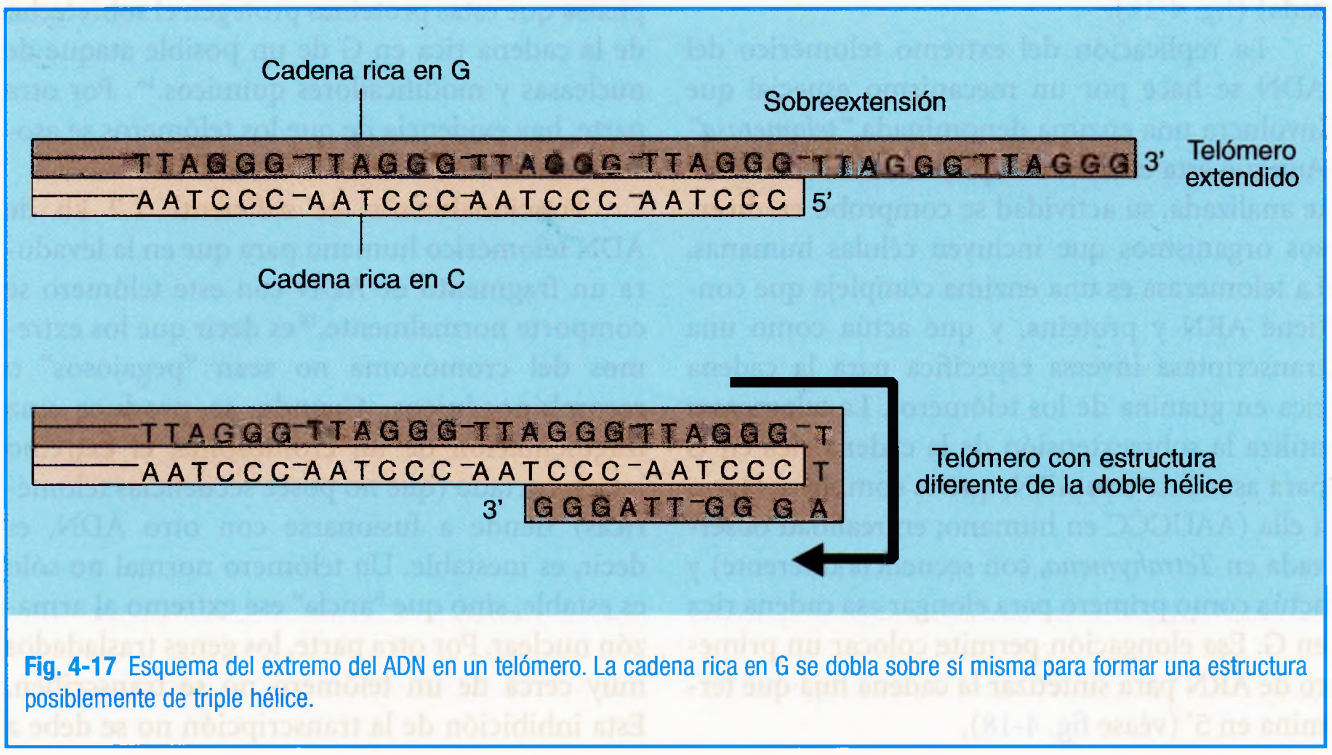


Fig. 4-17 Esquema del extremo del ADN en un telómero. La cadena rica en G se dobla sobre sí misma para formar una estructura posiblemente de triple hélice.

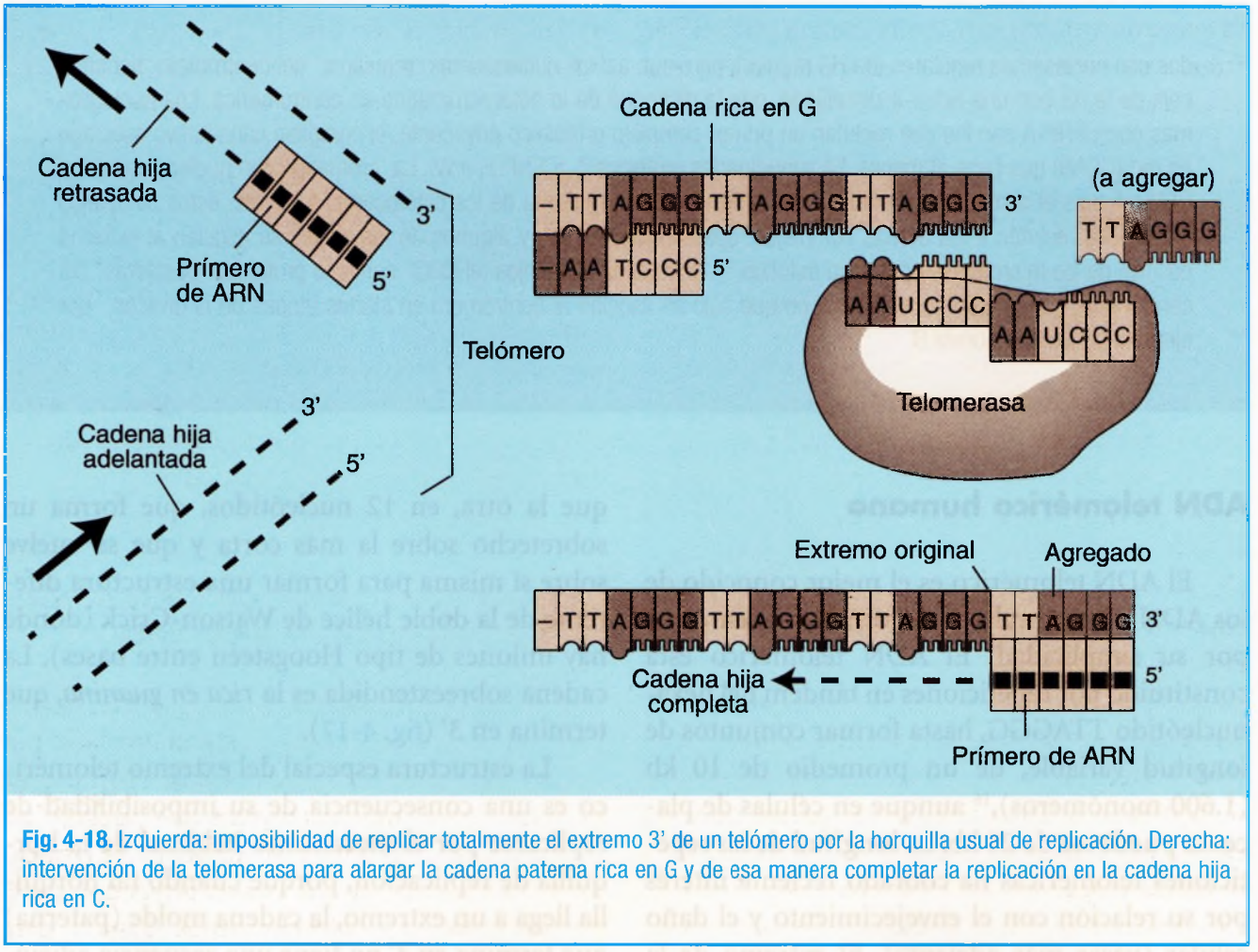


Fig. 4-18. Izquierda: imposibilidad de replicar totalmente el extremo 3' de un telómero por la horquilla usual de replicación. Derecha: intervención de la telomerasa para alargar la cadena paterna rica en G y de esa manera completar la replicación en la cadena hija rica en C.

de la cadena hija que termina en 5' y que debe avanzar en sentido 5' a 3' en esta cadena (la retrasada) (fig. 4-18)

La replicación del extremo telomérico del ADN se hace por un mecanismo especial que involucra una enzima denominada "*telomerasa*" Aunque esta enzima compleja no está totalmente analizada, su actividad se comprobó en diversos organismos que incluyen células humanas. La telomerasa es una enzima compleja que contiene ARN y proteína, y que actúa como una transcriptasa inversa específica para la cadena rica en guanina de los telómeros. La telomerasa utiliza la sobreextensión de la cadena rica en G para asociarla a su ARN, que es complementario a ella (AAUCCC en humano; en realidad observada en *Tetrahymena*, con secuencia diferente) y actúa como primero para elongar esa cadena rica en G Esa elongación permite colocar un primero de ARN para sintetizar la cadena hija que termina en 5' (véase fig. 4-18)

El ADN telomérico está asociado con proteínas que lo reconocen en forma específica, se piensa que estas proteínas protegen el sobretecho de la cadena rica en G de un posible ataque de nucleasas y modificadores químicos.[16] Por otra parte, hay evidencia de que los telómeros se asocian a la lámina nuclear interna.[17]

Funcionalmente, es suficiente 1,2 kb de ADN telomérico humano para que en la levadura un fragmento de ADN con este telómero se comporte normalmente,[18] es decir que los extremos del cromosoma no sean "pegajosos" o recombinogénicos. Cuando se produce una fragmentación de un cromosoma, el extremo recién cortado (que no posee secuencias teloméricas) tiende a fusionarse con otro ADN, es decir, es inestable. Un telómero normal no sólo es estable, sino que "ancla" ese extremo al armazón nuclear. Por otra parte, los genes trasladados muy cerca de un telómero no se transcriben. Esta inhibición de la transcripción no se debe a

la secuencia telomérica en sí misma, porque no inhibe la transcripción de un gen cuando se la transpone cerca del gen pero fuera de un extremo cromosómico.[16]

Telómeros y envejecimiento celular

Datos recientes han acumulado evidencias en organismos inferiores y en células humanas, acerca de una relación entre la longitud de los segmentos teloméricos y la presencia de signos de envejecimiento celular o senilidad celular.[19]

La longitud de las secuencias teloméricas está regulada por genes en la levadura y en los demás eucariontes ocurre lo mismo. En la levadura y otros organismos, cuando se altera la función de la telomerasa, las secuencias teloméricas disminuyen de longitud gradualmente con cada ciclo celular, y las células van mostrando alteraciones y signos de envejecimiento. Eventualmente, las secuencias teloméricas pueden desaparecer o atenuarse, a tal punto que los extremos cromosómicos se vuelven inestables y la célula empieza a mostrar crecientes frecuencias de anomalías cromosómicas. Por otra parte, se ha postulado que un telómero desprovisto de sus secuencias típicas es equiparable funcionalmente a una fractura de las dos cadenas del ADN, y dado que este tipo de fracturas es una señal que induce a la célula a interrumpir el ciclo celular, se ha propuesto que la pérdida de las secuencias teloméricas también induce esta detención del ciclo.

En las células humanas, se han comprobado diferencias significativas en la longitud de los telómeros en dos tipos de observaciones: 1) a mayor edad de la persona de la cual provienen las células, se observa dismmución de la longitud de los telómeros y 2) en los espermatozoides, los telómeros son más largos (15 kb en promedio) que en las células somáticas del mismo individuo. Estas observaciones han llevado a suponer que la *actividad de la telomerasa* está regulada de forma diferente en la línea germinal y en la somática. en esta última, la telomerasa estaría inhibida o reducida. Por otra parte, las células troncales o las células "inmortalizadas" de tumores poseen una actividad permanente de la telomerasa. Desde mediados de 1990 a 2000 se ha demostrado que linfocitos cultivados y provenientes de personas de diferentes edades poseen disminuciones características de las secuencias teloméricas, proporcionales a su edad, que en controles normales es de 41 +/– 7,7 pb por año.[20] Además, y en concordancia con el ya conocido envejecimiento prematuro de los pacientes afectados por el síndrome de Down, la dismi nución telomérica en los linfocitos de estos pacientes es más pronunciada que la de los controles (133 +/– 15 pb por año) (fig. 4-19), (paneles 4-2 , 4-3 y 4-4)

Orígenes de replicación y secuencias de replicación autónoma (SRA)

La replicación del ADN en las células humanas y de otros organismos está controlada por mecanismos muy precisos. Cada cromosoma humano posee muchos puntos que pueden ini ciar la replicación del ADN (orígenes de replicación *potenciales*), de los cuales alrededor de la décima parte son efectivamente usados para constituir los *replicones* o unidades de replicación del ADN En el genoma humano (46 cromosomas) hay aproximadamente 20.000 replicones con una longitud promedio de 150 kb de ADN cada uno, y con una velocidad de la horquilla de replicación de alrededor de 1 kb por minuto. Sin embargo, estos replicones no actúan si no es durante el momento preciso del ciclo celular (inicio de la fase S) y lo hacen coordinadamente, con un patrón específico para cada cromosoma y aun para cada región cromosómica (las bandas R se replican antes que las bandas G y éstas, antes que las bandas C) Por otra parte, esta exquisita regulación es propia de todos los organismos, aun los inferiores. Todo segmento de ADN estable de un organismo debe poseer un *origen de replicación* (tal como los muy elementales plásmidos, véase cap. 3), esto es, una secuencia especial del ADN que pueda ser reconocida por factores proteínicos que señalan el lugar para el comienzo de la replicación. Estas secuencias son llamadas *secuencias de replicación autónoma* (SRA – ARS, en inglés) Las SRA se

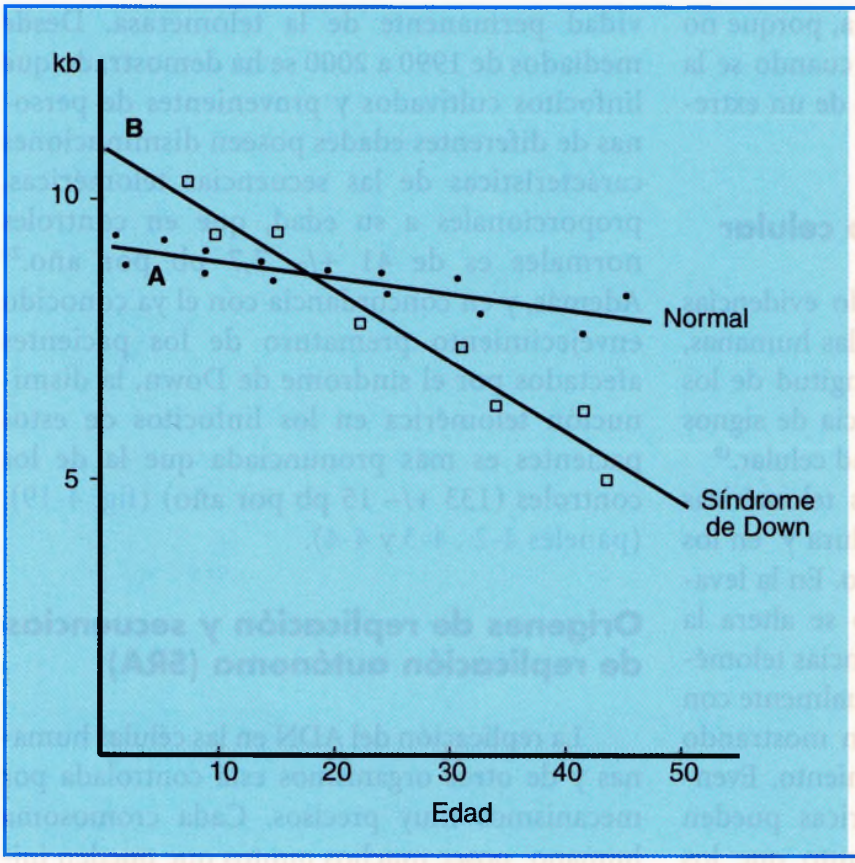


Fig. 4-19. Longitud decreciente de los telómeros de linfocitos de personas normales de edad creciente (**A**) y mayor tasa de disminución en linfocitos de pacientes con el síndrome de Down (**B**). Datos de Vaziri y col., 1993.

Panel 4-2. Función de la telomerasa y tumores

El acortamiento de las repeticiones teloméricas no es función del tiempo cronológico, sino del número de divisiones celulares sucesivas; esto quiere decir que en las células somáticas con actividad nula de telomerasa, los telómeros se acortan alrededor de 100 pb por cada mitosis, medido in vitro.[21] La telomerasa humana no es una proteína única, sino un complejo proteico, mayor de 300 kDa, una de cuyas unidades posee el ARN que sirve de molde y que tiene 451 nucleótidos.[22] El gen respectivo, *TERC*, es un gen de ARN, codificado en el cromosoma 3q26.2 (Gene cards, www.genecards.org/). Esta unidad con ARN unido tiene secuencias parcialmente homólogas con la transcriptasa inversa de los transposones. La telomerasa actúa en varios pasos: 1) apareamiento de la cadena rica en G del telómero con el ARN molde de la telomerasa, 2) adición de nucleótidos a la cadena del ADN y 3) translocación de la polimerasa hacia el extremo 3' del ADN.[20] En los telómeros humanos, el extremo colgante de 3' termina en TTAG-3', sin completar el hexanucleótido, y el número de nucleótidos que agrega la telomerasa está estrictamente controlado en las células "inmortalizadas" in vitro.[22] Se ha comprobado que una de las subunidades del complejo telomerasa es responsable del control del alargamiento telomérico, debido a que un número determinado de estas proteínas se asocian con el telómero y determinan, por su número, la capacidad del complejo telomerasa para alargar el telómero.[23] Éste es un control negativo, es decir que, si la subunidad está en número bajo, la telomerasa puede actuar; si el número es alto, deja de actuar. El control de la actividad de la telomerasa es de gran interés en oncología, puesto que en la mayoría de los tumores malignos (pero no en todos), las células tumorales expresan actividad de telomerasa, al contrario de lo que sucede con las células somáticas normales. La importancia fundamental de la telomerasa en la determinación del lapso de vida de las células normales, ha sido demostrada firmemente.[24] Las células somáticas normales pueden dividirse en un número finito de veces, que para la especie humana es de alrededor de 56 veces, luego de lo cual no pueden dividirse y muestran signos de "envejecimiento celular replicativo", como una relación alta

entre volumen citoplasmático y volumen nuclear, ausencia de síntesis de ADN y otras características. Este número finito de divisiones se conoce como "límite de Hayflick" (por el apellido del investigador que lo describió). Además se ha podido introducir ("transfectar") células humanas (epiteliales y fibroblastos) con vectores virales que contienen el gen de la telomerasa humana y un promotor para su transcripción.[24] Se hizo entonces la compararación entre las células que no recibieron la telomerasa (controles) y aquellas que sí la recibieron (transfectadas) y que expresaban (producían la proteína) la telomerasa (fig. 1). En los cultivos celulares paralelos de estos dos tipos de células, se advierte que las "controles" llegaban a dividirse sólo hasta aproximadamente el límite de Hayflick (alrededor de 56-60 divisiones, señalado en la figura por una flecha negra) y mostraban entonces signos de "envejecimiento replicativo", mientras que las transfectadas con telomerasa seguían dividiéndose más allá del límite de Hayflick, hasta 80 divisiones (los autores expresan que continúan dividiéndose y llegan a 100 divisiones, y parecen poseer un potencial de división indefinido).[24] Más aún, estas células transfectadas no tienen alteraciones del cariotipo ni otros signos de desregulación oncogénica, es decir que estas células, si bien han adquirido un potencial indefinido de división, no tienen las propiedades de las células tumorales, sino que son más bien parecidas a las células germinales, que también tienen activo el gen de la telomerasa. En la práctica, se ha conseguido extender el lapso de vida celular de las células humanas en cultivo, mediante este procedimiento, de indudable trascendencia.[24]

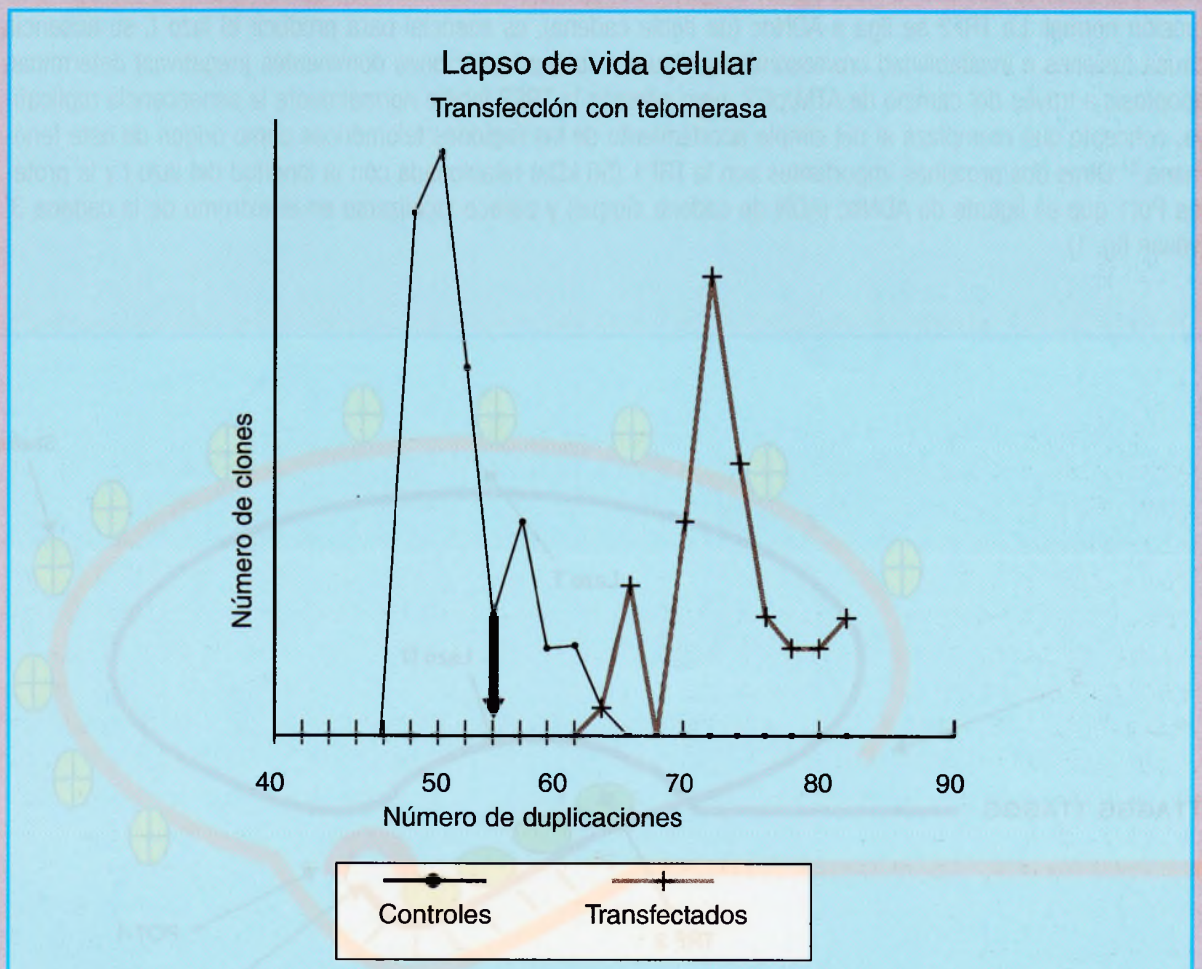


Fig. 1. Lapso de vida diferente en células normales (controles) y en células en las que se introdujo artificialmente (transfección) el gen de la telomerasa activo.

Panel

Panel 4-3. La estructura de los telómeros y sus proteínas

A partir de observaciones de microscopia electrónica, luego verificadas con otras técnicas, se ha demostrado que el ADN de los telómeros *humanos* y de otros vertebrados, tiene una forma de *lazo* terminal que ocupa unas 10 kb de ADN de doble hélice y que contiene exclusivamente repeticiones de hexámeros TTAGGG y su complementario [25,26] (fig. 1). Estos lazos se han llamado "lazos t" (por teloméricos), y ocupan la mayor parte del ADN telomérico propiamente dicho, y siempre su porción terminal. Dado que el ADN telomérico consta de dos cadenas diferentes en longitud, puesto que la cadena rica en G, que termina en 3' es más larga que la que termina en 5' (véase el texto principal, fig. 4-17), el extremo 3' es el que está al final del lazo y se inserta en la doble hélice, en el lugar correspondiente al inicio del lazo t, y esta cadena 3' desplaza a una de las dos cadenas de ese lugar, para acoplarse con su complementaria, es decir que en ese trecho, llamado "lazo D" (o de desplazamiento de ADN), está el segmento de cadena 3' terminal, protegido por estar insertado entre las dos cadenas, y además por la presencia de proteínas asociadas a ese segmento de "sobretecho" que termina en 3', y que de esa manera no puede ser confundido con un extremo roto de ADN ni sufrir fusiones con otras moléculas de ADN. También se han estudiado intensamente las proteínas que se ubican específicamente en los telómeros humanos, que son más de 22 (hay una base de datos de proteínas teloméricas en Internet: PtelDB). Entre estas proteínas se destaca la TRF2 (factor 2 ligante de repeticiones teloméricas), que es imprescindible para su función normal. La TRF2 se liga a ADNdc (de doble cadena), es esencial para producir el lazo t, su ausencia causa fusiones e inestabilidad cromosómica y algunas de sus mutaciones dominantes (negativas) determinan apoptosis a través del camino de ATM/p53, pero además la TRF2 inhibe normalmente la senescencia replicativa, concepto que reemplaza al del simple acortamiento de las regiones teloméricas como origen de este fenómeno.[27] Otras dos proteínas importantes son la TRF1 (56 kDa) relacionada con la longitud del lazo t y la proteína Pot1 que es ligante de ADNsc (ADN de cadena simple) y parece localizarse en el extremo de la cadena 3' (véase fig. 1).

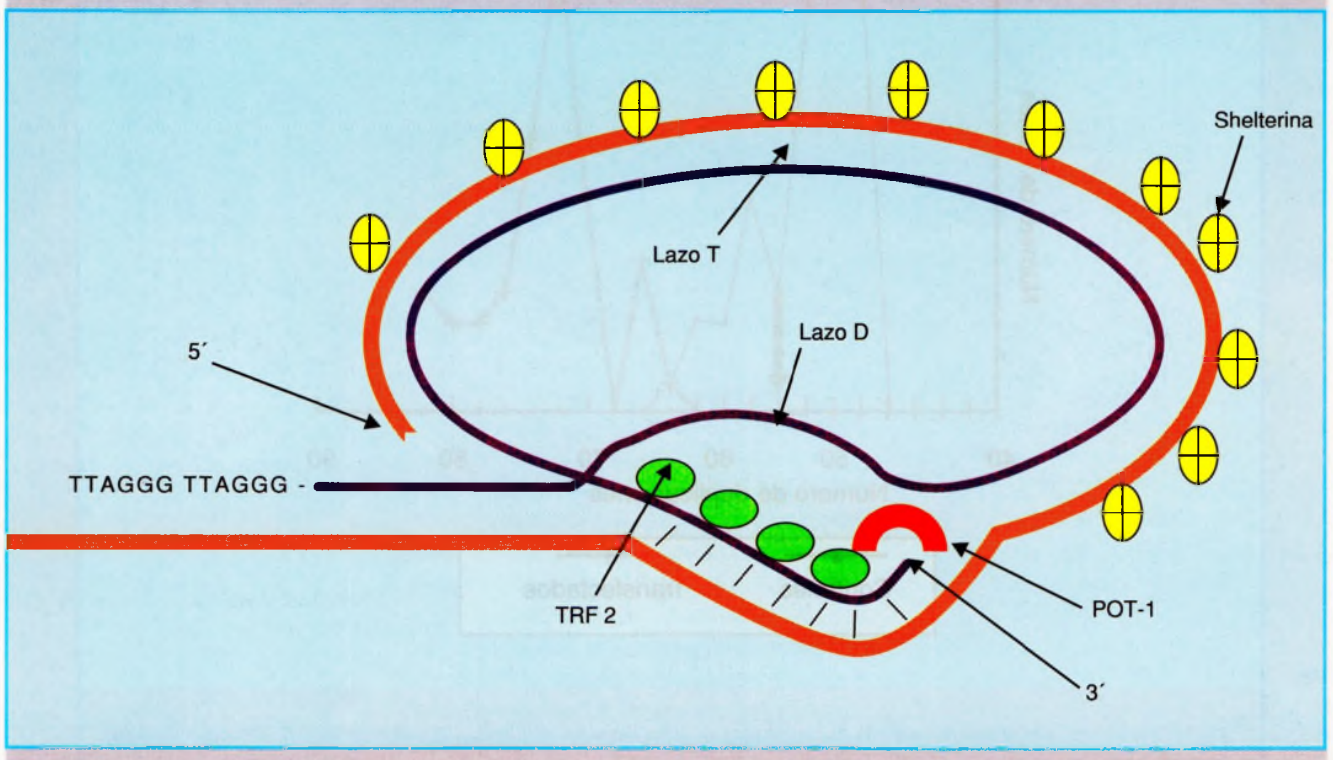


Fig. 1. Esquema de los Lazos T y D de los telómeros con la ubicación de algunas proteínas. En azul, cadena que termina en 3'; en rojo, cadena que termina en 5'. Shelterina: nombre del complejo de proteínas protectoras de la región telomérica.

Panel

Panel 4-4. Componentes de la telomerasa. Disquerina y disqueratosis congénita

El gran interés concitado por los telómeros entre biólogos, médicos, oncólogos y gerontólogos ha llevado a un incremento acelerado de estos estudios. Actualmente se tiene un conocimiento mayor de la telomerasa y de las proteínas teloméricas, y se ha iniciado un campo de estudio nuevo: las enfermedades por anomalías teloméricas, de las cuales la primera ha sido la disqueratosis congénita.[28] La estructura actualmente conocida de la compleja telomerasa (holoenzima) comprende tres elementos básicos y otros accesorios: la proteína TERT (de *Te*lomere *R*everse *T*ranscriptase) es similar a una transcriptasa inversa; tiene 1132 aa y contiene tres regiones: la amino terminal, la intermedia con "motivos" de transcriptasa inversa y la C-terminal. Esta proteína TERT tiene la actividad catalítica para sintetizar el ARN de las repeticiones de la cadena que termina en 5'. El segundo componente básico es el ARN, *TERC* (de *Te*lomere *R*NA *C*omponent). El ARN *TERC*, de 451 nucleótidos, tiene forma de trébol con tres brazos y 7 regiones conservadas, de CR1 a CR7, de las cuales la CR1 funciona como molde o templado para la síntesis de las repeticiones. Además tiene una "caja" H/ACA, para unirse a la proteína disquerina, y una "caja" CAB para unirse a la proteína secundaria TCAB1. El tercer elementoi básico es la proteína disquerina (DYSKERIN), de 57 kDa, que se asocia al ARN y está codificada por el gen DKC1 en el cromosoma X, banda Xq28. La disquerina es esencial para el ensamblamiento de la holoenzima y para la estabilidad del ARN TERC. A su vez, la disquerina posee tres proteínas accesorias asociadas (fig. 1).[29,30]

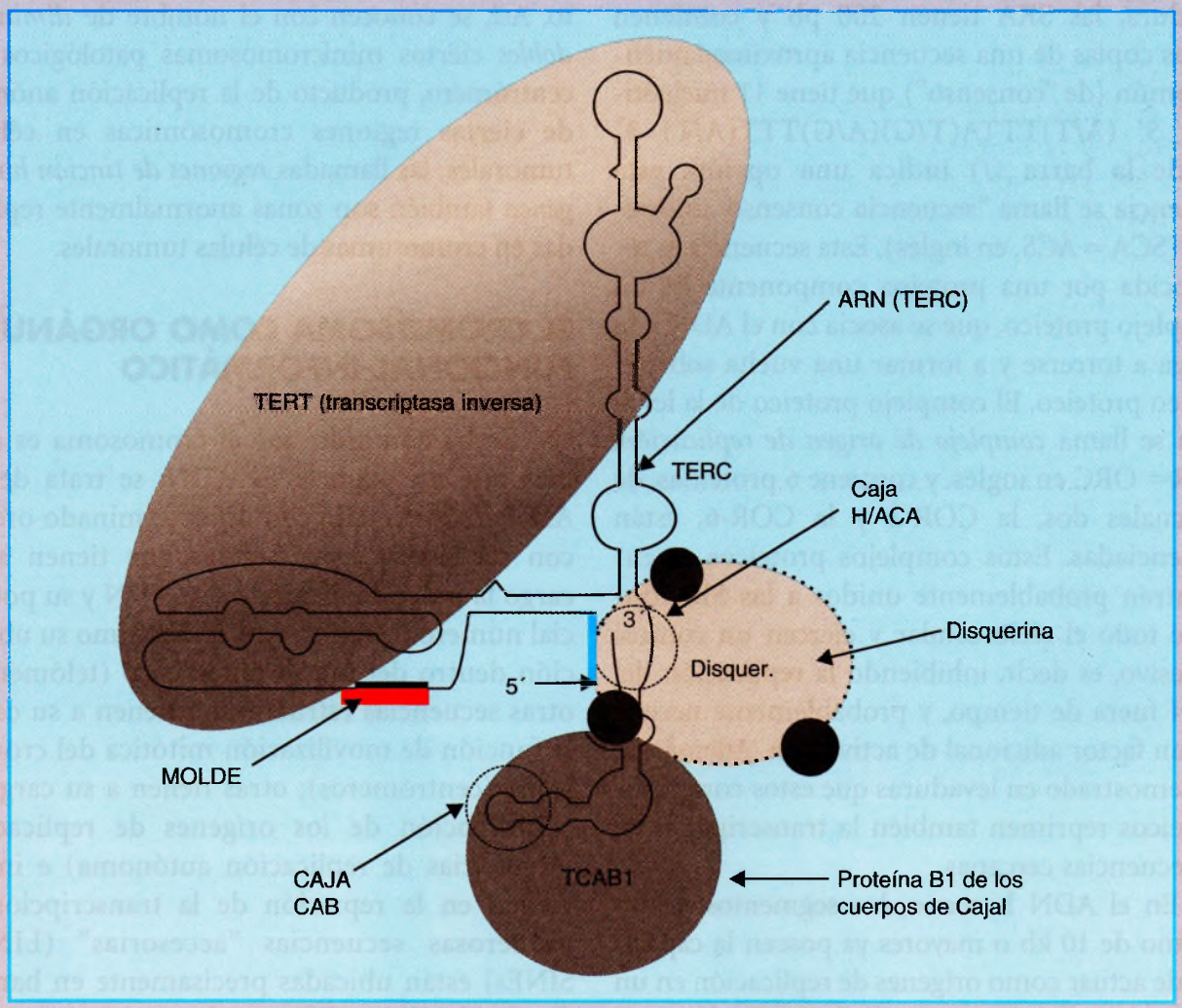


Fig. 1. Esquema de la estructura de la holoenzima telomerasa de los vertebrados. La proteína TERT es la que tiene actividad de transcriptasa inversa. El ARN con forma de trébol (TERC) es el componente de ARN de la holoenzima y posee el molde o templado para las repeticiones teloméricas en el segmento rojo. La disquerina es una proteína crítica para el ensamblado de todo el conjunto. La proteína TCAB1 es necesaria para ubicar la holoenzima en los cuerpos de Cajal (cuerpos intranucleares de síntesis y procesamiento de ARN).[29]

A lo largo de todo el lazo T (telomérico) se han discriminado actualmente un conjunto de seis proteínas, cuya función es la protección de todo ese sector para no ser confundido con segmentos anormales (rupturas de una o dos cadenas) del ADN. El conjunto recibe el nombre de SHELTERINA (del inglés shelter= refugio).[31] La SHELTERINA comprende las proteínas ya conocidas (véase texto principal) TRF1 y TRF2, la POT1(*P*rotection *o*f *T*elomeres 1), la TPP1, la RAP1 y la que sirve de eje al conjunto, la TIN2 (*T*elomere *I*nteracting *N*uclear Factor *2*). Algunas de estas proteinas tienen afinidad por las repeticiones teloméricas (TRF1, TRF2 y POT1) y otras proteínas interactúan con proteínas nucleares. Todas ellas, en conjunto, son necesarias para la manutención de los telómeros.

Finalmente, se han descubierto enfermedades humanas en las que están alterados o mutados los genes que codifican proteínas teloméricas. La disqueratosis congénita es una enfermedad poco frecuente caracterizada por defectos en la piel (defectos de uñas, pigmentación anormal de la piel), anormalidad de la mucosa bucal y que evoluciona a una anemia aplástica fatal en la segunda década de la vida. El gen de la disquerina (DKC1) se encuentra mutado y los telómeros en los pacientes son anormalmente cortos (Kirwan y Dokal, 2009).

han analizado más en la levadura, donde se han realizado importantes descubrimientos.[32] En la levadura, las SRA tienen 200 pb y contienen varias copias de una secuencia aproximadamente común (de "consenso") que tiene 11 nucleótidos: 5' (A/T)TTTA(T/G)(A/G)TTT(A/T) 3', donde la barra (/) indica una opción, esta secuencia se llama "secuencia consenso autónoma" (SCA – ACS, en inglés) Esta secuencia es reconocida por una proteína componente de un complejo proteico, que se asocia con el ADN y lo obliga a torcerse y a formar una vuelta sobre el núcleo proteico. El complejo proteico de la levadura se llama *complejo de origen de replicación*, COR = ORC en inglés, y contiene 6 proteínas, de las cuales dos, la COR-2 y la COR-6, están secuenciadas. Estos complejos proteicos se encuentran probablemente unidos a las SRA durante todo el ciclo celular y ejercen un control represivo, es decir, inhibiendo la replicación del ADN fuera de tiempo, y probablemente necesitan un factor adicional de activación. Además, se ha demostrado en levaduras que estos complejos proteicos reprimen también la transcripción de las secuencias cercanas.

En el ADN humano, los segmentos de un tamaño de 10 kb o mayores ya poseen la capacidad de actuar como orígenes de replicación en un sistema en tubo de ensayo, es decir, que hay más de 10 veces secuencias con potencialidad de origen de replicación que las efectivamente usadas; y es muy probable que existan complejos de proteínas del tipo de los COR, que en ciertas circunstancias patológicas pueden alterar su funcionamiento. Así, se conocen con el nombre de *diminutos dobles* ciertos minicromosomas patológicos sin centrómero, producto de la replicación anómala de ciertas regiones cromosómicas en células tumorales; las llamadas *regiones de tinción homogénea* también son zonas anormalmente replicadas en cromosomas de células tumorales.

EL CROMOSOMA COMO ORGÁNULO FUNCIONAL-INFORMÁTICO

Se ha admitido que el cromosoma es algo más que un paquete de ADN se trata de un ADN empaquetado con un determinado orden, con secuencias estructurales que tienen a su cargo la individualidad de este ADN y su potencial número de replicaciones, así como su ubicación dentro del núcleo interfásico (telómeros), otras secuencias estructurales tienen a su cargo la función de movilización mitótica del cromosoma (centrómeros), otras tienen a su cargo la coordinación de los orígenes de replicación (secuencias de replicación autónoma) e intervienen en la represión de la transcripción, y numerosas secuencias "accesorias" (LINEs, SINEs) están ubicadas precisamente en bandas G o R. El ADN codificante de proteínas está dispuesto casi siempre en unidades modulares o "exones", separadas de intrones que en sus extremos codifican señales de procesamiento de ARN

La disposición espacial de los genes no es al azar, puesto que deben encontrarse "hacia abajo" (en dirección hacia 3') de su promotor y deben ser seguidos por otras señales. Es decir que el cromosoma no sólo posee información para la síntesis bioquímica de las proteínas, sino también información esencial para su propia estabilidad y replicación, para su ordenamiento mitótico e interfásico y para el acceso a su propia información (véase cap. 5)

RESUMEN

El ADN es el principal material de depósito de la información biológica y es el material genético elemental. En las células humanas se encuentra como moléculas de longitud gigantesca (varios cm), empaquetadas muy ordenadamente bajo la forma de cada una de las dos cromátidas hermanas de un cromosoma metafásico. La información genética se halla en las secuencias de sus bases a lo largo de la hélice doble derecha que forma esta cromátida o molécula de ADN. Ambas hélices son recíprocamente complementarias (contienen la misma información), su polaridad es opuesta y están unidas sólo por puentes de hidrógeno (individualmente lábiles). Las dos hélices pueden separarse en el proceso llamado "desnaturalización" del ADN, que se caracteriza por su "temperatura de fusión" (T_m), y pueden volver a asociarse por el proceso de "renaturalización" o de "hibridación". Estas propiedades permiten la transmisión biológica de la información y también posibilitan las numerosas técnicas de identificación de secuencias del ADN con sondas. La doble hélice tiene un diámetro submicroscópico de 2,3 nm y puede adoptar formas espaciales extraordinarias: torcerse, superespiralizarse, formar cruces, adoptar la configuración "Z" en ciertas regiones y formar hélices triples en otras. El ADN humano posee gran cantidad de secuencias repetidas, que pueden ser de alto (ADN satélites) o de moderado grado de repetición (retroposones, SINEs=Alu, LINEs, pseudogenes y otras). En los centrómeros humanos, se hallan principalmente el ADN alfoide y las proteínas centroméricas (CENP). En los telómeros se hallan las repeticiones del hexanucleótido TTAGGG (cuyo número disminuye con la edad), proteínas especiales y actividad de telomerasa. Los orígenes de replicación son muy abundantes (20.000) y se hallan especialmente en las bandas R. Cada cromosoma es un orgánulo complejo con la función de depósito informático y, además, con funciones relacionadas con su propia estabilidad, replicación y evolución.

REFERENCIAS

1 Dickerson RE. The DNA helix and how it is read. Sci American 1983; 249:86-102.
2. Solari AJ. Electron microscopy of DNA in sea urchin cells. J Ultrastructure Res 1967· 17:421-438.
3. Coggins LW. Denaturation and hybridization of nucleic acids. En: Electron Microscopy in Molecular Biology, Oxford: Ed. J. Sommerville and U. Scheer, IRL Press, 1987 pp. 31-60.
4. Bauer WR, Crick FH, White JH. ADN superenrollado. Investigación y Ciencia 1980; Nº 48:78-89.
5. Bauer WR. Structure and reactions of closed duplex DNA. Ann Rev Biophys Bioengineer 1978; 7:287-313.
6. Van Holde K, Zlatanova J. Unusual DNA structures, chromatin and transcription. BioEssays 1994; 16: 59-68.
7 Wetmur JG, Davidson N. Kinetics of renaturation of DNA. J Mol Biol 1968; 31:349-370.
8. Tyler-Smith C, Willard HF Mammalian chromosome structure. Curr Opinion Genetics & Develop 1993; 3:390-397
9. Dombriski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, Scott AF Kazazian HH. Isolation of an active human transposable element. Science 1991 254:1805-1808.
10. Ohta T. Multigene and supergene families. Oxford Surveys in Evolutionary Biology (Harvey PH, and Partridge L, eds.). Oxford University Press, Oxford, 1988; 5:41-65.

11 Smith MF Athey BD, Williams SP Langmore JP Radial density distribution of chromatin: evidence that chromatin fibers have solid centers. J Cell Biol 1990; 110:245-254.
12. Willard HF Centromeres of mammaiian chromosomes. Trends in Genet 1990; 6:410-416.
13. Saitoh H, Tomkiel J, Cooke CA, Ratrie H, Maurer M, Rothfield NF, Earnshaw WC. CENPC, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochoreplate. Cell 1992; 70:115-125.
14. Santaguida S, Musacchio A. The life and miracles of kinetochores. EMBO J 2009, 28:2511-2531
15. Valdivia MM, Hamdouch K, Ortiz M, Astola A. CENPA a genetic marker for centromere activity and human diseases. Curr Genomics 2009,10:326-335.
16. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. Nature 1991 350:569-573.
17 de Lange T. Human telomeres are attached to the nuclear matrix. EMBO J 1992; 11:717-724.
18. Brown WR, Dobson MJ, MacKinnon P Telomere cloning and mammaiian chromosome analysis. J Cell Sci 1990; 95:521 526.
19. Broccoli D, Cooke H. Aging, healing and the metabolism of telomeres. Am J Hum Genet 1993; 52:657-660.
20. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. Am J Hum Genet 1993; 52:661-667
21 Chiu CP Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. Proc Soc Exp Biol Med 1997· 214:99-106.
22. Morin GB. The structure and properties of mammaiian telomerase and their potential impact on human disease. Sem Cell & Devel Biology 1996; 7:5-13.
23. Marcand S, Gilson E, Shore D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. Science 1997· 275:986-990.
24. Bodnar AG, Ouellette M, Froikis M, Holt SE, Chiu CP Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichsteiner S, Wright WE. Extension of llfe-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science 1998, 279:349-352.
25. Greider CW. Telomeres do D-loop-T-loop. Cell 1999; 97:419-422.
26. De Lange T. Telomere capping-One strand fits all. Science 2001 292:1075-1076.
27 Kariseder J, Smogorzewska A, de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science 2002; 295: 2446-2449.
28. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. N Engl J Med 2009; 361:2353-2365.
29. Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, et al. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. Science 2009; 323:644-648.
30. Artandi SE, DelPinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. Carcinogenesis 2010; 31:9-18.
31 De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Develop 2005;19:2100-2110.
32. Bell SP Kobayashi R, Stillman B. Yeast origin recognition complex functions In transcription silencing and DNA replication. Science 1993; 262:1844-1949.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Lewin B. Genes IX. Jones and Bartiett, Sudbury, MA, 9th ed, 2008.

Mickios DA, Freyer GA. DNA Science. A first course in recombinant DNA technology. New York: Coid Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

Kirwan M, Dokal I. Dyskeratosis congenita, stem cells and telomeres. Biochim Biophys Acta 2009;1792 (4):371-379.

Bloom K, Joglekar A. Towards building a chromosome segregation machine. Nature 2010;463:446-456.

Dalal Y, Furuyama Y, Vermaak D, Henikoff S. Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucieosomes. Proc Nati Acad Sci USA 2007·104(41):15974-15981 Welburn JP Cheeseman IM. Toward a molecular structure of the eukaryotic kinetocore. Dev Cell 2008;15:645-655.

Capítulo 5

Información genética

Información. Códigos. Codones. Definiciones de gen.
El proyecto ENCODE y los cambios en el concepto de gen. Estructura del gen.
Secuenciación del ADN. Mapas genéticos. Transcripción de la información.
Procesamiento y empalme. ARN no codificantes de proteínas

Introducción: información genética

La información genética, es decir, la información que se replica con cada célula y es usada por ella para su funcionamiento, está depositada en el ADN Este largo polímero, que puede alcanzar 7 cm de longitud en el cromosoma # 1 humano, y sólo 2,3 nm de espesor, es relativamente inerte en el metabolismo celular, y la gran cantidad de energía gastada en su síntesis y conservación se justifica por su papel de guía, o plano, de la mayor parte de la información genética transcriptible de la célula (una parte minoritaria de información génica se halla en el ADN mitocondrial) La información genética depositada en el ADN es transferida al ARN en la *transcripción*: síntesis de ARN sobre un molde de ADN, y luego esta información es usada en el proceso de *traducción*: síntesis de proteína codificada en un ARN mensajero (ARNm) (fig. 5-1)

Esta información genética transcriptible se define como la información que codifica cuáles proteínas (dentro de muchísimas posibles) pueden sintetizar una célula y las células descendientes de ella, es decir que esta información es *hereditaria* y, por medio de la fabricación de proteínas, determina indirectamente la forma, el tamaño y la función de estas células. Lo mismo puede decirse de los organismos multicelulares, que se originan de un cigoto que posee toda la información genética. Dado que las células –y los organismos– fabrican sus constituyentes mediante sus propias organelas, las *instrucciones* para esta fabricación –ordenada, armónica y propia de cada célula– deben estar contenidas también en ella, en su ADN Debe observarse que la célula funciona químicamente, es decir que el funcionamiento celular se basa en reacciones químicas. Pero estas reacciones ocurren ordenadamente en el espacio y en el tiempo, determinando finalmente las características físicas, como tamaño, forma y contenido de las células. Por consiguiente, hay varias categorías de información necesarias para la fabricación de los elementos celulares: a) qué tipo de reacción química se debe realizar; b) en qué medida o cantidad, c) en qué momento se ha de realizar; d) en qué lugar del espacio ha de tener lugar. A diferencia de los virus, que son esencialmente paquetes de información del tipo a), en las células existen todas estas categorías de instrucciones o información, y algunas, como las de tipo d), son informaciones estructurales, no codificadas directamente por genes: por ejemplo, la estructura molecular de las membranas o la posición espacial de las

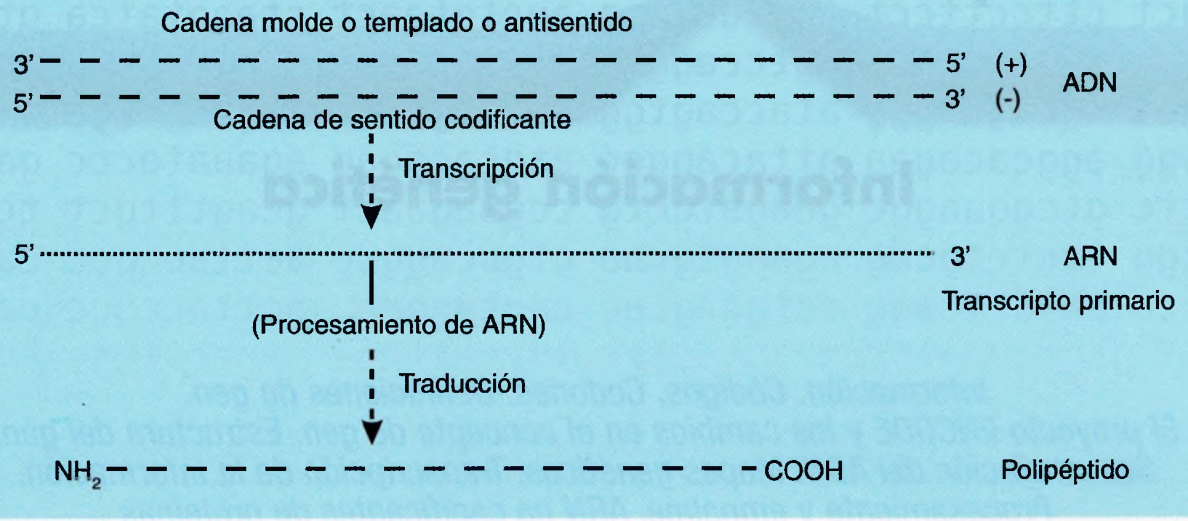


Fig. 5-1 Esquema de la transferencia usual de información génica. Ambas cadenas son usadas como molde, en diferentes segmentos del ADN, por lo cual es importante determinar la orientación del gen (la transcripción siempre se hace de 5' hacia 3').

cisternas de RE o de la membrana citoplasmática u otros compartimentos, que determinan a su vez la posición espacial que tendrán los productos fabricados. La información genética se refiere esencialmente a los primeros tipos de información. a), b) y c)

Por otra parte, existe información genética que no está destinada a codificar la secuencia de aminoácidos de proteínas, sino la activación de la transcripción de genes, las señales para el procesamiento de ARN, las señales para la interacción del cromosoma con los microtúbulos en la mitosis, y muchas otras señales, que están codificadas en el ADN y *no se transcriben*, es decir que esa información no se transfiere necesariamente al ARN, sino que forma parte de otro circuito informativo que es el de las interacciones específicas del ADN con proteínas. La información genética transcriptible usual codifica las secuencias de aminoácidos en proteínas; pero, adicionalmente, un número de genes codifica ARN, de tipo estructural, tales como los ARNr de 28S y de 18S, los ARNt y otros ARN que no codifican secuencias en proteínas sino que tienen funciones por sí mismos y que constituyen una parte *no traducible* de la información genética transcripcional (fig. 5-2)

El concepto de información genética está vinculado, por un lado, al tema de la evolución de los seres vivos,[1] y por otro, al concepto general de *información.*

En los últimos años se ha reconsiderado el papel de los ácidos nucleicos en la evolución de los seres vivos, desplazando el énfasis desde el ADN hacia el ARN y las proteínas.[1] De esa manera se ha eliminado una clásica paradoja. si el ADN es el poseedor original de la información génica, ¿cómo se fabricó ese ADN por primera vez, si su fabricación implica enzimas proteicas: ADN polimerasa, etc.? El descubrimiento de las propiedades catalíticas del ARN (en 1981 se demostró que ciertos ARN pueden actuar como una enzima [*ribozimas*], provocando, por ejemplo, el corte y ensamblado de su propia molécula),[1] así como la observación de la abundancia de hallazgos de transcriptasa inversa (enzima viral que cataliza la síntesis de ADN a partir de ARN) en ciertos virus, ha llevado a considerar que el ADN es un material relativamente "nuevo" en el curso de la evolución de los seres vivos, posterior a la síntesis de ARN y proteínas, y que sirvió para depositar en forma permanente una información que ya estaba codificada previamente en el ARN, que posee menor estabilidad, y el cual a su vez reconoce directamente aminoácidos (aa) y proteínas específicas; por ello se considera que las proteínas y algunos ARN son los materiales bio-

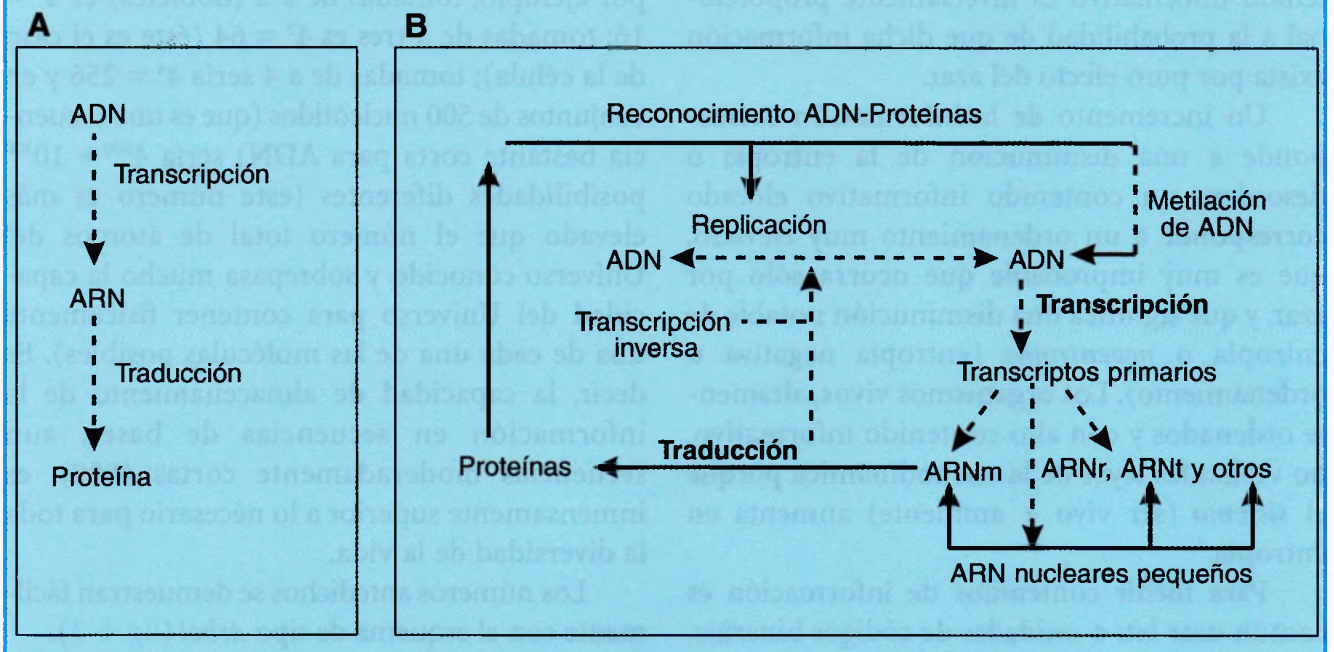


Fig. 5-2. Circuitos de información genética en la célula. A la izquierda, versión impiificada del flujo de información en la célula (**A**). A la derecha (**B**), versión algo más completa de los flujos de información posibles. La transcripción inversa sólo ocurre excepcionalmente en células de organismos superiores.

lógicos más primitivos que contuvieron información genética, al comienzo de la evolución biológica sobre la Tierra, en el denominado "mundo del ARN"[2]

En ese sentido hay evidencias de que los ARN capaces de unirse específicamente a un aminoácido mediante su capacidad de ribozima y permitir su posterior unión a otro con una unión peptídica, precedieron al sistema de aminoacil ARNt-sintetasas que en forma universal son los responsables de la especificidad de unir un ARNt a un aminoácido en los organismos actuales.[3] Estas y otras evidencias sugieren que el mundo del ARN fue durante muchos millones de años el que sirvió de base a los primeros organismos vivos.

Concepto general de información

La información está relacionada con el *orden*, y éste a su vez, con la noción termodinámica de *entropía*. Todos estos conceptos, por su parte, se relacionan con la noción matemática de probabilidad. En matemática, la probabilidad se define como el cociente entre el número de casos favorables y el número de casos posibles:

$$P \frac{\text{Nº casos favorables o correctos}}{\text{Nº casos posibles}}$$

El *contenido informativo* de un mensaje se define como una función del cociente entre el número de respuestas posibles y el número de respuestas correctas para resolver un problema o realizar una tarea. Así, la probabilidad de que al tirar un dado resulte un 1 es $^1/_6$, y el mensaje de que el resultado de tirar un dado fue 1, tiene un contenido informativo que es una función de $^6/_1 = 6$. De tal forma, el concepto de *información* es inverso al concepto matemático de probabilidad.

$$I = f\,(^1/_p)$$

En un enfoque elemental y no cuantitativo, se puede afirmar la noción intuitiva de que la información contenida en un mensaje compuesto es igual a la *suma* de las informaciones contenidas en los mensajes elementales, y que ese con-

tenido informativo es inversamente proporcional a la probabilidad de que dicha información exista por puro efecto del azar.

Un incremento de la información corresponde a una disminución de la entropía o desorden, un contenido informativo elevado corresponde a un ordenamiento muy elevado, que es muy improbable que ocurra sólo por azar, y que significa una disminución notable de entropía o *negentropía* (entropía negativa u ordenamiento) Los organismos vivos, altamente ordenados y con alto contenido informativo, no violan las leyes de la termodinámica porque el *sistema* (ser vivo + ambiente) aumenta en entropía.[3]

Para medir contenidos de información es común usar *bits* o unidades de códigos binarios. De esa manera se ha estimado que una célula germinal contiene una información genética de 10^{12} bits (Holzmüller, 1984) [4] Así, un aminoácido (de los 20 naturales), en una secuencia de una proteína, lleva un contenido informativo de $\log_2 20 = 4{,}3$ bits.

Código genético

Código es la convención por la cual se transforma una señal informativa en otro tipo de señal: por ejemplo, la secuencia de bases en el ARN, la cual se transforma en secuencia de aminoácidos en una proteína (otro ejemplo es la codificación de números decimales en unidades binarias o bits). Los códigos (convenciones) pueden ser más o menos complicados. En el caso de la información genética, la dilucidación del código en el decenio de 1960 fue un adelanto histórico, al mostrar que los aminoácidos están representados por tripletes de bases.[4] Previamente se debe considerar la capacidad de *almacenamiento de información* en las secuencias de bases de los ácidos nucleicos.

En el ADN hay 4 tipos de bases, A, T, G y C, que pueden repetirse, cada una, de forma indefinida. En el ARN ocurre lo mismo, pero la timina (T) es sustituida por uracilo (U) Si cada ordenamiento de un grupo de r bases codifica una señal, el número de señales posibles de codificar con las 4 bases tomadas de "a" r es 4^r; por ejemplo, tomadas de a 2 (dobletes) es $4^2 = 16$; tomadas de a tres es $4^3 = 64$ (éste es el caso de la célula), tomadas de a 4 sería $4^4 = 256$ y en conjuntos de 500 nucleótidos (que es una secuencia bastante corta para ADN) sería $4^{500} \approx 10^{300}$ posibilidades diferentes (este número es más elevado que el número total de átomos del Universo conocido y sobrepasa mucho la capacidad del Universo para contener físicamente una de cada una de las moléculas posibles) Es decir, la capacidad de almacenamiento de la información en secuencias de bases, aun secuencias moderadamente cortas (500), es inmensamente superior a lo necesario para toda la diversidad de la vida.

Los números antedichos se demuestran fácilmente con el esquema de tipo *árbol* (fig. 5-3).

Lo anterior se refiere a señales codificadas en secuencias de r bases (p. ej., 500), que en conjunto todas representan una señal. Cuando r es un número grande, este tipo de señales tiende a facilitar enormemente que ocurran errores: basta una base cambiada en las 500 para que la señal cambie *totalmente.* Por ello, con el fin de minimizar errores, pueden utilizarse conjuntos con r pequeños, o sea dobletes o tripletes de bases, y tripletes como señales; es decir, puede asignarse valor informativo no a bases individuales, sino a dobletes, tripletes, cuadrupletes o en general n-tupletes o conjuntos de n bases, siendo n un número pequeño. Si se asigna valor informativo a tripletes de bases, el cambio de una base no altera el contenido informativo de una secuencia larga (p. ej., la secuencia de 500 bases; aunque el cambio de marco de lectura, explicado más adelante, es una excepción) sino solamente la información asignada a tres bases, lo cual es mucho más fácil de corregir, por un lado, y aun de pasar sin consecuencias (si hay redundancia de tripletes, etc., véase más adelante) Esta codificación en n tupletes trae aparejada una disminución de la capacidad de almacenamiento, pero asegura mayor precisión; por ejemplo, con un alfabeto de 24 letras, tomadas en grupos de 50 letras, con repetición, se pueden formar 24^{50} secuencias (o palabras, cada una con significado propio), un número muy grande; pero al manejar grupos de 50 letras es fácil cometer un error, y uno solo

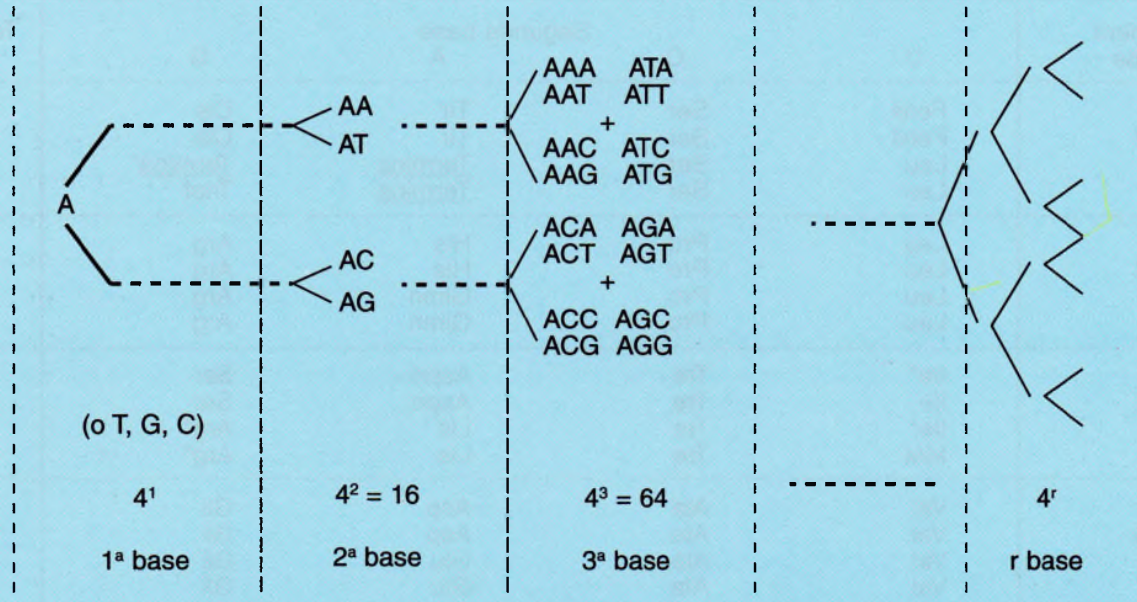


Fig. 5-3. Esquema de tipo "árbol" para las permutaciones posibles de bases.

invalida todo el grupo de 50; en cambio, si son grupos de cinco letras –cada uno con significado– se pueden codificar 24^5, un número mucho menor, pero cada grupo de 5 letras es más manejable, el conjunto de 50 letras codifica 10 palabras independientes (c/u con 5 letras), y un error de una letra en el conjunto de 50 sólo invalida una de las 10 palabras. Por esa razón es más eficiente el uso de n-tupletes, donde n es un número pequeño, cuando hay un cierto margen inevi table de error, como ocurre en las células de los organismos.

Unidades codificantes: codones

Si cada triplete tiene asignado un valor informativo, es útil designarlo con una palabra específica. A esta unidad, en general, se la denomina *codón*. Y, en el caso de las células, se la define como el triplete de bases del ARNm que codifica a un aminoácido (fig. 5-4) Un codón es reconocido por un *anticodón*, secuencia de tres bases del ARN de transferencia (ARNt), el cual por uno de sus extremos, el 3 , se une específicamente al aminoácido codificado por el codón. Obsérvese que, en el ADN, hay secuencias que son complementarias del codón (que son las transcriptas y pertenecen a una de las dos cadenas, la molde) y secuencias idénticas (salvo U T), que no son transcriptas, en la cadena de sentido. La transferencia de información se hace del modo que muestra la figura 5-5

Hay un paso, aún incompletamente conocido, en el que una proteína (la enzima activante) debe reconocer un ácido nucleico (el ARNt)

Por otro lado, los codones no están superpuestos, no existen señales de separación entre ellos (no hay codones solapados ni "signos de puntuación").

Códigos imbricados o superpuestos

Una secuencia de tripletes puede ser dispuesta de tres formas (fig. 5-6)

En los códigos imbricados, la sustitución de *una sola base* por otra, en una mutación, puede afectar *más de una señal*, o sea, más de un aminoácido; pronto se vio que éste no podía ser el caso en las células, porque la sustitución de una base sólo puede cambiar un aminoácido (la *inserción* y la *pérdida* de una base son casos distintos, donde se modifican más, como se verá más ade-

Primera base	Segunda base U	C	A	G	Tercera base
U	Fenil	Ser	Tir	Cis	U
	Fenil	Ser	Tir	Cis	C
	Leu	Ser	Termina	Termina*	A
	Leu	Ser	Termina	Tript	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gimn	Arg	A
	Leu	Pro	Gimn	Arg	G
A	Ile*	Tre	Aspn	Ser	U
	Ile	Tre	Aspn	Ser	C
	Ile*	Tre	Lis	Arg*	A
	Met	Tre	Lis	Arg*	G
G	Val	Ala	Asp	Gli	U
	Val	Ala	Asp	Gli	C
	Val	Ala	Glu	Gli	A
	Val	Ala	Glu	Gli	G

Fig. 5-4. Código genético. Las posiciones señaladas con asterisco son diferentes en el código mitocondrial.[5]

lante) Por otra parte, los códigos imbricados determinan ciertas limitaciones a las posibles secuencias de aminoácidos: a un aminoácido codificado por AAA en el caso 3) de la figura 5-6, sólo le puede seguir un aminoácido codificado por AAX, donde X puede ser cualquiera de las 4 bases; es decir que sólo puede haber cuatro posibilidades (dentro de las 20 posibles) para el segundo aminoácido. Sin embargo, los análisis de las secuencias de aminoácidos de muchas proteínas mostraron que un aminoácido puede ser seguido por cualquier otro de los 20 existentes. Por consiguiente, no hay código genético *general* que sea imbricado o superpuesto, lo cual se debe

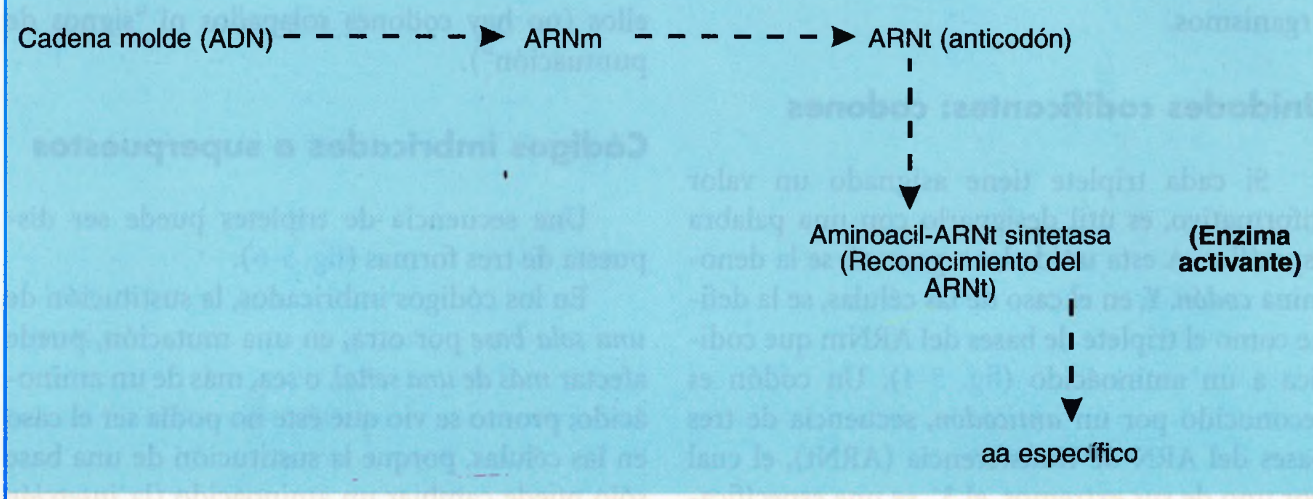


Fig. 5-5. Transferencia de información.

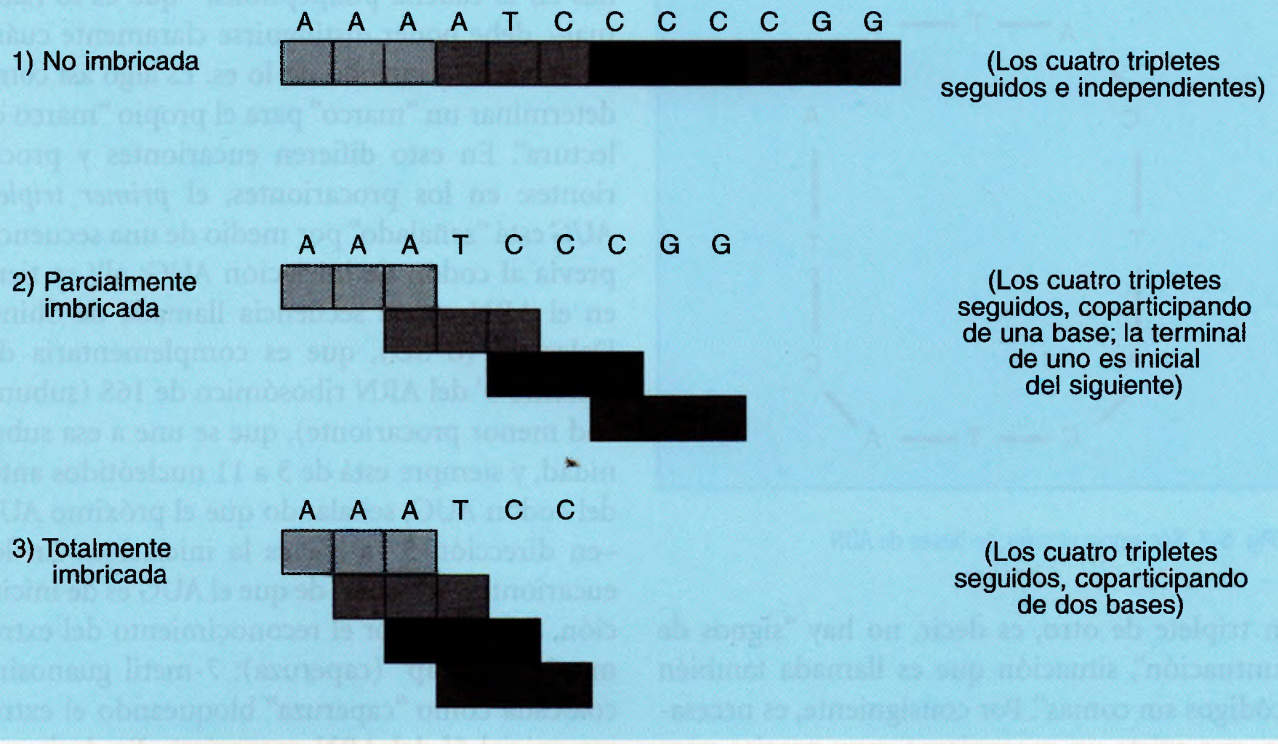


Fig. 5-6. Esquema de las tres disposiciones de secuencias de tripletes.

a que sería perjudicial porque agrava los efectos de mutaciones que sustituyen bases y limita la riqueza de posibilidades en las secuencias de aa en las proteínas.

Sin embargo, existen casos excepcionales en que la codificación es superpuesta debido a una ventaja que posee esta superposición. permite almacenar más cantidad de información en un número limitado de bases. Estas excepciones se dan especialmente en *virus*, donde el grado de empaquetamiento de la información es importante. En estos casos excepcionales, el código *sigue siendo no imbricado*, aunque los genes estén superpuestos: lo que cambia es el *marco de lectura.*

Marco de lectura

Una secuencia de 12 bases: ATCATCAT CATC puede ser leída (en tripletes) de varias maneras:

ATC-ATC-ATC-ATC, empezando en la primera base;

TCA-TCA-TCA-(TC), empezando en la segunda base, y

CAT CAT-CAT-(C), empezando en la tercera.

Obviamente, la secuencia dará señales distintas en cada caso, y si empezamos por la *cuarta* base se repite lo mismo que con la primera, etc. Si la secuencia de 12 bases es *circular* (fig. 5-7), las tres formas de lectura son perfectamente equivalentes, y se debe recordar que hay muchos ADN circulares que llevan información genética y que, en general, es única para cada secuencia. Esto implica que se debe *señalar*, adicionalmente, cuál es la primera base que se lee.

Esta señal determina el *marco de lectura*, que es el punto de comienzo para la lectura de tripletes. En toda secuencia de bases hay siempre tres marcos de lectura posibles, y generalmente uno solo es el usado. La determinación del marco de lectura en forma inequívoca es fundamental, porque los otros dos marcos de lectura proveen una información (posible) totalmente diferente.

El marco de lectura es de tal importancia debido a que no existe señal alguna que delimite

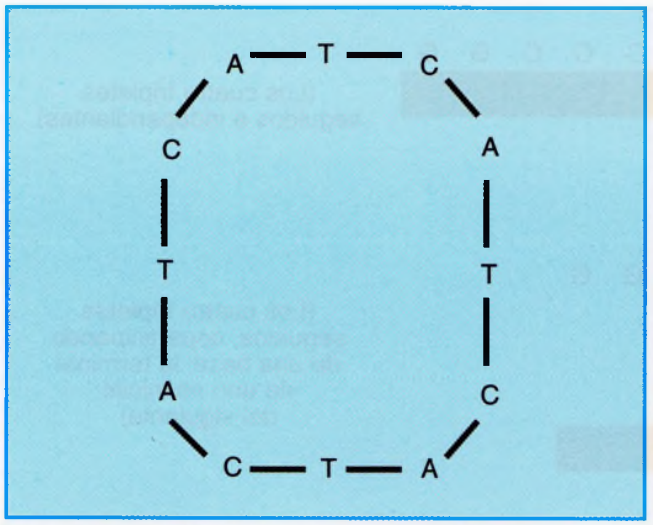


Fig. 5-7 Secuencia circular de bases de ADN.

un triplete de otro, es decir, no hay "signos de puntuación", situación que es llamada también "códigos sin comas" Por consiguiente, es necesario que exista un mecanismo muy preciso para determinar el marco de lectura. Estos mecanismos difieren en procariontes y eucariontes.

Determinación del marco de lectura

Es factible determinar el marco de lectura con el triplete correspondiente a un aminoácido, siempre que este aminoácido se encuentre *únicamente* codificado por ese solo triplete. Esto traerá aparejado, sin embargo, que *todas* las proteínas tengan que empezar por ese aminoácido específico, lo cual es una restricción grave, a menos que sea posible que ese aminoácido sea quitado posteriormente. Tanto en los procariontes como en los eucariontes existe un *único* triplete de iniciación, el *AUG* ("*a*hora *ú*sese *g*en"), que también es el único codificante del primer aminoácido (que es formil-metionina en procariontes y metionina en eucariontes) En ambos casos, este primer aminoácido puede ser separado posteriormente de la proteína, liberándose así la restricción de que todas las proteínas deban comenzar por ese aminoácido (por otra parte, el grupo formilo en procariontes es eliminado durante la síntesis de la proteína, dejando libre el NH_2 inicial) Sin embargo, hay otra dificultad: ese aminoácido de iniciación (metionina), si además forma parte de algunas posiciones internas en la cadena polipeptídica –que es lo habitual–, debe poder distinguirse claramente cuándo es inicial y cuándo no lo es. Es algo así como determinar un "marco" para el propio "marco de lectura" En esto difieren eucariontes y procariontes: en los procariontes, el *primer triplete AUG* está "señalado" por medio de una secuencia previa al codón de iniciación AUG; allí se tiene en el ARNm una secuencia llamada de Shine-Dalgarno (o SD), que es complementaria del extremo 3' del ARN ribosómico de 16S (subunidad menor procarionte), que se une a esa subunidad, y siempre está de 3 a 11 nucleótidos antes del codón AUG, señalando que el próximo AUG –en dirección 5 a 3'– es la iniciación. En los eucariontes, la "señal" de que el AUG es de iniciación, está dada por el reconocimiento del extremo 5' con "cap" (caperuza)· 7-metil guanosina colocada como "caperuza" bloqueando el extremo inicial 5' del ARN mensajero. Es decir que tanto en procariontes como en eucariontes, hay "señales" adicionales para identificar el codón AUG como verdaderamente iniciador. Pero hay además otro mecanismo para asegurar la diferenciación inequívoca del AUG inicial. el ARNt que carga el aminoácido metionina inicial es diferente del ARNt que carga la metionina intersticial: $ARNt^{meti}$ y $ARNt^{met}$ (fig. 5-8)

Por consiguiente, existe una determinación muy estricta del "marco de lectura", que determina que el codón AUG no sea ambiguo.

Señales de terminación del mensaje

La terminación del mensaje es menos específica y puede ser redundante, es decir, *cualquier* señal sin contenido puede en principio ser utilizada. En las células hay tres tripletes que significan fin (de mensaje, o sea de codificación de proteína)·

UAA ("ocre") ("*Ú*sese *A* Acabar")
UAG ("ámbar") ("*Ú*sese Acabar *G*en")
UGA ("ópalo") ("*Ú*sese *G*en Acabar")

(Las denominaciones originalmente designaron el aspecto de las placas de cultivos con mutantes de fagos.)

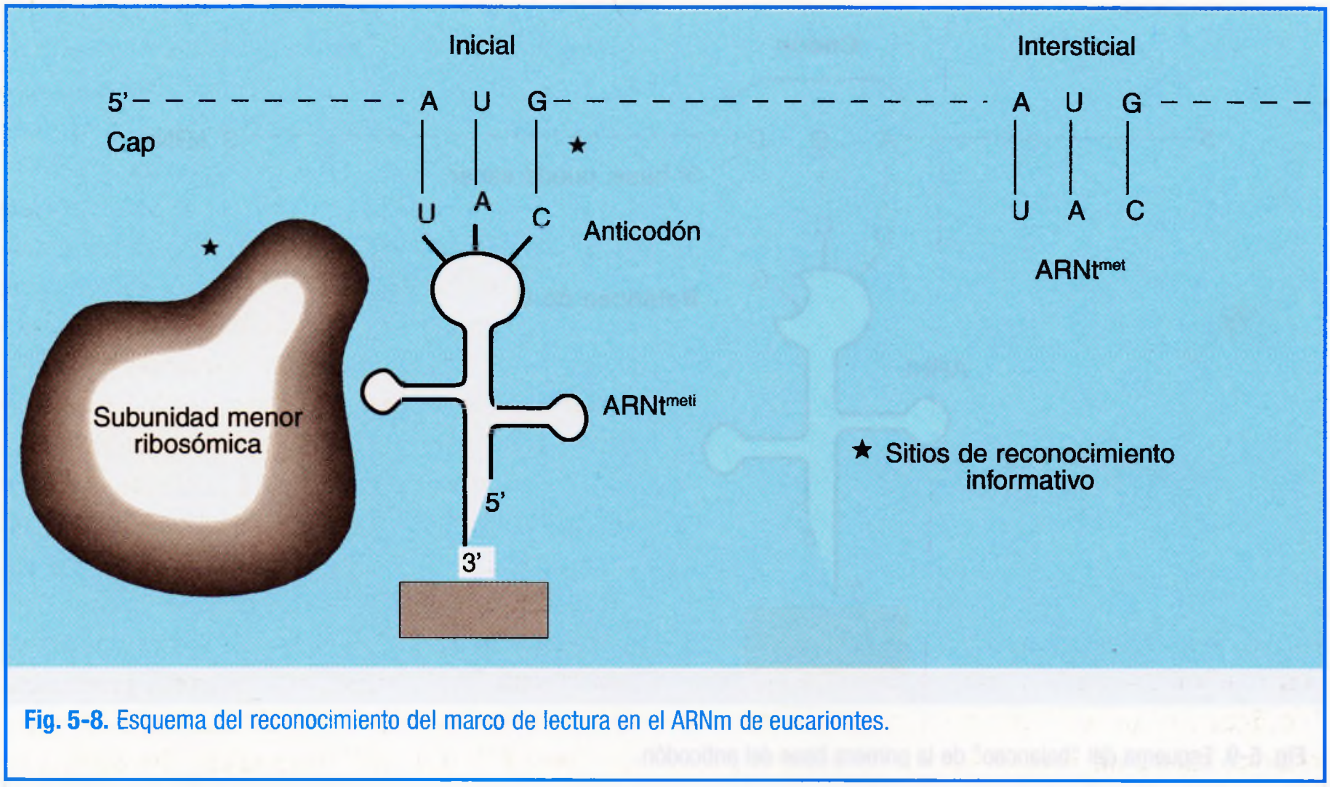


Fig. 5-8. Esquema del reconocimiento del marco de lectura en el ARNm de eucariontes.

Los codones de terminación son reconocidos por proteínas (R1, R2, factores de liberación) que interrumpen la síntesis de proteína.

Redundancia del código (degeneración). Codones sinónimos

En principio, si el número de señales posibles excede al necesario, todas las excedentes pueden carecer de sentido, y el código que se ajuste a esta condición no será redundante o degenerado, es decir, cada señal tendrá un significado único y será diferente de las demás. Por ejemplo, si para los 20 aminoácidos se usaran sólo 20 de los 64 tripletes posibles en el ADN, el código no sería degenerado. Sin embargo, esto llevaría a un grave riesgo, el de haber una gran cantidad de tripletes (44) "sin sentido" capaces de interrumpir un mensaje largo. Esta gran probabilidad de encontrar por error un triplete sin sentido es intolerable para la evolución biológica, que ha preferido entonces utilizar todos los codones sobrantes, de tal forma que hay *varios codones para cada aminoácido*. Cada grupo de codones para el mismo aminoácido está formado por "sinónimos", codones que significan lo mismo. Así, para el aminoácido valina hay cuatro codones sinónimos: GUU, GUC, GUA, GUG (obsérvese que todos empiezan con *GU*) y para arginina hay seis sinónimos, etc. Sólo la metionina (AUG) y el triptófano tienen un solo codón.

Pero estos "sinónimos" no son aleatorios, ni verdaderamente son del todo equivalentes. Los sinónimos están construidos de acuerdo con reglas, llamadas "del balanceo" (de la tercera letra del codón) Y los sinónimos no son usados con igual frecuencia, en el ADN, para designar un aminoácido.

Los sinónimos responden a las reglas del balanceo

Los tripletes codificantes en el ARNm no se unen en forma *absolutamente* complementaria con los anticodones del ARNt: esto significa que no hay una correspondencia unívoca entre un codón y un anticodón. Varios codones, que codifican el mismo aminoácido, pueden unirse al mismo anticodón. O sea que hay menos clases de ARNt que el número de tripletes codificantes de aa (61) El número de ARNt diferentes es variable según las especies; en levaduras hay 43, y en

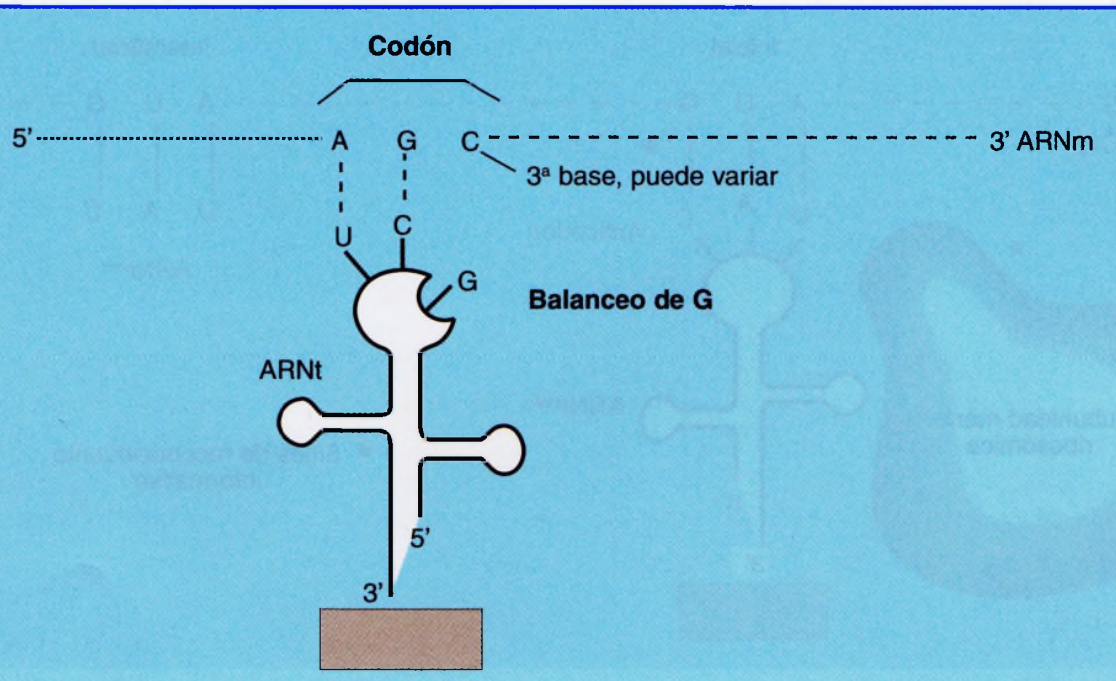


Fig. 5-9. Esquema del "balanceo" de la primera base del anticodón.

muchos otros organismos hay más de los 31 que teóricamente son suficientes para acoplarse a todos los codones, porque teniendo en cuenta el "balanceo" de la tercera base, con 31 tripletes es suficiente para codificar los 20 aminoácidos..

La *tercera* base de los tripletes del ARN mensajero, que se aparea con la *primera* base del anticodón del ARNt, es la que resulta más ambiguamente reconocida. Esto es una consecuencia de que la primera base del anticodón en el ARNt poseería una cierta "movilidad" o "capacidad de balanceo" que le permitiría ajustarse a variadas bases colocadas en la tercera posición del codón, de manera que los tripletes del ARNm, al unirse al anticodón, poseen más libertad en su tercera base, que puede ser reemplazada por otra (fig. 5-9)

Así se puede conformar un cuadro de reglas de asociación (cuadro 5-1)

La redundancia de los codones no altera la especificidad, ya que todos los ARNt que reconocen varios codones, reconocen *sinónimos*. Finalmente, la especificidad para el aminoácido (aa) depende de la enzima activante.

Cuadro 5-1. Correspondencias entre bases de los codones y bases de los anticodones. I: inosina, base propia del ARNt

1ª base de anticodón	3ª base de codón
U	A, G
C	G
G	U, C
A	U
I	U, C, A

Equivalencia de las secuencias de bases con lenguajes abstractos (formales)

Si ya se tienen identificadas las señales de iniciación, de terminación, la forma de determinación del marco de lectura y la clave de tripletes, podría procederse –si se sabe la secuencia de bases del ADN, o la del ARNm– a "traducir" esas secuencias de bases en secuencias de aminoácidos, que deberían corresponder a alguna proteí-

na o a algún segmento o "dominio" de una proteína; con lo cual, de saberse la secuencia de bases del genoma, *se tendrían ya las secuencias de todas las proteínas capaces de ser producidas* en el organismo, lo que sería de enorme importancia diagnóstica, terapéutica, etc. Sin embargo, esto no es tan fácil. En primer lugar, determinar la secuencia del genoma humano es un trabajo de enorme magnitud, que recientemente ha finalizado (véase después) Pero además, el ADN no está formado por una pulcra codificación de proteínas una tras otra. En realidad, los 3.000 millones de pares de bases (3.000 megabases) del genoma humano están compuestos por gran cantidad de segmentos que no codifican ninguna proteína, algunos segmentos son de ADN satélite, sin transcripción, otros son remanentes de la integración de virus (retrotransposones), otros son secuencias intercalares o intrones; otros son pseudogenes; otros son regiones reguladoras, que se unen a proteínas ligantes al ADN Una gran parte de ese ADN no codificante de proteína, sin aparente función, ha sido llamado "ADN egoísta" (dado que pasaría de una generación a otra sin funcionar), pero esta calificación ha perdido su razón de ser a partir de los recientes conocimientos de las funciones de esas regiones no codificantes de proteína.

Por consiguiente, al tener una secuencia de bases de un segmento de ADN es probable que se "lea desperdicio", en lugar del código de una proteína, o que se lea una secuencia reguladora, sin equivalente proteínico. Es como en el lenguaje hablado: no todas las secuencias de letras tienen "sentido", sino sólo las que forman palabras con sentido.

Por ello, es conveniente contar con una descripción abstracta de la información genética, considerando a las secuencias como *palabras posibles de un alfabeto de nucleótidos.* Las "palabras" serán definidas como secuencias de bases que se ajustan a ciertas reglas. Todas las "palabras" así definidas formarán un "lenguaje" Habrá muchas secuencias que no se ajustan a esas reglas y, por consiguiente, no serán aceptadas como palabras: carecerán de "sentido" El desarrollo de estos "lenguajes genéticos formales" es de importancia porque son fácilmente adaptables a un programa de computación, de esa manera, teniendo una secuencia el ordenador o computadora puede buscar las "palabras" y aun traducirlas, de acuerdo con las reglas del lenguaje.[6,7]

Una forma de hacerlo es mediante los llamados "autómatas finitos", que son cortos programas de computación que aceptan o rechazan símbolos leyéndolos en dirección de izquierda a derecha.[6]

Se necesitan varios de estos programas o autómatas: uno, primero, para detectar la señal que indica la iniciación de un gen (en procariontes las secuencias Shine-Dalgarno), el segundo, para la lectura de un gen. Las reglas del programa autómata pueden dibujarse como un gráfico en papel, y estos gráficos son sorprendentemente simples. Las reglas para el autómata lector de gen son. aceptar las secuencias que después del primer AUG (inicial) formen múltiplos de tres bases y contengan un solo codón de terminación UAA, UAG o UGA. La dirección de lectura es de 5' a 3', en el ARNm. Cuando se lee ADN genómico, el triplete inicial en la cadena de sentido es ATG (en la cadena de molde es TAC, pero por convención siempre se representa la cadena de sentido únicamente) La presencia de cualquiera de los tres tripletes de terminación (en el ADN, cadena de sentido TAA o TAG o TGA "cierra" la lectura), para que un segmento de ADN sea considerado codificante, debe tener el *m*arco "*a*bierto" de *l*ectura (**MAL** ORF en inglés) por una distancia significativa, como para codificar un razonable número de aminoácidos. A pesar del enorme interés despertado por este enfoque *bioinformático*, las dificultades para efectivizar el reconocimiento de los genes se han multiplicado, dada la presencia de secuencias *aparentemente* génicas pero sin secuencias reguladoras esenciales para ser transcriptas; a la presencia de varios promotores para un mismo gen, y a otras complejidades que se describen en el genoma humano (véanse los próximos párrafos y el capítulo 6)

Conceptos de "gen"

No hay una definición única para "gen" El concepto tradicional, derivado del estudio de los rasgos externos del organismo (fenotipo) y del

estudio de las genealogías, es el de una unidad heredable, que puede mutar y ocasionar cambios en los rasgos o fenotipo. Esa unidad, para ser un gen nuclear, debe pertenecer a un mapa de ligamiento (que es la representación de un cromosoma, véase cap. 11), donde presenta un lugar o "locus" Por otro lado, los estudios moleculares han llevado a un concepto útil de un gen, como un segmento de molécula de ADN que contiene una *unidad de transcripción y sus secuencias de bases reguladoras principales* ("promotor") Esta última definición no implica que esas unidades codifiquen proteínas, aunque muy frecuentemente sea así, porque un número de unidades de transcripción codifican ARN que no se traducen en proteína sino que son "estructurales" o "reguladores" los ARN ribosómicos y los de transferencia son un ejemplo; los ARN "nucleares pequeños" (ARNnp=snRNA) que intervienen en el procesamiento del ARN transcripto original, llamados U_1 U_{12}, son otro ejemplo; el producto del gen *XIST* (véase cap. 11) es otro más. Por otra parte, no hay una relación clara y única entre la definición tradicional y la definición molecular citadas. Así, varias mutaciones de un único "gen" (definido como segmento de ADN) pueden determinar cambios fenotípicos diferentes, tales como variantes graves y leves de enfermedad (véase cap. 8), o aun enfermedades diferentes (como las diversas mutaciones del *RA.* receptor de andrógenos, que provocan feminización testicular o atrofia muscular espinobulbar).

Tampoco la definición molecular está libre de imprecisiones.[8] La presencia de unidades de transcripción, insertadas dentro de intrones en algunos casos, parece indicar la presencia de genes anidados uno dentro de otro.[9] Por otra parte, el procesamiento (empalme) alternativo de ARN puede servir para producir polipéptidos diferentes provenientes de la misma unidad transcripcional. Sin embargo, con el fin más didáctico de enumerar genes, puede considerarse una definición molecular restringida a genes de proteínas: *gen sería aquel segmento de ADN que contiene una unidad de transcripción que puede ser traducida en una o varias secuencias polipeptídicas.*[8] De esta manera se cuentan como un solo gen aquellos segmentos de ADN cuyo transcripto de ARN puede ser cortado y empalmado en más de una secuencia de aminoácidos.

El proyecto ENCODE y los cambios en el concepto de gen

En 2003 el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos inició un proyecto cuya primera fase terminó en 2007 y se prolonga hasta la actualidad, y que constituye en cierta forma una continuación del Proyecto Genoma Humano. El objetivo de este proyecto es identificar todos los elementos *funcionales* del ADN humano, como lo establece su nombre (*ENC*yclopedia *O*f *D*NA Elements) Como consecuencia de los resultados de ese proyecto, se han producido importantes cambios en los conceptos de la información genética humana. En primer lugar, se ha confirmado que el transcriptoma (véase cap. 1) humano es muy grande, es decir que el número de transcriptos es mucho mayor que el número de genes humanos. El número de genes humanos codificantes de proteína es de sólo 22.726, casi igual al número de genes codificantes de proteínas del gusano pequeño (mide 1 mm) *Caenorhabditis elegans.*[10] Es decir que, a pesar de una diferencia de tamaño genómico de unas 30 veces y de una enorme disparidad de estructura y funciones, el número de genes de proteína es prácticamente el mismo, lo cual desde ya excluye al número de genes de proteína como un indicador de mayor complejidad biológica. Por otro lado, la gran cantidad de ARN transcriptos por el genoma humano indica que esas secuencias anteriormente consideradas como "desperdicio" no lo son tanto, porque el genoma se transcribe en más de un 90%.[11] El examen de los transcriptos globales deparó sorpresas, porque la mayoría no estaban destinados a codificar proteínas, pero eran sintetizados por la misma polimerasa II, y se superponían con los genes de proteínas, empezando antes y terminando mucho después de esos genes, como si la polimerasa hiciera una síntesis que fue llamada traspasante ("pervasive") Los transcriptos no proteínicos son estables y comprenden más de la mitad del transcriptoma humano conocido, tie-

nen expresión en tipos celulares específicos, pueden ser procesados y empalmados y pueden tener colas poliadeniladas, todas características que sugieren un significado funcional.[10,11] En realidad, un número creciente de estos ARN ha demostrado ser funcional (véase final de este capítulo) Estas observaciones han cambiado la actual concepción de los genes humanos, porque ya no es factible reducirlos a los codificantes de proteínas y de ARN estructurales como los ARN ribosomales, sino que actualmente se está reviendo el concepto de gen, como una unidad definida básicamente por su transcripto y su funcionalıdad.[12] De acuerdo con estos conceptos más recientes, un gen (en general) sería una secuencia genómica (de ADN o de ARN) que codifica directamente moléculas funcionales, ya sean ARN o proteínas.[12]

Número de genes en el genoma humano

El número de genes del genoma humano no se conoce con precisión.[8,9] Se han realizado estimaciones basadas en diversas hipótesis, que dieron resultados, antes de la finalización de la secuenciación del ADN humano, en un número de genes del genoma humano fluctuante entre 25.000 y 30.000;[8] la cifra actual más probable es la de 25.000 genes (definidos como en el párrafo anterior; véase el próximo capítulo), aunque como se dijo más arriba los genes estrictamemn te codıficantes de proteína son 22.726. Un tipo antiguo de estimaciones del número de genes se basa en el concepto de carga mutacional (véase también cap. 8) Las mutaciones que no son estrictamente neutras (polimorfismos) y que producen algún deterioro o desajuste, se suman para constituir la *carga mutacıonal* total promedio en la especıe humana. Sı se acepta que la tasa promedio de incidencia de nuevas mutaciones en células germinales por generación y por "locus" (gen) oscila alrededor de $10^{(-5)}$ (cap. 8), un número de genes mayor de 10^5 determinaría más de una nueva mutación desfavorable por cada individuo por generación en la especie humana, lo cual es claramente inaceptable para mantener la especie (una cifra un poco menor de una mutación, por individuo y por generación, es aceptable, porque no necesariamente se acumulan) Otro tıpo de estimación se basa en la proporción del genoma que es transcripta. Esta proporción es muy variable de célula en célula, pero, considerando los tejidos que tienen mayor cantidad de unidades transcripcionales activas, se llegaba antes del estudio del transcriptoma a un porcentaje del 5% del ADN [13] Esta cantidad de ADN, dividida por la longitud promedio de los genes conocidos, también conduce a una esti mación que no sobrepasa los 30.000 genes. La finalización del Proyecto Genoma Humano en 2003 ha permitido poner cierto límite pero no definir totalmente el número de genes humanos, que *oscila alrededor de 25.000* (véase el próximo capítulo) Si se toman promedios, esto significa la existencia de un gen cada 80-90 kb de ADN humano; pero, sın embargo, hay grandes varia ciones de una región a otra (cap. 6) Otro indicador útil para la detección de muchos de los genes es la presencia de las *islas CpG* (citosina-fosfato-guanina),[14] también llamadas HTF (por *H*paII *t*iny *f*ragments, por ser cortadas en segmentos pequeños por la citada enzima de restrıcción), que son secuencias con cantidades espera bles en la frecuencia del dinucleótido CG (el resto del genoma está empobrecido de este dinu cleótido), con la citosina libre de metilación, y de alrededor de 1 2 kb de extensıón, que se encuentran generalmente previas a la región inicial (5') de un gen (no todos los genes tienen "ıslas CpG" asociadas; son más frecuentes en los *genes de "mantenimıento"* o de función continuada en todos los tipos celulares) Una estimación del número de islas CpG en el genoma humano permitía también predecır una cifra total de genes (de proteína) parecida a la citada anteriormente.

Sin embargo, como se dijo más arriba, el concepto aceptado de gen como codificante de proteína está siendo restringido a sólo un tipo de gen, los *genes de proteínas.* En la actualidad se toman en cuenta también los genes de ARN, no sólo los ARNr y los ARNt, sino también los "ARN largos no codificantes de proteína" que tienen funciones reguladoras y de otros tipos, de manera que el número total de genes (de proteína más de ARN) es todavía incierto. En 2009 el Centro

Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos tenía un listado de 34.596 genes funcionales, que incluyen muchos que se transcriben y no codifican proteínas.

Esquema general de un gen humano de proteína

Un gen promedio contiene segmentos discontinuos de ADN codificantes de aminoácidos, denominados *exones*, separados por secuencias no codificantes de aa, los llamados *intrones* o secuencias intercaladas; la región que se transcribe o unidad de transcripción incluye, además de los exones e intrones, una secuencia relativamente corta que antecede al primer exón, denominada *secuencia anterior no traducida* (SANT), o secuencia no traducida en 5', y además contiene, con posterioridad al último exón, una secuencia que a veces es de considerable longitud, la *secuencia posterior no traducida* (SPNT), o secuencia no traducida en 3', que contiene la señal de poliadenilación del transcripto primario. Además de la unidad transcripcional en sí misma, el esquema general de un gen debe comprender las secuencias reguladoras inmediatas (*promotor*) y alejadas (*intensificadores y/o silenciadores*) de ese gen, para que el concepto sea el de una unidad funcional (fig. 5-10)

Secuenciación de ADN (ADN genómico y ADN complementario)

De lo descrito en los párrafos anteriores, se deduce el gran interés que tiene obtener la secuencia completa de bases de cada molécula de ADN representada en cada cromosoma humano. La secuencia de bases completa de un cromosoma permite en principio, identificar y localizar todos los genes situados en ese cromosoma, conocer su estructura y hasta predecir qué polipéptido codifica cada gen de proteína. Se identifica un gen (de proteína) cuando, en una larga secuencia de bases de ADN, se encuentran sus elementos constitutivos básicos: un marco abierto de lectura (MAL), precedido generalmente por las secuencias típicas reguladoras de un promotor, y que es una secuencia de tipo *conservada* (es decir que en especies filogenéticamente cercanas se encuentra una secuencia muy parecida) Se localiza el gen en forma absoluta, dentro de la secuencia total de bases; pero además se lo localiza en forma relativa, o sea en relación con otros genes ya conocidos y cuya secuencia se conoce, con lo cual puede medirse la distancia en pares de bases que lo separan de un gen conocido o de un "marcador" (véase cap. 11), es decir, se lo sitúa en un "mapa físico" o mapa de secuencias de bases; se conoce su

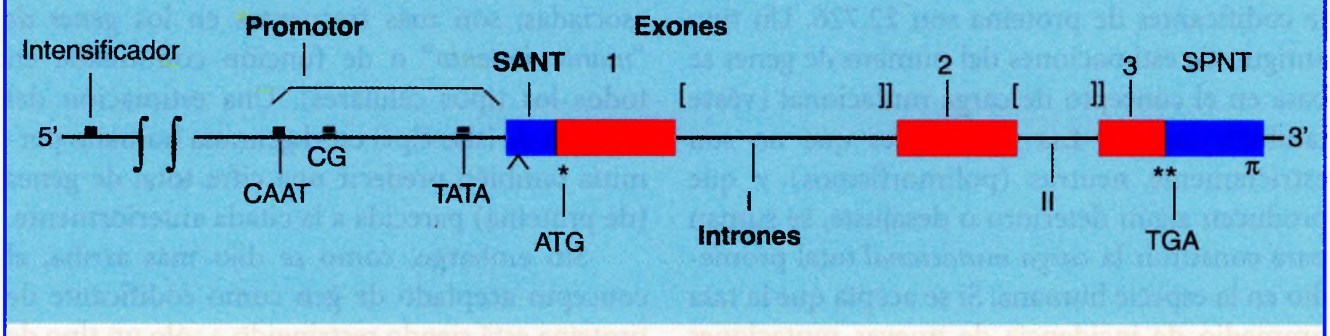


Fig. 5-10. Esquema general de un gen humano que contiene 3 exones, sus intrones I y II, su región SANT (secuencia anterior no traducida), su región SPNT (secuencia posterior no traducida), esta última con la señal de poliadenilación (π), la región promotora con sus secuencias proximales (TATA) y distales (CG y CAAT). A una distancia variable se encuentra la secuencia "intensificador". Los tripletes de iniciación (ATG = AUG en transcripto) y uno de los de terminación (TGA = UGA en transcripto) están señalados por uno y dos asteriscos, respectivamente. En los intrones, las señales de corte y empalme están señaladas por barras ([y]]). El sitio de la "caperuza" (nucleótido +1 del transcripto) se señala con un acento circunflejo (^). Por convención, siempre se representa la cadena no molde o "de sentido" del ADN en un sitio determinado de su molécula.

estructura, esto es, cuántos y qué tipo de exones e intrones tiene, cómo son las señales en sus regiones no traducidas (SANT y SPNT, véase antes) y qué tipo de región promotora posee; finalmente, de las secuencias de los exones se deduce, hasta cierto punto, qué polipéptidos codifica cada uno, usando las reglas del código genético. Sin embargo, para este último fin es más útil conocer la secuencia de bases del ADNc (ADN complementario) respectivo, porque éste representa directamente el mensaje expresado por el gen. Si se recuerda (véase cap. 2) que los ADNc se obtienen experimentalmente en el laboratorio mediante la transcriptasa inversa que copia la secuencia de bases de un ARNm, es obvio que un ADNc contiene exactamente la información codificada de todos los exones del gen, habiéndose liberado de los intrones y de las secuencias reguladoras previas, por lo cual la secuencia del polipéptido codificado es directamente legible.

La secuenciación del ADN genómico humano no localiza fácilmente los genes, puesto que el genoma contiene grandes cantidades de ADN intergénico de variada naturaleza (véase cap. 6), lo cual hace que existan regiones "pobres" en genes y otras relativamente enriquecidas, que son las más atractivas para los investigadores. La secuenciación total de todas las moléculas de ADN humanas fue el principal objetivo del Proyecto Genoma Humano, iniciado en 1990 en los Estados Unidos. Desde el año 1995 se aceleró su velocidad, en consecuencia ya existe un número considerable de regiones (cada una de ellas pequeña) totalmente secuenciadas en muchos cromosomas humanos, por lo que se consideró que en un plazo de dos a cinco años se poseería el mapa total de secuencias de varios cromosomas humanos, entre ellos el cromosoma 22, el 16, el 19, el 21 y el X y el Y11 (panel 5-1) Este avance fue más rápido de lo esperado, y en 2001 se tuvo un "borrador" de las secuencias y en 2003 el resultado completo (véase cap. 6)

Métodos de secuenciación

Los métodos de secuenciación de ADN son costosos, aunque han ido disminuyendo (de USD 0,30 por base en la décda de 1990,[15] al objetivo actual de un genoma por menos de USD 1.000) y los aparatos de secuenciación automatizada requieren inversiones significativas (USD 100.000 o más) y también mucho tiempo de dedicación técnica, por lo cual la secuenciación en cantidad importante se realiza en centros

Panel 5-1 Avance y completamiento del Proyecto Genoma Humano

Durante el Proyecto Genoma Humano se ha puesto énfasis en el uso de las genotecas de ADNc (véase cap. 3) para el mapeado del genoma. Se han elegido fragmentos cortos del ADNc de genes, en especial de las secuencias posteriores no traducidas (SPNT, véase el párrafo anterior) del extremo 3'. Estos fragmentos de genes se denominan "rótulos de secuencias expresadas" (RSE = EST, en inglés) y pueden convertirse eficientemente en "sitios rotulados" (SRSC, véase más adelante) para usar en el mapeado del genoma. Al usar directamente secuencias génicas (del ADNc), se ha avanzado de manera más veloz y se habían identificado 16.354 genes hasta 1996.[15] Si bien el ADN humano totalmente secuenciado hasta 1996 era alrededor del 1% del genoma, se proyectaba que estarían secuenciadas 500 megabases (Mb) en 1999, y el total del genoma para el año 2005, pero el avance fue muy rápido y se completó en 2003 (véase próximo capítulo). En tanto, es de gran utilidad la comparación con el primer organismo eucarionte cuyo ADN ha sido totalmente secuenciado, la levadura *Saccharomyces cerevisae*, con 12,068 Mb de ADN y que posee 5.885 genes de proteínas. El conjunto total de las proteínas codificadas por un organismo se denomina "proteoma". El proteoma de la levadura ha mostrado que en ella existen alrededor del 50% de las proteínas que están alteradas en enfermedades hereditarias humanas.[16]

especializados. La determinación de secuencias de unas pocas kilobases se puede realizar manualmente en muchos laboratorios, con propósitos diferentes, por ejemplo determinar si una región corta de ADN de un gen posee una mutación específica en una o más bases. Dado que se trata de procedimientos técnicos fuera del alcance del médico clínico, aquí sólo se resumen algunos de sus fundamentos. Hay dos métodos generales de secuenciación de ADN, el de base química, de Maxam y Gilbert, y el método de base enzimática de Sanger; este último es el que prevalece actualmente.[17] El método de Sanger también es conocido como el método de los *didesoxinucleótidos* (abreviado ddNTP), porque éstos cumplen un papel esencial en el método al determinar el cese de la síntesis de cada fragmento copia. Los ddNTP, a diferencia de los nucleótidos naturales, no poseen un oxhidrilo en posición 3' de la desoxirribosa (véase cap. 3), de modo que al entrar un ddNTP en una copia sintetizada por una ADN polimerasa, allí se acaba el crecimiento de la copia y se libera un fragmento que termina en el ddNTP incorporado. El método se inicia con el ADN por secuenciar, pero usando una sola cadena (generalmente unida a un vector de cadena única como el fago M13) Este ADN se coloca en presencia de ADN polimerasa y un corto primero complementario a una corta secuencia del ADN por secuenciar, y se agregan los trifosfatos de desoxinucleótidos naturales (dNTP) GTP, ATP, TTP, CTP, y una muy pequeña concentración de los cuatro correspondientes ddNTP, cada uno de los cuales lleva unido un colorante fluorescente *diferente*. Los ddNTP-flúor se incorporan al azar en las copias que se están sintetizando y su frecuencia depende de la concentración relativa entre dNTP ddNTP-flúor (si los ddNTP-flúor están en alta concentración todos los fragmentos serán cortos) Cada vez que se incorpora un ddNTP, se corta la copia a ese nivel. Por consiguiente se tiene una sopa de fragmentos, de longitudes diversas, clasificables en cuatro grupos: los que terminan con el color del ddCTP, los del color del ddGTP, los del color del ddTTP y los del color del ddATP (fig. 5-11), a su vez, en cada grupo, los fragmentos son de todas las longitudes posibles con esa terminación. El resultado de la reacción se corre en electroforesis de poliacrilamida, y mediante un láser se excita la fluorescencia de cada marcador, detectando a qué color corresponde. Como todos los fragmentos de idéntica longitud forman una banda y poseen el mismo ddNTP-flúor terminal, la sucesión de los colores equivale a la sucesión de bases en el ADN (verde, amarillo, rojo y azul, por ejemplo, codifican las cuatro bases) El citado método de Sanger se ha automatizado y se ha hecho más eficiente, de tal modo que se ha llegado a secuenciar más de 10.000 bases por día, mientras manualmente sólo se secuencian un par de centenares de bases por día.

Mapas "físicos" de un segmento cromosómico

Hay dos tipos principales de mapeado del genoma humano: los mapas de ligamiento o genéticos (véase cap. 11), construidos sobre la base de las frecuencias de recombinación entre genes, y cuyas unidades son centimorgans (cM), y mapas "físicos", construidos sobre la base de distancias entre sitios con secuencias de bases reconocibles y cuyas unidades son kilobases (kb) o megabases (Mb) de ADN Los mapas físicos llevan ese nombre porque se construyen con elementos reconocibles de una molécula de ADN, y pueden ser de varios tipos: el mapa físico ideal es la secuencia completa de una molécula de ADN A falta de él, los mapas físicos consisten ya sea en. a) *mapas de sitios de restricción*; b) *mapas de fragmentos superponibles o contiguos* (*contigs*), o c) *mapas de sitios rotulados por secuencias conocidas* (SRSC STS; véase más adelante) (fig. 5-12)

Los mapas físicos se realizan con fragmentos de ADN clonados en un vector (véase cap. 3) Al clonar fragmentos de ADN (en una genoteca), se pueden obtener grandes cantidades de un fragmento puro, pero irremediablemente el orden de los fragmentos se pierde en el proceso de fragmentación y en la formación de la genoteca.

Gran parte del trabajo de mapeado físico consiste en obtener todos los fragmentos posibles y ordenarlos de acuerdo con su posición en el genoma. Con tal objetivo, los mapas de restric-

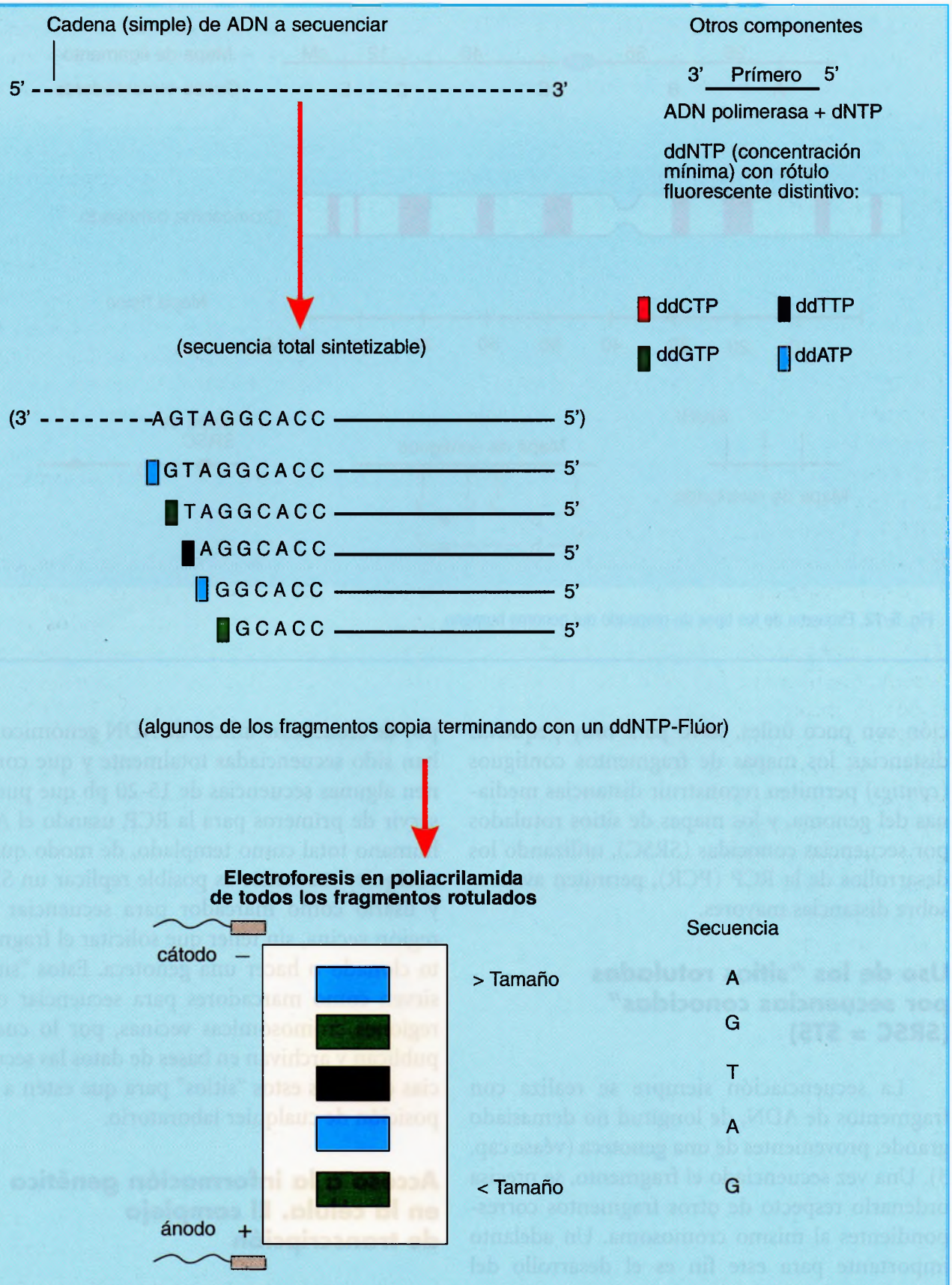


Fig. 5-11 Esquema del fundamento del método de Sanger para secuenciación de ADN. Los colores de fluorescencia son detectados por aparatos automatizados conectados a un ordenador, en el cual un programa determina la identidad de cada uno y escribe la secuencia.

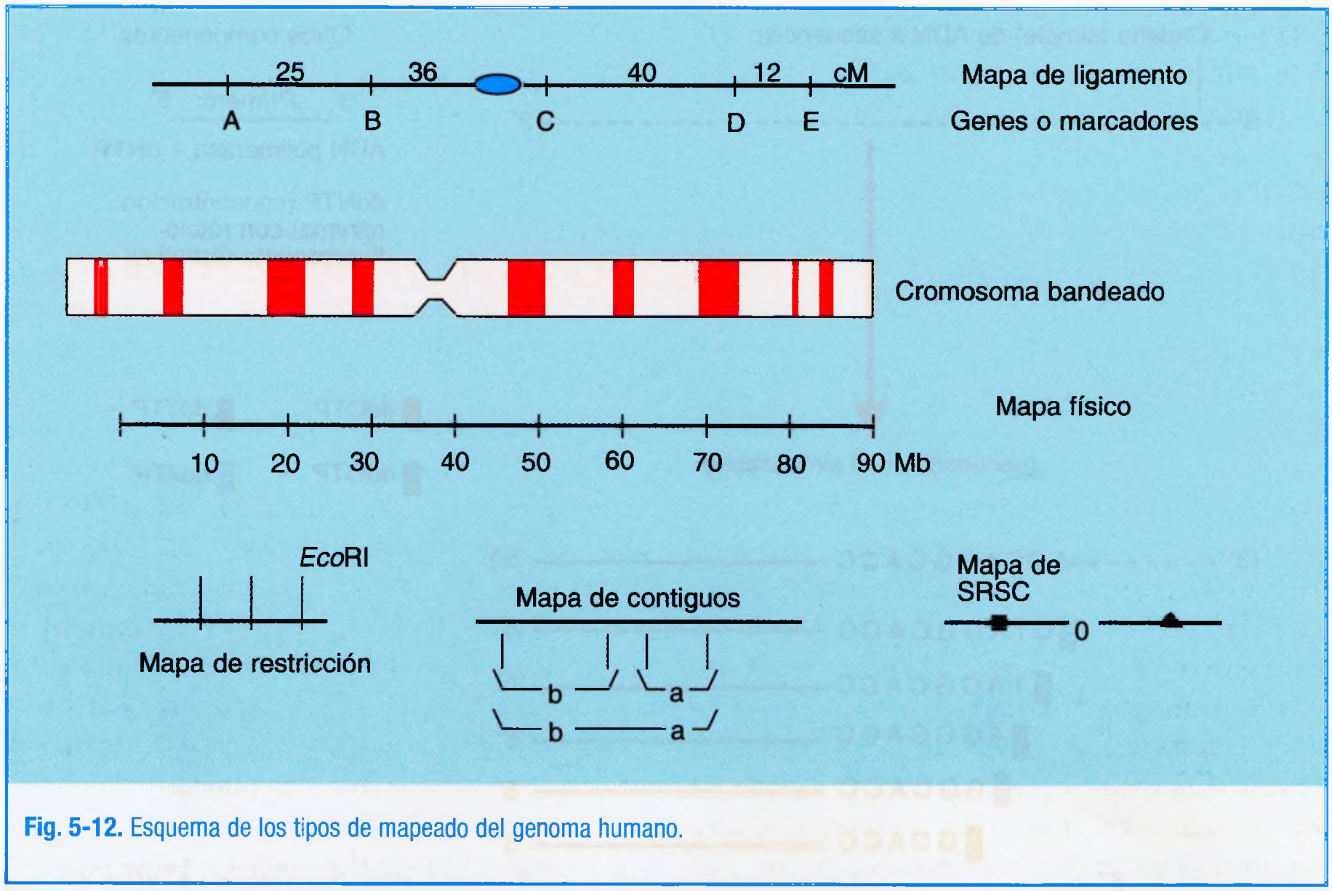


Fig. 5-12. Esquema de los tipos de mapeado del genoma humano.

ción son poco útiles, salvo para muy pequeñas distancias; los mapas de fragmentos contiguos (*contigs*) permiten reconstruir distancias medianas del genoma, y los mapas de sitios rotulados por secuencias conocidas (SRSC), utilizando los desarrollos de la RCP (PCR), permiten avanzar sobre distancias mayores.

Uso de los "sitios rotulados por secuencias conocidas" (SRSC = STS)

La secuenciación siempre se realiza con fragmentos de ADN, de longitud no demasiado grande, provenientes de una genoteca (véase cap. 3) Una vez secuenciado el fragmento, se precisa ordenarlo respecto de otros fragmentos correspondientes al mismo cromosoma. Un adelanto importante para este fin es el desarrollo del método de los "sitios rotulados por secuencias (conocidas)" (STS en inglés), que combina el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP = PCR, véase cap. 3) con la secuenciación. Los SRSC son segmentos cortos (de centenares de pb) de secuencias únicas de ADN genómico que han sido secuenciadas totalmente y que contienen algunas secuencias de 15-20 pb que pueden servir de prímeros para la RCP, usando el ADN humano total como templado, de modo que en cualquier momento es posible replicar un SRSC y usarlo como marcador para secuenciar una región vecina, sin tener que solicitar el fragmento clonado o hacer una genoteca. Estos "sitios" sirven como marcadores para secuenciar otras regiones cromosómicas vecinas, por lo cual se publican y archivan en bases de datos las secuencias de todos estos "sitios" para que estén a disposición de cualquier laboratorio.

Acceso a la información genética en la célula. El complejo de transcripción

Una visión simplista de la célula propondría que ésta funciona en forma análoga a un ordenador, leyendo la información genética en el ADN de acuerdo con instrucciones simples (en un ordenador, dadas por un programa de lectura y

procesadas por un microprocesador) que están determinadas por los equilibrios metabólicos en la célula y la presencia de elementos reguladores de la lectura (represores y activadores) Esta visión es poco aplicable a las células en general y, especialmente, *no es* aplicable a las células eucarióticas. La unidad orgánica es la célula, y de generación en generación hay un puente celular, lo cual implica la presencia de todos los elementos estructurales básicos de una célula ya preformados (membranas, ribosomas y otros elementos citoplasmáticos y nucleares, numerosas proteínas y otras macromoléculas presentes) La lectura de la información genética no se realiza para construirla por primera vez, sino para mantenerla y para desarrollar su futuro, y ese futuro inevitablemente involucra modificaciones en su propia información genética, introducidas por mutación, recombinación y metilación (esta última es una modificación reversible) Por otra parte, la lectura del ADN podría compararse con una memoria que está siendo escrutada permanentemente y al azar, en todas sus partes de manera simultánea, por miles de lectores. Por eso, no es sorprendente que en la célula la lectura exitosa se limite muy cuidadosamente a ciertos sectores de la información contenida en el ADN El aparato de la lectura del ADN se denomina *complejo de transcripción*,[18] y es extraordinariamente sofisticado: abarca como mínimo dos docenas de proteínas (incluida la ARN polimerasa) y, en su forma funcional, abarca un centenar de proteínas (véase más adelante)

Por otra parte, el propio material genético puede estar en diferentes estados de legibilidad, dados por los *factores modeladores o "arquitectónicos" de transcripción* (véase cap. 7) [19] Por consiguiente, el acceso a la información genética del ADN no es directo ni simple, sino restringido y modulado en forma extraordinariamente precisa. Por otra parte, la lectura de la información genética en las células eucarióticas, como las humanas, no da lugar a productos finales disponibles para traducirse en proteínas; a diferencia de los procariontes, la traducción se realiza exclusivamente en el citoplasma y la transcripción en el núcleo, compartimentos separados por la carioteca y con funciones muy diferentes. En el compartimento nuclear, el transcripto inicial (ARN heterogéneo nuclear) sufre una serie de transformaciones importantes, que se denominan "procesamiento" del ARN transcripto (que no tiene equivalente en los procariontes) y donde nuevamente vuelve a regularse de manera cuidadosa la información que podrá, siguiendo su curso, traducirse en polipéptidos.

Las tres ARN polimerasas lectoras de ADN

En las células humanas hay tres ARN polimerasas denominadas I, II y III por su *orden de elución* en una columna cromatográfica cuando se aumenta la fuerza iónica del solvente. Las tres polimerasas se encargan de la transcripción de segmentos muy diferentes de ADN, es la polimerasa II la que se encarga de la transcripción de la información traducible en polipéptidos, mientras que la I y la III se encargan de transcribir segmentos de ADN no traducibles (cuadro 5-2) La ARN polimerasa II también transcribe varios ARN no traducibles (U1 U5)

Cuadro 5-2. ARN polimerasas y sus productos

Tipo	Tamaño (kDa)	Localización	Sensibilidad (a α-amanitina)	Producto
I	~ 500.000	Núcleolo	No	ARN 45S (Pre-ribosómico)
II	> 500.000	Nucleoplasma	+++	ARNhn, ARNm,5 x 10^4 tipos
III	~ 500.000	Nucleoplasma	+	ARNnp, 10^2 tipos

ARNhn: ARN heterogéneo, nuclear.
ARNnp: ARN nuclear pequeño (U6, preARNt, ARN 5S, ARN 7SK, ARN 7SI y otros).

La ARN polimerasa II es la principal encargada de la lectura de la información genética. Consta de 12 subunidades (o polipéptidos) diferentes; dos de ellas, las mayores (214 y 140 kDa), forman el núcleo básico de la enzima, pero las subunidades menores también son necesarias para su actividad. La subunidad mayor, de 214 kDa, denominada subunidad IIa, es la que presenta una relación ancestral con partes de todas las ARN polimerasas, puede estar fosforilada o no dentro de la célula y comprende parte del dominio catalítico de la enzima. Su extremo carboxilo terminal, que posee 26 copias repetidas de un heptapéptido, puede estar fosforilado.[20] La estructura tridimensional de la ARN polimerasa II de levadura fue descrita en 2001, mostrando que el ADN en transcripción queda internalizado entre piezas de este complejo multiproteínico, haciendo un ángulo de casi 90 ° mientras el ARN naciente emerge por un "embudo" inferior.[21]

Estructura del compleja de transcripción: complejos de transcripción basal y funcional

Para *leer* la información genética de los genes humanos es necesaria la organización de un complejo que comprende unas 100 proteínas diferentes,[22] lo cual es una buena evidencia del nivel de sofisticación del acceso a la información genética.

La organización, paso a paso, de semejante complejo de transcripción resultaría lenta e improbable en la célula, por lo cual es razonable esperar que la célula utilice estrategias especiales para construir el aparato transcripcional. Una de las formas de acelerar la construcción de este aparato es tener una parte ya construida permanentemente; esta parte, que comprende un conjunto de factores de transcripción en la levadura, se ha denominado *holoenzima.*[23] Aparte de la formación de asociaciones proteínicas u holoenzi mas, la vía más general utilizada en las células humanas para construir el aparato transcripcional es la existencia de dos niveles en los complejos de transcripción: el complejo de *transcripción basal*, que permite sólo una tasa pequeña y uniforme de transcripción, y el complejo de *transcripción funcional*, que permite una tasa mucho mayor de transcripción y además posee las facultades de acelerarla o retrasarla, a través de la interacción con las secuencias de ADN "intensificadoras" y "silenciadoras" [22]

El complejo de transcripción basal consta de la ARN polimerasa II (12 subunidades) y de un grupo de proteínas llamadas *factores de transcripción tipo II* (FTII) e identificadas por letras: FTIIA, FTIIB, FTIID, FTIIE, FTIIF y FTIIH, de los cuales el FTIID es el más complejo y el primero en actuar en la transcripción. En realidad, el factor D está compuesto, por un lado, por la proteína que reconoce y se une a la caja TATA del promotor génico, que se llama *proteína ligadora de TATA* (PLT=TBP), y por otro lado, está compuesta por un *grupo* de proteínas, llamadas "factores asociados a TATA" (FAT = TAFs) o "co-activadores"; en el complejo basal sólo está representada la primera parte, o sea la PLT (fig. 5-13).

La proteína ligadora de TATA es una de las más *conservadas* entre los eucariontes; tiene una forma espacial de horqueta o silla de montar, cuya cara cóncava se asocia al ADN en su secuencia TATA, a través de la hendidura menor del ADN, y es la primera interacción que inicia el proceso de transcripción. En el ADN, la secuencia TATA aparece en la región proximal del promotor del gen, en las posiciones –20 a –30 en los organismos superiores; además, hay secuencias distales del promotor· la CAAT, entre las posiciones –50 y –100, y las secuencias CG, que contienen citosina no metilada (aunque no deben confundirse con las "islas CpG", véase antes) Hay genes, especialmente los de mantenimiento, que tienen una tasa baja y constante de transcripción en todos los tipos celulares, que no tienen secuencia TATA, sino varias secuencias CG y cuyo control de transcripción es menos conocido.

El factor FTIIA no es esencial para la transcripción basal, pero acentúa la estabilidad de la unión TATA-PLT. El factor B tiene dos dominios: uno se une a la PLT y el otro se une a la ARN polimerasa II (Pol II), aunque esta unión es mediada probablemente por el factor F. Este factor F consta de dos subunidades, de las cuales la menor tiene elevada afinidad y se une a la Pol II.

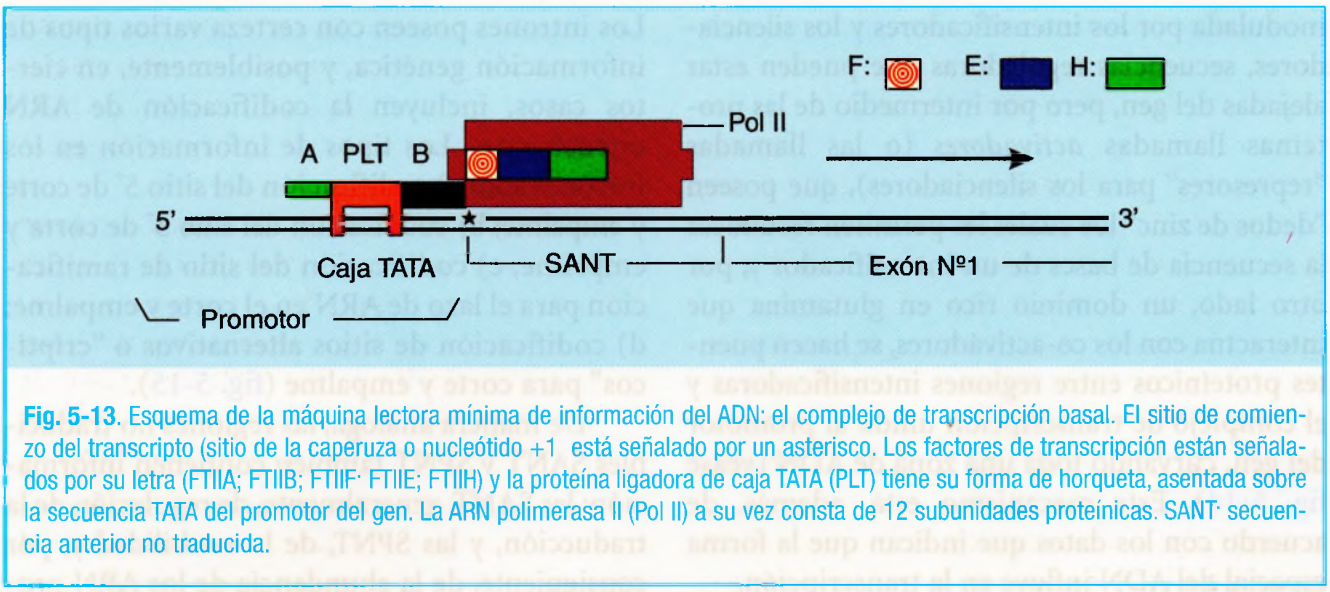


Fig. 5-13. Esquema de la máquina lectora mínima de información del ADN: el complejo de transcripción basal. El sitio de comienzo del transcripto (sitio de la caperuza o nucleótido +1 está señalado por un asterisco. Los factores de transcripción están señalados por su letra (FTIIA; FTIIB; FTIIF· FTIIE; FTIIH) y la proteína ligadora de caja TATA (PLT) tiene su forma de horqueta, asentada sobre la secuencia TATA del promotor del gen. La ARN polimerasa II (Pol II) a su vez consta de 12 subunidades proteínicas. SANT· secuencia anterior no traducida.

El factor E es un tetrámero de 2 polipéptidos, que se une al factor H. Este último tiene actividad fosforilante y además, por su actividad de helicasa, interviene en la actividad reparadora de ADN asociada con la transcripción;[24] como tal tiene relación con el síndrome de Cockayne y el xeroderma pigmentoso (véase cap. 8)

El complejo de transcripción funcional es el que se presume presente in vivo (fig. 5-14) En este complejo, la maquinaria de lectura está

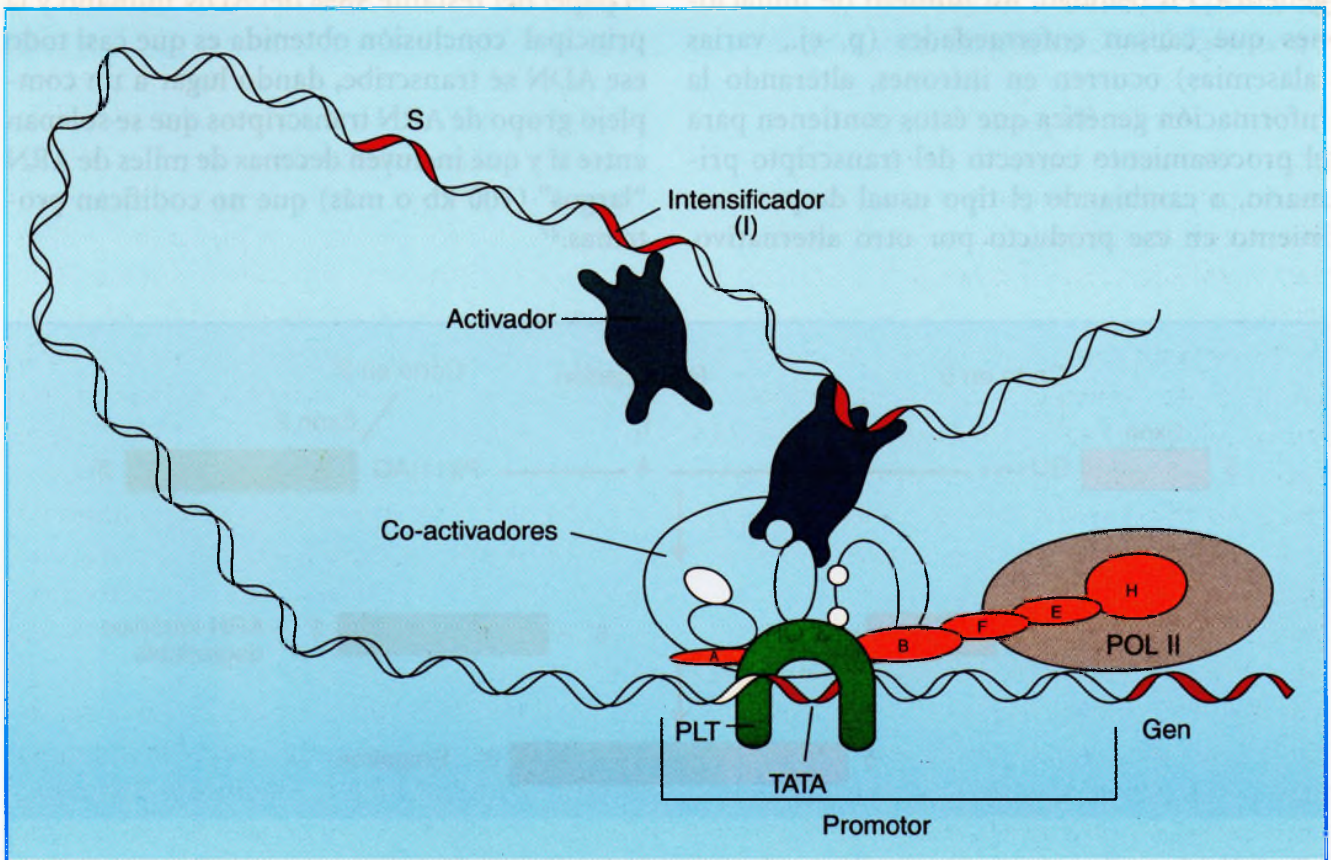


Fig. 5-14. Esquema del aparato de lectura funcional del ADN: complejo de transcripción funcional. Los intensificadores (I) o silenciadores (S) interactúan con el complejo de transcripción a través de los "activadores" (A) que se unen a los co-activadores (co-A) en el complejo.[22]

modulada por los intensificadores y los silenciadores, secuencias reguladoras que pueden estar alejadas del gen, pero por intermedio de las proteínas llamadas *activadores* (o las llamadas "represores" para los silenciadores), que poseen "dedos de zinc" los cuales les permiten reconocer la secuencia de bases de un intensificador y, por otro lado, un dominio rico en glutamina que interactúa con los co-activadores, se hacen puentes proteínicos entre regiones intensificadoras y el complejo de transcripción unido al promotor del gen, curvando toda una zona de ADN (véase fig. 5-14) Este mecanismo está, además, de acuerdo con los datos que indican que la forma espacial del ADN influye en la transcripción.

La información genética durante el procesamiento del ARN

Aunque los intrones de un gen no contienen codificación para aminoácidos, sería erróneo suponer que no contienen información genética. En realidad, un número de mutaciones que causan enfermedades (p. ej., varias talasemias) ocurren en intrones, alterando la información genética que éstos contienen para el procesamiento correcto del transcripto primario, o cambiando el tipo usual de procesamiento en ese producto por otro alternativo. Los intrones poseen con certeza varios tipos de información genética, y posiblemente, en ciertos casos, incluyen la codificación de ARN estructurales. Los tipos de información en los intrones son: a) codificación del sitio 5' de corte y empalme; b) codificación del sitio 3' de corte y empalme; c) codificación del sitio de ramificación para el lazo de ARN en el corte y empalme; d) codificación de sitios alternativos o "crípticos" para corte y empalme (fig. 5-15)

De manera análoga, las regiones no traducibles SANT y SPNT también contienen información. las SANT, generalmente, de regulación de la traducción, y las SPNT, de la estabilidad y, por consiguiente, de la abundancia de los ARN producidos.

ARN no codificantes de proteína

Como se dijo más arriba, menos del 2% del ADN humano corresponde a genes codificantes de proteínas. Por consiguiente, se ha analizado el papel del restante 98% del ADN humano y la principal conclusión obtenida es que casi todo ese ADN se transcribe, dando lugar a un complejo grupo de ARN transcriptos que se solapan entre sí y que incluyen decenas de miles de ARN "largos" (100 kb o más) que no codifican proteínas.[27]

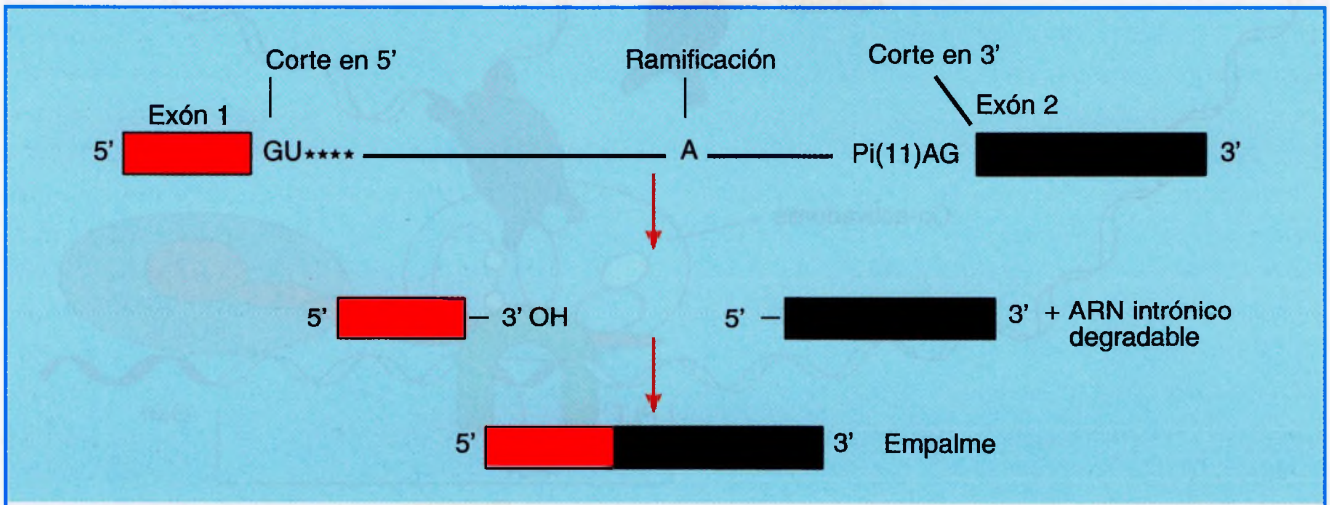


Fig. 5-15. Información contenida en intrones. A: adenosina atacante de la unión en el sitio 5' de corte-empalme. Pi: pirimidinas previas al final del intrón. Las cuatro bases siguientes a las primeras dos del intrón (señaladas por asteriscos) codifican una señal consenso AAGU, reconocible por el empalmosoma, que si es mutada afecta el procesamiento.(El empalmosoma (del inglés *spliceosome*) es el complejo de proteínas y ARN intranucleares involucrado en el empalme).

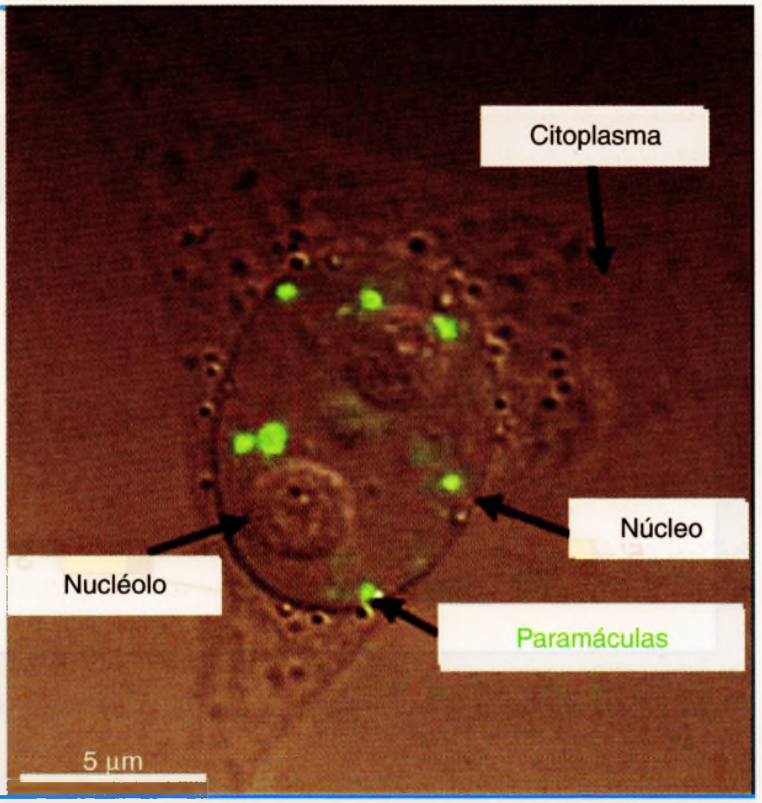


Fig. 5-16. Paramáculas (*paraspeckles*) en el interior de una célula humana viva en cultivo. Una proteína específica de las paramáculas está rotulada con la proteína verde fluorescente, con la cual se identifican media docena de estos corpúsculos intranucleares relacionados con la transcripción y con los ARN no codificantes de proteínas. (de Wikipedia))

Aunque el papel funcional de la mayor parte de estos ARN es desconocido, se ha demostrado su funcinalidad en un número de casos, que es principalmente de regulación de la función de otros genes.[27] Muchos genes convencionales tienen transcriptos complementarios, derivados de la cadena que no es molde. Estos transcriptos de antisentido interactúan con el ARN transcripto del gen, hibridando con partes de éste y pueden bloquear el reconocimento de exones en un empalmosoma, de modo que pueden modular un empalme alternativo para el gen convencional (panel 5-2) También, al hibridar, pueden generar una señal reconocible por el aparato de degradación, "dicer" o trozador (véase cap. 7), de modo de silenciar efectivamente al gen convencional. Adicionalmente, se ha comprobado que algunos ARN largos no codificantes creados en regiones intergénicas se extienden hasta los promotores de genes convencionales. Estos ARN parcialmente complementarios de un promotor de un gen convencional pueden actuar ya sea impidiendo su transcripción por ocupar el lugar del promotor, o también, paradójicamente facilitando la transcripción del gen al inducir una remodelación de la cromatina por su propia transcripción (sin llegar a ocupar el lugar del promotor) Finalmente, un tercer mecanismo funcional de estos ARN no codificantes (ncARN) es su ligamiento específico a proteínas. Este último mecanismo parece estar muy extendido, por la gran frecuencia de complejos ARN-proteína del espacio intranuclear. Mediante este último mecanismo los ncARN modulan la actividad de muchas proteínas, intervienen en el fenómeno de impronta genómica, reclutan proteínas para depositarlas sobre secuencias "blanco" del ADN, intervienen en los fenómenos de interferencia de ARN (véase cap. 7) y sirven, además, como elementos estructurales de los corpúsculos intranucleares llamados "paraspecles" o paramáculas, que son pequeños (0,1 a 1 µm de tamaño) corpúsculos visibles en los núcleos en interfase "in vivo" que contienen ribonucleoproteínas, y cuyo papel no es aún bien conocido (fig. 5-16)

Panel 5-2. El empalme alternativo de los transcriptos primarios y sus efectos

Panel

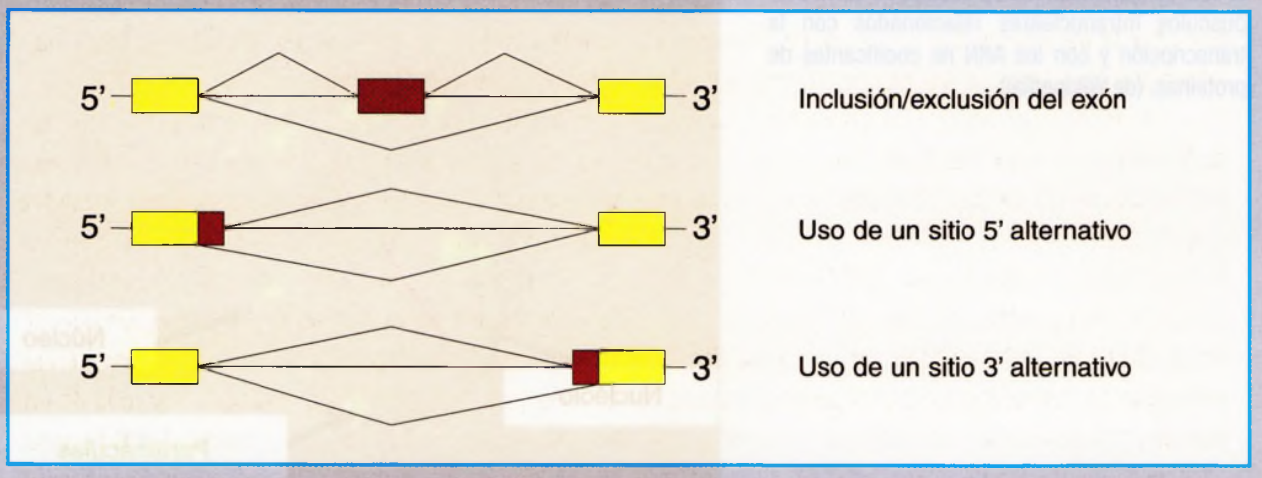


Fig. 1. Consecuencias de empalmes alternativos. Las líneas superiores señalan los empalmes "normales" y las inferiores los alternativos.

Se ha constatado un número cada vez mayor de genes humanos cuyos transcriptos primarios pueden ser empalmados en más de un ARNm (véase texto principal). Esto da como resultado que el número de ARNm, es decir el número de secuencias expresadas de ARN, sea mayor que el número de genes[25]. Entre el 95 % y el 100 % de los genes humanos que constan de dos o más exones pueden sufrir empalme alternativo.[28] De esta manera se estima que el número de polipéptidos diferentes que puedan ser traducidos en el organismo humano a partir de los aproximadamente 23.000 genes codificantes de proteínas, mediante este mecanismo, es mayor de 100.000.[28] No solamente el empalme es una fuente de variación de los transcriptos, puesto que también las señales de poliadenilación pueden ocasionar sitios alternativos de corte y poliadenilación en alrededor del 25% de los genes humanos.[25] Aparentemente, son los genes involucrados en la transducción de señales (receptores y otros) y regulación los que presentan con mayor frecuencia empalmes alternativos.[25] Los mecanismos por los cuales el empalme puede variar no son completamente conocidos, pero las interacciones de los complejos ribonucleoproteicos U1 en el sitio 5' de empalme y el factor auxiliar U2 en el sitio de empalme 3' probablemente determinan las longitudes preferidas de exones que resultan del proceso, a través de límites espaciales (o geométricos) que imponen al proceso de empalme.[25] Surge de esto, nuevamente, que la información genética del ADN está finalmente condicionada por proteínas y ARN.

El empalme alternativo también puede originarse en mutaciones que afectan los "marcos" de los intrones y que determinan la activación de *sitios crípticos* de empalme.[26] Estos sitios crípticos son normalmente sitios del intrón o de un exón que no son usados como señal de empalme, pero que en caso de anularse el sitio vecino de empalme, pueden actuar con igual eficacia que los sitios usuales. Las consecuencias del empalme alternativo (fig. 1) pueden ser, en el caso de que sus productos sean normales, la exclusión o la inclusión de exones en el transcripto, o la modificación del final de un exón (sitio alternativo 5') o del inicio de un exón (sitio alternativo 3'). En caso de que resulten productos anormales, se consideran *mutaciones productoras de empalme anormal*, y esto generalmente conduce a la producción de proteínas truncadas, o a la exclusión de exones (salteamiento de exones) con la consiguiente pérdida de uno o más dominios en la proteína final.

RESUMEN

La información genética está depositada en el ADN, que por su estabilidad y condiciones de codificación garantiza su permanencia. Usualmente esa información se traslada a ARN por la *transcripción*, y de éste a proteína por la *traducción*. Sin embargo, hay información genética no transcriptible (p. ej., los promotores) y hay información genética no traducible, de tipo estructural (ARNr) o funcional (ARNnp).

La *información* es un concepto inverso al del azar; la cantidad de información que contiene un suceso es la inversa de la probabilidad matemática de que ocurra ese suceso entre todos los posibles. El contenido informativo de un suceso está relacionado con el ordenamiento necesario para alcanzar el suceso (o entropía negativa). El contenido informativo del ADN humano se calcula en más de 10^{12} bits de información. Código es la convención por la cual una señal informativa se convierte en otro tipo de señal, conservando la información. El código genético consiste en tripletes de bases de ácido nucleico que contienen la información para la ubicación de un aminoácido en una proteína. El código genético es casi universal para los organismos, con la excepción de las mitocondrias; no posee signos de puntuación y es degenerado, es decir que hay más de un triplete por aminoácido. Un *codón* es un triplete de ARNm, que es reconocido por un *anticodón* de ARNt; pero el reconocimiento no es absoluto, porque la primera base del anticodón, por su balanceo, admite aparearse con varios tipos de bases en la tercera posición del codón. El *marco de lectura* es el triplete inicial codificante del primer aminoácido; está muy precisamente señalado por un único triplete (AUG en el ARNm) y por una señal previa, la "caperuza" en el extremo 5' del ARNm. Este marco es "abierto" cuando la secuencia que le sigue no contiene por un largo trecho ningún codón de terminación. Desde el punto de vista molecular, un gen se define como un segmento de ADN que contiene una unidad transcripcional funcional y sus secuencias reguladoras próximas. En la especie humana se calcula que hay 23.000 genes de proteínas y varios miles más de genes de ARN. Cada gen comprende "exones" traducibles e "intrones" no traducibles, una región anterior no traducible (SANT) y una posterior (SPNT) con la señal de poliadenilación, y, además, la región promotora cercana y los intensificadores o silenciadores más lejanos. La secuenciación total del genoma humano se comenzó en 1990, usándose principalmente el método de Sanger automatizado. Los mapas "físicos" de cromosomas son mapas de bases de ADN y pueden ser principalmente mapas de restricción, de segmentos contiguos o de sitios rotulados por secuencias conocidas (SRSC). La lectura del ADN en la célula se hace por "complejos de transcripción"; el que corresponde a los genes traducibles, en su forma funcional, comprende 100 proteínas, incluida la ARN polimerasa II, y está sujeto a una regulación sofisticada, dada por los elementos reguladores del ADN y mediada por los activadores, co-activadores y factores de transcripción basal. La información genética del transcripto primario es procesada durante el "procesamiento" del ARNhn, siendo necesarias la información contenida en los intrones y la maquinaria de corte y empalme.

REFERENCIAS

1 Cech TR. RNA as an enzyme. Sci Amer 1986; 253:51-59.

2. Gesteland RF Atkins JF (eds.). The RNA World. Coid Spring Harbor Laboratory Press, C. S. Harbor, 1993.
3. Hohn MJ, Park H-S, O'Donoghue P Schnitzbauer M, and So D. Emergence of the universal genetic code imprinted in an RNA record. Proc Nat Acad Sci 2006; 103:18095-180100
4. Holzmüller W. Information in biological systems: the role of macromolecules. Cambridge University Press, Cambridge, 1984.
5. Grivell LA. Mitochondrial DNA. Sci Amer 1983; 248:60-73.
6. Goad WB. Computational analysis of genetic sequences. Ann Rev Biophys Chem 1986; 15:79-95.

7 Brendel V, Busse HG. Genome structure described by formal languages. Nucl Acids Res, 1984; 12:2561-2568.

8. Fields C, Adams MD, White O, Craig Venter J. How many genes in the human genome? Nature Genetics 1994; 7:345-346.
9. Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hamonds G Jr., Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor Vill gene. Genomics 1990; 7·1 11
10. Gingeras TR. Origin of phenotypes: genes and transcripts. Genom Res 2007· 17:682-690.
11 Carninci P Hayashizaki Y. Noncoding RNA transcription beyond annotated genes. Curr Op Genet Develop 2007· 17·139-144.
12. Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, et al. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. Genom Res 2007 17:669-681
13. Craig IW. Organization of the human genome. J Inher Metab Dis 1994; 17:391-402.
14. Bird AP CpG island as gene markers in the vertebrate nucleus. Trends in Genetics 1987· 3:342-347
15. Marshall E. Human Genome project: Emphasis turns from mapping to large-scale squencing. Science 1995; 268:1270-1271
16. Goffeau A et al. Life with 6.000 genes. Science 1996; 274:546-567
17 Smith LM. Automated DNA sequencing and the analysis of the human genome. Genome 1989; 31:929-937
18. Buratowski S. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. Cell 1994; 77·1-3.
19. Wolffe AP Architectural transcription factors. Science 1994; 264:1100-1101
20. Corden JL. RNA polymerase II transcription cycles. Current Opinion in Genetics and Development 1993; 3:213-218.
21 Klug A. A marvellous machine for making messages. Science 2001 292:1844-1846.
22. Tjian R. Molecular machines that control genes. Sci Amer 1995; 272:38-45.
23. Carey M. Transcription: simplifying the complex. Nature 1994; 368:402-403.
24. Buratowski S. DNA repair and transcriptiion: the helicase connection. Science 1993; 260:37-38.
25. Modrek B, Lee C. A genomic view of alternative splicing. Nat Genet 2002; 30:13-19.
26. Mount SM. Genomic sequence, splicing and gene annotation. Am J Hum Genet 2000; 67:788-792.
27 Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. Genes Develop 2009; 23: 1494-1504.
28. Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. Nature 2010;463:457-463.

Capítulo 6

La organización del genoma humano

Repartición del genoma en los cromosomas. Localización de las secuencias de ADN. Definición y denominación de los genes humanos. Características globales del genoma. Variantes: SNP Repeticiones. El proteoma humano. Microarreglos. Tipos de microarreglos y sus usos

INTRODUCCIÓN

La concreción del Proyecto Genoma Humano en 2003 permite, por primera vez, describir las características generales del genoma (conjunto de la información genética) de la especie humana.[1,2]

Existe un consenso acerca de que esta etapa, es decir el completamiento de la secuen ciación del ADN humano, no es sino la base necesaria para traducir toda esa gran masa de datos de secuencias de ADN, en conocimientos biológicos funcionales, muchos de ellos aplicables en Medicina. El paso inmediato posterior es la descripción completa del conjunto de proteínas capaces de ser producidas por las células humanas, es decir el *proteoma* humano. Este paso es indudablemente más complejo y laborioso, y requerirá más tiempo que los quince años dedicados para el desarrollo del Proyecto Genoma Humano. En realidad, lo que se ha concluido es meramente la *enumeración de la secuencia* de bases a lo largo de las moléculas de ADN de los 23 cromosomas humanos, lo cual ha sido un proyecto tecnológico de gran envergadura, costo (unos 3.000 millones de dólares) y tiempo, pero aún quedan muchos interrogantes acerca del significado funcional de estas secuencias, como lo demuestra la dificultad en determinar el número exacto de genes en nuestro genoma, que en forma aproximada es de 25.000, pero cuya exactitud sigue discutiéndose. Como se vio en el capítulo anterior, la atención estaba enfocada exclusivamente en los genes de proteínas, y actualmente se sabe que los genes humanos de proteínas son solamente 22.726 en el año 2009 En las diferentes bases de datos del genoma humano hay pequeñas diferencias al respecto. Es relevante informar acerca de un resumen de una de las principales bases de datos del genoma humano, la de Gene Cards (http://www.genecards.org/index.shtml), porque revela las proporciones de cada tipo de elemento genómico (los datos corresponden a principios de 2009) (cuadro 6-1)

Es decir que los *estudios genómicos* no han concluido con la secuenciación final del ADN Una parte importante de esta disciplina *genómica* (estudio del conjunto de genes de un organismo) es la *genómica comparada*, que es el análisis comparado de las secuencias de ADN de organismos modelo en los cuales se conoce toda o una parte sustancial de la secuencia total. Esto es de gran utilidad cuando se encuentran *secuencias conservadas* en diferentes organismos, que indican que esas secuencias son necesariamente funcionales e importantes. Los organismos eucariontes *modelo* hasta el año 2001 están enumerados en el cuadro 6-2.

Cuadro 6-1. Proporciones de cada elemento del genoma en la base de datos de Gene Cards

Categoría génica	Número de fichas individuales
Genes de proteínas	22.460
Pseudogenes	9.310
Genes de ARN	10.086
No categorizados	9.962

Es visible que el tamaño del ADN no tiene relación con la cantidad de genes (de proteínas) y que tampoco el número de genes de proteínas es un indicador de la complejidad del organismo. Por otra parte, la cifra consignada para genes es esencialmente provisoria hasta que todos los elementos del genoma sean caracterizados por completo.

El reducido número de genes de proteína de la especie humana (alrededor de 22.000) no significa un idéntico número de proteínas; dadas la frecuencia de empalmes alternativos en muchos genes y la variedad de procesamiento postraduccional de ciertas proteínas, el número de diferentes proteínas que componen el proteoma humano se ha estimado que es mucho mayor, y probablemente alrededor de 1.000.000. Estas complejidades explican que el proceso de *anotamiento* (así se denomina a la localización exacta de cada secuencia codificante de genes y su función) de las secuencias de ADN, que se pretendía publicar junto a las secuencias, esté sólo terminado en una minoría de ellas.

Con la acumulación de grandes números de datos de secuencias ha surgido una disciplina que trata de clasificar, ordenar, archivar y presentar informaciones genéticas a los investigadores y al público: la *bioinformática*. Esta disciplina tiene gran importancia en Medicina, puesto que el acceso a los datos actuales de la genética molecular se hace mediante los métodos desarollados por la bioinformática. Las *bases de datos* son hoy esenciales para adquirir información genética a través de Internet. Posiblemente la mayor base de datos es la del NCBI (Instituto Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview; otra muy útil es la citada base de datos de Gene Cards: http://www.genecards.org/index.shtml.

Por otra parte, con el desarrollo del Proyecto Genoma Humano (PGH), se planificó como uno de los objetivos, el impacto social, legal y ético de los nuevos avances de la Genética. Este objetivo es tratado por el programa "ELSI", parte del Proyecto. Sin embargo, los adelantos en la Bioética han sido menos significativos que los de ciencia básica y son especialmente poco conocidos en los países menos desarrollados.

Cuadro 6-2. Organismos "modelo" entre los eucariontes, usados frecuentemente en la comparación de secuencias de ADN y su organización (genómica comparada). El ratón (*Mus musculus*) y la especie humana tienen igual número de genes y tamaño de ADN, y sólo el doble de la mosca *Drosophila*.

ORGANISMOS EUCARIONTES CON GENOMA SECUENCIADO

Organismo	Tamaño (ADN)	Fecha de secuencia	Nº de genes de proteína
S. cerevisiae (levadura)	12,1 Mb	1996	6.034-6.100
Caenorhabditis elegans	97 Mb	1998	19.100 (aprox.)
Arabidopsis thaliana	100 Mb	2000	25.498
D. melanogaster	180 Mb	2000	13.000
Mus musculus	3.000 Mb	2003	22,011
Homo sapiens s.	3.000 Mb	2003	22.726

La descripción minuciosa del patrón de bandas de cada cromosoma humano, que fue hecha por los citogenetistas durante las últimas décadas del siglo XX, así como la localización de secuencias marcadas (con un marcador que finalmente se revela por fluorescencia) en cada sector de los cromosomas, han sido muy útiles para la secuenciación y en el mapa actual usualmente se comienza justamente por la localización citogenética.

Repartición del genoma (ADN) en los cromosomas

El ADN secuenciado se corresponde con una molécula de ADN por cada uno de los 22 *autosomas* (cromosomas no sexuales) y también la molécula de ADN del cromosoma X y la del cromosoma Y (adicionalmente, hay un pequeño ADN propio de las mitocondrias, ADNmt) La longitud del ADN (o su cantidad en millones de bases, abreviado Mb) es aproximadamente proporcional al tamaño de cada cromosoma (cuadro 6-3)

Aparte de su localización en uno de los cromosomas, una secuencia génica de ADN puede colocarse en cualquiera de las dos cadenas, y dado que éstas son antiparalelas y el *sentido* (u orientación) de un gen es siempre de 5' hacia 3', se debe establecer si la secuencia está en la cadena *positiva* (sentido 5'-3' hacia el centrómero, comenzando por el extremo del brazo corto) o en la cadena *negativa* (sentido 5'-3' comenzando por el extremo del brazo largo) Además debe establecerse cuántos exones (y de qué longitud es cada uno de ellos) contiene el gen (también debe establecerse el tamaño de sus intrones) Los genes humanos son muy variables en la longitud de ADN que ocupan (ADN *genómico*, por oposición al ADNc, que es siempre compacto por ser la copia del ARNm), por ejemplo, el gen de la distrofina (DMD, de la distrofia muscular de Duchenne-Becker) ocupa más de 2 Mb en el cromosoma Xp21.3 y tiene 79 exones, pero su ADNc tiene solamente 14 kb.[5] Por otro lado, el gen *SRY* (determinante del sexo) en el cromosoma Y ocupa sólo 2,2 kb y tiene un solo exón (véase el capítulo de determinación sexual) Además es necesario precisar los puntos que determinan el *empalme*, no sólo los inicios y terminaciones de intrones, por cuanto es muy común que existan localizaciones de empalmes alternativos (el citado gen de la distrofina, DMD, es un buen ejemplo de esto, con un mínimo de 8 empalmes alternativos) Cuando están determinados los exones, es posi-

Cuadro 6-3. Tamaño en megabases (MB) del ADN de cada cromosoma humano.[3,4]

Cromosoma	Tamaño del ADN en Mb
1	263
2	255
3	214
4	203
5	194
6	183
7	171
8	155
9	145
10	144
11	144
12	143
13	114
14	109
15	106
16	98
17	92
18	85
19	67
20	72
21	50
22	56
X	164
Y	59
TOTAL	3.286

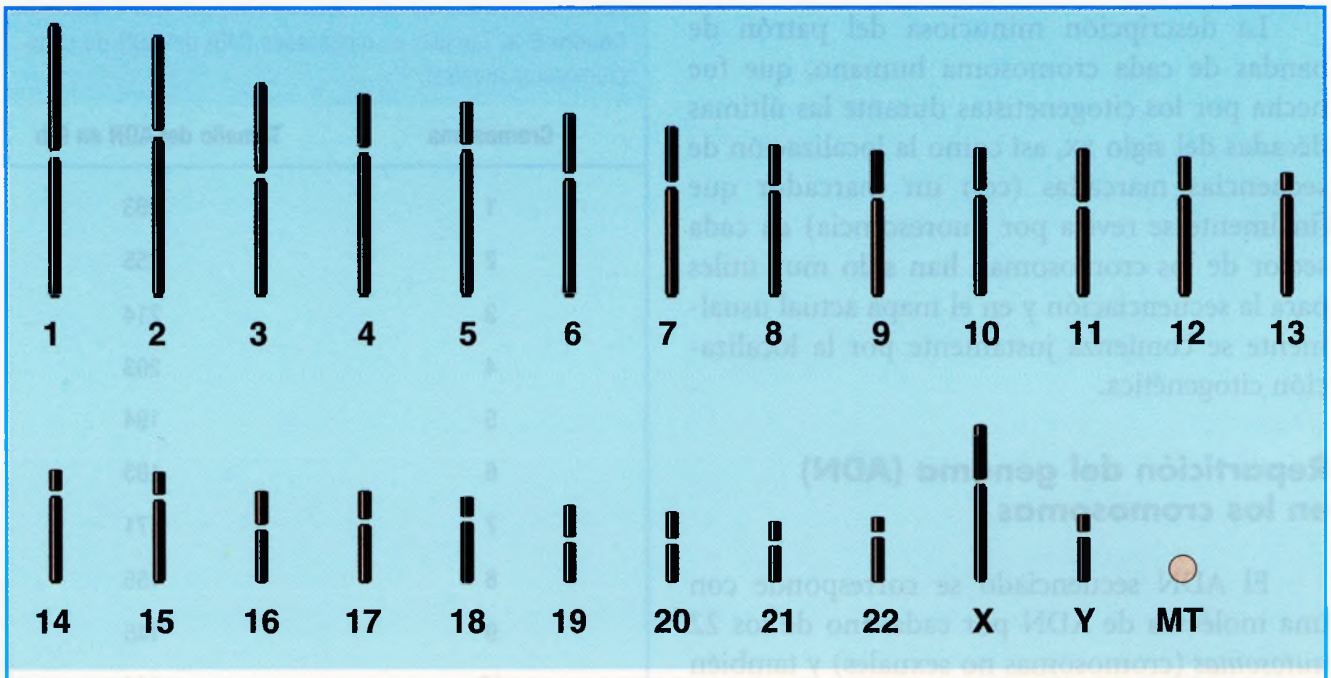


Fig. 6-1 Gráfico de los 22 autosomas, los cromosomas X e Y y el ícono del ADN mitocondrial. El número correspondiente (en negro) es un "vínculo" que en Internet se dirige al "sitio" del correspondiente cromosoma. (Gráfico del sitio "Mapview" de la base de datos del NCBI; véase el texto).

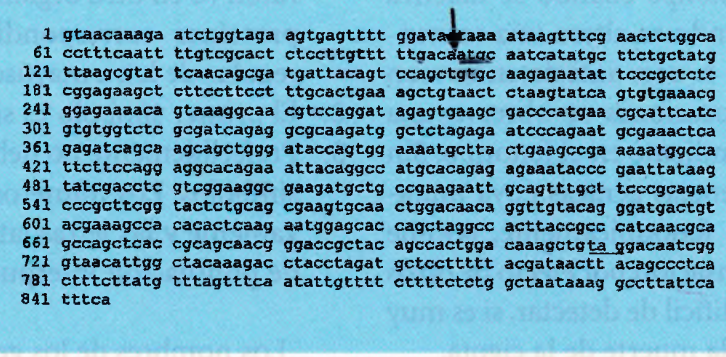
ble, mediante el código genético, predecir la secuencia de aa de la *proteína codificada*. Con dicha secuencia, se debe buscar si coincide, aun que sea parcialmente, con las secuencias de segmentos de otras proteínas conocidas. A partir de esos "dominios" homólogos a los de una proteína conocida, algunas veces es posible sugerir un papel funcional de la proteína buscada. Todas estas informaciones y otras de carácter exclusivamente técnico se encuentran en bases de datos accesibles por Internet.

Localización de las secuencias de ADN en los cromosomas humanos. El visor del mapa (génico)

Actualmente se puede buscar la localización de un gen humano y su estructura en la base de datos oficial estadounidense "Entrez" del NCBI, accesible sin cargo por Internet. Una de las formas más prácticas es a través del "Visor del mapa" (*Map Viewer*), al que se accede en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi.

En dicho sitio se encuentra el esquema de los 22 autosomas, los cromosomas X e Y y un símbolo del genoma mitocondrial. El número de cada cromosoma es un *vínculo* (*link*) con el cual se accede en particular a cada uno (fig. 6-1).

En el *visor del mapa* cuando se señala un cromosoma determinado, aparecen el esquema de bandas de dicho cromosoma y luego los genes en su orden ya establecido, y muchos otros detalles. Cada zona que va a visualizarse puede ser expandida en grados sucesivos, hasta mostrar la estructura en exones e intrones de cada gen. La secuencia de bases específica de cada exón o cada región también se muestra en un vínculo ("seq") Haciendo señal con el ratón del ordenador en el nombre abreviado (sigla) del gen, se visualizan datos sobre su ARNm, un pequeño resumen de la proteína codificada, las mutaciones reconocidas y otros datos. Por consiguiente, para poder iniciar una búsqueda en el mapa del genoma humano es conveniente saber la sigla correcta del gen de interés, aunque en muchas ocasiones es suficiente conocer el nombre correcto de la enfermedad o síndrome corres-



```
  1 gtaacaaaga atctggtaga agtgagtttt ggatagtaaa ataagtttcg aactctggca
 61 cctttcaatt ttgtcgcact ctccttgttt ttgacaatgc aatcatatgc ttctgctatg
121 ttaagcgtat tcaacagcga tgattacagt ccagctgtgc aagagaatat tcccgctctc
181 cggagaagct cttccttcct ttgcactgaa agctgtaact ctaagtatca gtgtgaaacg
241 ggagaaaaca gtaaaggcaa cgtccaggat agagtgaagc gacccatgaa cgcattcatc
301 gtgtggtctc gcgatcagag gcgcaagatg gctctagaga atcccagaat gcgaaactca
361 gagatcagca agcagctggg ataccagtgg aaaatgctta ctgaagccga aaaatggcca
421 ttcttccagg aggcacagaa attacaggcc atgcacagag agaaataccc gaattataag
481 tatcgacctc gtcggaaggc gaagatgctg ccgaagaatt gcagtttgct tcccgcagat
541 cccgcttcgg tactctgcag cgaagtgcaa ctggacaaca ggttgtacag ggatgactgt
601 acgaaagcca cacactcaag aatggagcac cagctaggcc acttaccgcc catcaacgca
661 gccagctcac cgcagcaacg ggaccgctac agccactgga caaagctgta ggacaatcgg
721 gtaacattgg ctacaaagac ctacctagat gctccttttt acgataactt acagccctca
781 ctttcttatg tttagtttca atattgtttt cttttctctg gctaataaag gccttattca
841 tttca
```

Fig. 6-2. Secuencia completa de las bases del ADNc del gen determinante del sexo *SRY* Generalmente es más práctico buscar la secuencia del ADNc y no la del ADN genómico (el que está en el cromosoma). El gen *SRY* es muy pequeño y consta de un solo exón, de modo que su región codificante es pequeña y puede observarse con facilidad. Los números a la izquierda indican las bases que comienzan en cada renglón, dividido en sectores de diez bases. El ADNc de este gen tiene 845 bases, que codifican los 204 aa de la proteína reguladora SRY. Las bases 97-99 son el *codón de iniciación (flecha vertical)* y las bases 709-711 son el *codón de terminación (subrayado).* Las regiones anterior y posterior no traducidas de este gen son de mediana longitud. Las secuencias "en bruto" como la representada, son menos útiles que las secuencias anotadas, en las que se identifican los cuadros de lectura y se coloca la traducción de cada triplete por su aminoácido (en código de una letra). (*Secuencia de "Map Viewer" del NCBI, NIH, Estados Unidos*).

pondiente al gen, o el de la proteína codificada por dicho gen (fig. 6-2)

La definición de un gen en las bases de datos

La indefinición sobre el número exacto de genes humanos, a pesar de haberse concluido la secuenciación del ADN, se origina en los problemas que entraña la definición actual de un gen humano. Esta definición, teniendo en cuenta la creciente trascendencia de los ARN codificados en el genoma que no se traducen en proteínas (ARN estructurales, catalíticos y reguladores, como los productores de interferencia por ARN), debe comprender tanto la codificación de proteínas como de ARN Por consiguiente, se define un gen como *un segmento completo de ADN cromosómico capaz de producir un producto funcionante.* Es importante que se subraye la funcionalidad del producto. Sin embargo, para segmentos de ADN concretos, hay dificultades con esta defini ción. Estas dificultades surgen de la aplicación de varios criterios para definir un gen, que se dan a continuación.[6]

1 La *presencia de un marco abierto de lectura* (MAL, en inglés "ORF") La definición ya vista de un MAL (un codón de iniciación seguido de un número apreciable de codones hasta llegar a uno de terminación) no es fácil de aplicar a genes con muchos y largos intrones. Si se agrega que los empalmes alternativos pueden usar exones encubiertos dentro de intrones grandes, este criterio es difícil de aplicar. El *sesgo* en el uso de los codones (su sucesión no es al azar) puede facilitar el reconocimiento de un gen, pero tampoco es una regla muy eficiente.
2. La *conservación de la secuencia.* Cuando se comparan las secuencias de ADN de dos o más especies no muy alejadas evolutivamente, el hallazgo de secuencias similares es un indicio de la importancia funcional del producto transcripto, generalmente un gen. Sin embargo, pueden no ser genes sino secuencias reguladoras no transcriptas (silenciadores, activadoras, etc.) Por lo tanto, tampoco este criterio comparativo es un criterio completo.
3. La *transcripción de la secuencia.* El análisis de los ADNc da una lista de los genes usados por un determinado tipo celular. Sin embargo, hay secuencias de ADN genómico que aparentan ser genes pero de los cuales no se conoce el ARN transcripto, o no se ha identificado.

4. La *alteración del fenotipo* cuando se inactiva una secuencia. Cuando se altera una secuencia por mutación o con interferencia con ARN, en muchas ocasiones se observa una alteración correspondiente en el fenotipo. Sin embargo, hay secuencias génicas cuya mutación no se expresa fenotípicamente, porque existe cierta compensación por efecto de otros genes, o porque es difícil de detectar, si es muy básica y determina la muerte de la cigota.

La falta de estrictez de estos criterios se concatena con las dificultades creadas por el empalme alternativo que ocurre en casi todos los genes codificantes pluriexónicos humanos (véase cap. 5). Cada una de estas formas alternativas deben ser detectadas, y generalmente son funcionalmente diferentes. Adicionalmente, la distinción entre genes y *pseudogenes* no es fácil, cuando las secuencias son muy similares y son transcriptas. Todas estas complicaciones explican que el número total de genes no esté completamente determinado. Sin embargo, es útil conservar una definición restringida para genes de proteínas, cuyo número total es difícil que se aleje del mencionado (22.700 aproximadamente) y genes o elementos génicos en general, que suman varias decenas de miles de elementos del genoma humano que se transcriben pero no codifican proteínas.

Denominación de los genes humanos

Los grandes volúmenes de información recogidos por el Proyecto Genoma Humano han obligado a usar normas de *nomenclatura* para genes, secuencias, mutaciones y otros fenómenos. Por otra parte, saber reconocer el gen por su sigla ahorra tiempo y es necesario para su búsqueda en bases de datos. La nomenclatura ha sido propuesta por un comité de la Organización para el Genoma Humano ("HUGO", en inglés) [7] Algunas de las características de las siglas, o abreviaturas de los genes humanos son.

1 Se usan sólo letras mayúsculas en cursiva (la misma sigla, en minúsculas salvo la letra inicial, generalmente indica el mismo gen en el ratón (o en otro organismo modelo) Para las proteínas correspondientes se usa el tipo regular de letra mayúscula (no cursiva)
2. El primer símbolo es siempre una letra.
3. Preferiblemente no debe exceder de 6 letras o símbolos. Los números son arábigos exclusivamente y las letras latinas, sin ningún signo de puntuación interpuesto.

Los nombres de los genes pueden referirse a la función del gen normal, a la enfermedad (o síndrome) causada por su mutación, a la "familia" de genes a la cual pertenece, a la región del cromosoma que se le asigna, o en muchos casos en que se desconoce su función y significado, queda referido como: "C...orf..." en castellano: "marco abierto de lectura número del cromosoma" Muchos genes importantes tienen nombres y siglas explícitos: por ejemplo:

AR (en castellano *RA*) *r*eceptor de *a*ndrógenos;

COL1A1 gen de colágeno tipo *I*, cadena alfa 1,

DMD: distrofia muscular de *D*uchenne (gen de la),

STS: sulfatasa de *e*steroides;

HEXA. hexosaminidasa A, etc.

Para encontrar el nombre correcto de un gen, es aconsejable recurrir a una cualquiera de las dos bases de datos siguientes, en las cuales se puede escribir el nombre de la enfermedad (en inglés) o el de la proteína, y el programa provee los nombres de los genes correspondientes y similares:

1 "Gene cards", en la red de Internet: http://www.genecards.org/index.shtml
2. OMIM ("on line Mendelian inheritance in Man" herencia mendeliana humana en línea) www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/

Características globales del genoma humano: número de genes y número de exones

El análisis del genoma publicado por Craig Venter y 266 coautores,[2] y por E. Lander y otros

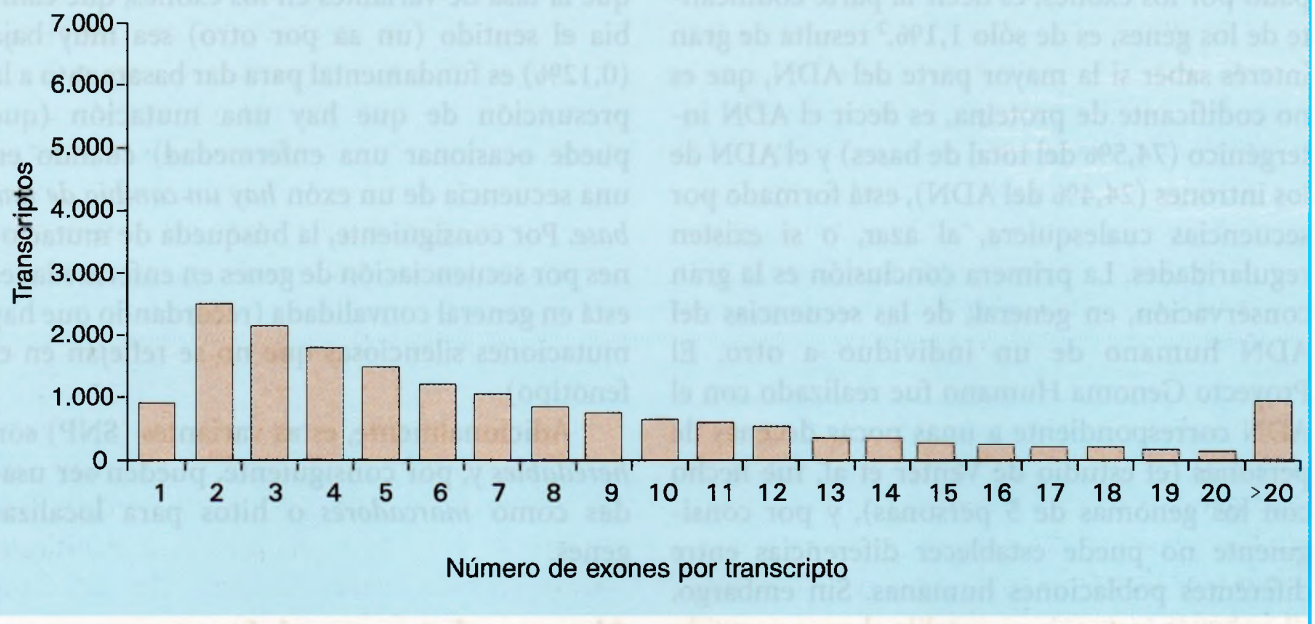


Fig. 6-3. Distribución del número de exones en una población de transcriptos del genoma humano. Las frecuencias mayores corresponden a pocos exones (1 a 4) pero algunos genes poseen más de 20 y aún más de 100 exones (hacia la derecha). Datos de Venter et al., 2001

tantos coautores[3] que ha sido en general validado por otros, encontró 26.383 transcriptos (o genes en principio *anotados*) Actualmente, como se aclaró previamente, el número exacto de genes no está totalmente definido, aunque se estima que el de genes de proteínas oscila alrededor de 22.700, y el rango de error se vuelve cada vez menor. Entre los 26.383 genes (transcriptos) identificados, la distribución del número de exones por cada gen es muy asimétrica: mientras hay un gran número de genes con escaso número de exones (de 1 a 4) hay genes que, en escaso número, pueden llegar a tener más de 100 exones (fig. 6-3). El máximo de exones registrado es 363 para el gen *TTN*, del cromosoma 2q31 1, codificante de la gran proteína *titina* del músculo estriado, que tiene 38.188 aa y un tamaño aproximado a los 4MDa.[8]

La estructura exónica de los genes tiene importancia funcional, porque el incremento en el número de exones aumenta la probabilidad de mutaciones de empalme, que suelen pasar por alto o "saltear" uno o más exones, dando proteí nas anormales o truncadas, no funcionales. El promedio de exones para los genes humanos es de 7,8 exones/gen de acuerdo con uno de los métodos usados.

Por otra parte, el análisis del total del genoma confirma que los sectores ricos en G+C (que se corresponden con bandas G claras o negativas) poseen mayor concentración de genes que los sectores pobres en esas bases (bandas G oscuras). Existen regiones muy pobres en genes, los llamados "desiertos génicos" definidos como segmentos de ADN de más de media megabase, que no poseen un gen. Alrededor del 20% del genoma humano (605 megabases) son *desiertos génicos*. Los cromosomas humanos que presentan mayor proporción de desiertos génicos, y por consiguiente son relativamente pobres en genes, o contienen extensas regiones pobres en ellos, son los cromosomas 4, 13, 18 y el X. Los cromosomas 21 y 22, parecidos en morfología, son muy diferentes en contenido génico: el 22 es rico en genes, mientras el 21 es relativamente pobre. El cromosoma con mayor concentración o riqueza de genes es el 19

Variantes en las secuencias de bases del ADN humano. "SNP": polimorfismos de un solo nucleótido

Dado que el 20% del genoma corresponde a "desiertos génicos" y que el total del ADN ocu

pado por los exones, es decir la parte codificante de los genes, es de sólo 1,1%,[2] resulta de gran interés saber si la mayor parte del ADN, que es no codificante de proteína, es decir el ADN intergénico (74,5% del total de bases) y el ADN de los intrones (24,4% del ADN), está formado por secuencias cualesquiera, al azar, o si existen regularidades. La primera conclusión es la gran conservación, en general, de las secuencias del ADN humano de un individuo a otro. El Proyecto Genoma Humano fue realizado con el ADN correspondiente a unas pocas decenas de personas (el estudio de Venter et al. fue hecho con los genomas de 5 personas), y por consiguiente no puede establecer diferencias entre diferentes poblaciones humanas. Sin embargo, en primera instancia es notable el gran parecido del total de las secuencias del ADN de diferentes personas. Las variantes de una única base en una secuencia del ADN se llaman "polimorfismos de un solo nucleótido" (sigla en inglés: SNP, pronunciado "snip") La tasa de estas variaciones encontrada es de sólo 1 cada 1.200 bases, en el promedio de todo el genoma (parte codificante y no codificante) Estas variaciones no están distribuidas al azar, puesto que la gran mayoría de las variantes (SNP) se encuentran. primero, en los intrones; segundo, en el ADN intergénico, y finalmente, muy poco, en las regiones codificantes (exones) Es interesante también que se estudió si ocurre o no la probabilidad teórica de que por simple azar ocurran estas variaciones; entonces la proporción de las transversiones (cambio de una purina por una pirimidina) debe ser dos veces mayor que las transiciones (cambio de una purina por la otra o una pirimidina por la otra) El resultado observado muestra que hay más transiciones; es decir que estas variaciones son auténticas y no el producto de errores en el proceso de la secuenciación. Por otra parte, la *distribución* de estas variantes (SNP) a lo largo del genoma *no es al azar*, es decir, hay regiones con tendencia a acumular variantes (ADN intrónico, e intergénico) y otras regiones (exones) donde ocurre lo contrario; esto último se explica porque la selección natural tiende a expulsar estas variaciones en los exones, cuando son nocivas. El hecho observado de que la tasa de variantes en los exones, que cambia el sentido (un aa por otro) sea muy baja (0,12%) es fundamental para dar basamento a la presunción de que hay una mutación (que puede ocasionar una enfermedad) cuando en una secuencia de un exón *hay un cambio de una base.* Por consiguiente, la búsqueda de mutaciones por secuenciación de genes en enfermedades está en general convalidada (recordando que hay mutaciones silenciosas que no se reflejan en el fenotipo)

Adicionalmente, estas variantes (SNP) son *heredables* y, por consiguiente, pueden ser usadas como *marcadores* o hitos para localizar genes.

Algunos datos numéricos del genoma humano

El cuadro 6-4 muestra algunos de los datos generales del resultado del Proyecto Genoma Humano.[2]

Como se desprende del cuadro 6-3, los genes humanos se encuentran *muy fragmentados*, puesto que aquellos genes que tienen más de un exón tienen intrones de tamaño considerablemente mayor que los exones. En promedio, los genes ocupan un 25,5% del ADN de la eucromatina, pero de esta cifra, la enorme mayoría, 24,4%, corresponde a los intrones, y sólo el 1,1% corresponde a exones. Es decir que para los genes que poseen más de un exón, debe esperarse que la mayor parte de su secuencia de ADN corresponda a intrones. Como cada exón de un gen corresponde (generalmente) a un *dominio* de una proteína, puede concluirse que nuestro genoma tiende a representar dominios (sectores con una forma espacial y una función particular) de proteínas más que a proteínas íntegras. Cuando se compara el genoma humano con el de organismos menos complejos, como el gusano *C. elegans* o la mosca *Drosophila*, se observa que el genoma humano hace más combinaciones de dominios de proteínas, o es más "creativo" en su manejo.[9] Este concepto también surge de la evaluación de los empalmes alternativos de los genes humanos, que, en promedio, permiten que cada gen pueda codificar tres proteínas.[9]

Cuadro 6-4. Los datos de este cuadro provienen de la publicación del grupo Celera (Venter et al., 2001).[2] El total secuenciado no corresponde al total del ADN humano, puesto que están excluidas algunas regiones, principalmente las correspondientes a heterocromatina constitutiva (centromérica y otras).

DATOS GENERALES DE LA SECUENCIA DEL GENOMA HUMANO[2]

Número de genes "anotados"	26.383
Genes de función desconocida	42%
Gen con el mayor número de exones (363 exones)	TTN (Titina)
Promedio de tamaño de un gen humano	27 kb
Total de ADN en "desiertos génicos"	605 Mb
Total de ADN ocupado por exones	1 1%
Total de ADN ocupado por intrones	24,4%
Total de ADN intergénico	74,5%
Tasa de variantes de 1 nucleótido (SNP)	1/1.250 pb

Repeticiones en el genoma humano. Genes parálogos y ortólogos

La secuenciación del genoma ha confirmado que hay una gran cantidad de secuencias de tipo repetido (aproximadamente 35% del genoma) Las secuencias repetidas y cortas denominadas "Alu" ocupan 288 Mb, es decir, casi el 10% del genoma humano.[9] Estas secuencias *Alu* son el producto de muchas retroposiciones, de un ARN especial (ARN 7SL) Estas secuencias *Alu*, cuya función se desconoce, tienen la peculiaridad de acumularse en las regiones más ricas en genes funcionales, de modo que no sólo no parecen perjudicar la función génica sino que quizás intervienen de alguna manera en su regulación. En cambio, las secuencias repetidas y largas, LINES, no presentan este tipo de asociación con genes funcionales, a pesar de cubrir 466 Mb.

Por otro lado, hay secuencias de tipo génico, prácticamente idénticas a una copia de un gen, pero que no se "expresan" finalmente en ningún fenotipo, a veces por carecer de promotor. El número total de estas copias no funcionales o *pseudogenes* es incierto por las razones resumidas previamente (es difícil distinguirlos de genes funcionales), aunque se han discriminado más de 10.000 (véase cuadro 6-1)

La secuenciación del genoma permitió observar numerosas secuencias aparentemente duplicadas, es decir que aparecen en un cromosoma y también en otro, aparentemente copiadas y movidas a otro lugar. En algunos casos las duplicaciones son grandes y comprenden docenas de Mb, pero en general son pequeñas (1 kb) Los resultados, si bien son compatibles con una posible duplicación histórica del genoma de los invertebrados en el comienzo evolutivo de los vertebrados, no prueban que haya existido una duplicación completa en un evento único, sino que es más probable que en distintos períodos de la evolución se hayan ido duplicando algunas regiones separadas del genoma. Estas regiones duplicadas en el curso de la evolución dan lugar a la existencia de los llamados *genes parálogos*, es decir, miembros de una familia, derivados de una duplicación original y otras posteriores, con funciones especiales asignadas a cada miembro de esta familia. La familia de los genes *HOX* del desarrollo embrionario, que se encuentra por cuadruplicado en cuatro cromosomas humanos, es un ejemplo característico (véase cap. 16) Cuando se comparan los genomas de dos organismos, es muy frecuente encontrar genes que cumplen funciones similares en los dos, y cuyas secuencias de ADN son similares, en mayor

grado cuanto más cercana es su relación filogenética; estos genes son derivados de un tronco común o gen original, y todos ellos son llamados *ortólogos*. Las comparaciones de las secuencias génicas humanas con las de ratón (separados por 200 millones de años de evolución) muestran muchas evidencias de genes ortólogos que cumplen funciones similares.[10]

El proteoma humano predecible por la secuencia del genoma

El conjunto de secuencias génicas humanas para proteínas (26.383 en el grupo de Venter et al.) fue comparado en forma preliminar con el conjunto de secuencias para proteínas de dos organismos modelo, el nematodo *C. elegans* y la mosca *Drosophila*, cuyos genomas ya están secuenciados; estos análisis son sólo preliminares,[2] y continúan siendo realizados en muchos laboratorios, con el objeto de determinar proteínas desconocidas y obtener información sobre las posibles funciones de las proteínas del organismo humano. Estas comparaciones preli minares han sido bastante restringidas, tanto por el hecho de que el 41,7% de las proteínas predecibles son de funciones completamente desconocidas, como por las restricciones impuestas por las desviaciones en las secuencias del ADN impuestas por la evolución de los distintos organismos. Uno de los problemas previstos es el surgimiento de nombres para más de 20.000 productos génicos; otro problema, más acuciante, es el de proveer criterios para clasificar las proteínas cuando muchas de ellas son casi desconocidas. En este sentido ha surgido una organización, llamada *Consorcio de Ontología Génica* ("Gene Ontology Consortium") formada por los organizadores de bases de datos de genomas de varios organismos, in cluso el humano, cuyo propósito ambicioso es: "proveer un vocabulario común, preciso y con trolado, para describir los papeles de los genes y de sus productos, en *todos los organismos vivos*"[11] Las bases de datos y los vocabularios propuestos por este consorcio son accesibles en Internet: www.geneontology.org/, y están constituidas por tres sectores:

1. Definiciones de procesos biológicos (ejemplos: crecimiento celular; transducción de señales);
2. Definiciones de funciones moleculares (ejemplos: enzimas, transportadores, receptores), y
3. Definiciones de componentes celulares (ejemplos: proteasoma, ribosoma) Esta "ontología de genes" fue usada para clasificar las proteínas del proteoma humano (fig. 6-4)

La comparación de este proteoma teórico humano con los de otros modelos como *Drosophila* y *C. elegans*, muestra, primero de todo, que hay un núcleo básico de proteínas que es común a todos ellos y que se refiere a reacciones y procesos básicos del metabolismo, como las proteínas requeridas para la síntesis, transcripción y traducción de ácidos nucleicos, enzimas del metabolismo intermedio, etc. En cambio, en otros campos funcionales, se ha observado un significativo incremento del número de proteínas humanas con respecto a los organismos invertebrados. Estos campos son principalmente: 1 Proteínas de funciones inmunitarias. 2. Proteínas involucradas en el desarrollo, estructu ra y funciones del sistema nervioso. 3. Proteínas que constituyen parte de los sistemas de transmisión o transducción de señales, tanto intracelulares como intercelulares y que intervienen en el desarrollo y en la manutención de la homeostasis (equilibrios del medio interno del organismo). 4. Proteínas que intervienen en mecanismos de apoptosis (muerte celular programada) 5. Proteínas que intervienen en la hematopoyesis, en la coagulación sanguínea y en las funciones de la sangre. Estos incrementos de proteínas son lógicamente previsibles teniendo en cuenta las diferencias anatómicas y fisiológicas de los mamíferos con respecto a los invertebrados.

Más allá de esas diferencias, es notable que el número de genes de la especie humana, y aun el de sus proteínas, no se aleje mucho de los números respectivos del gusano *C. elegans* y de la *Drosophila*. Para explicar las diferencias orgánicas con esta similitud de genomas, es lógico buscar diferencias *funcionales* en las proteínas: sus capacidades de interacción (de unas proteí

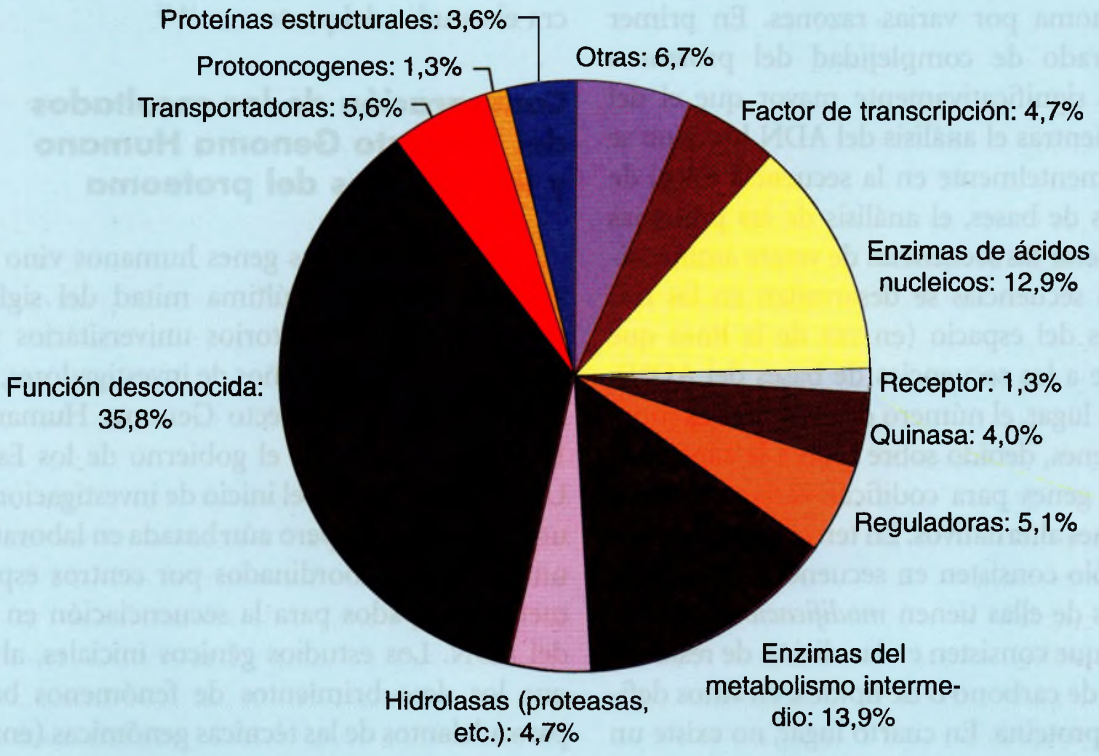


Fig. 6-4. Esquema muy simplificado de la clasificación de funciones del conjunto de las proteínas predichas en el genoma humano. Para la clasificación se usaron los términos definidos por el "Consorcio de Ontología Génica" Más del 41% de las proteínas son de función desconocida (incluidas las catalogadas en "miscelánea").

nas con otras, y de proteínas con ácidos nucleicos), sus capacidades de modificación postraduccional (recortes proteolíticos, glicosilaciones, etc.) y sus capacidades de traslocación y localizaciones diversas, probablemente tienen una trascendencia mayor en el origen de la complejidad del organismo humano.

Diferencias genómicas entre individuos

El genoma humano tiene una secuencia compartida en el 99,9% de su totalidad, que incluye las regiones no génicas, entre todos los individuos cuyo genoma ha sido analizado hasta el presente.

Las variantes de una única base (SNP) y las variaciones de secuencias repetidas están siendo analizadas para constatar la identidad genética de distintas poblaciones humanas, en las cuales ya existe evidencia de diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de determinados alelos de algunos genes, tales como los de los grupos sanguíneos. Sin embargo, la especie humana es notablemente homogénea en su genoma.

El proteoma humano. La Organización Proteoma Humano (HUPO)

Una vez finalizada la secuenciación del ADN humano, el paso siguiente es el análisis del total de las proteínas humanas (proteoma). La organización "HUPO" tiene como objetivos consolidar y coordinar los estudios sobre el proteoma, organizar reuniones científicas sobre este tema y asistir a los investigadores de varias maneras.[12] Como un primer paso, ya existen bases de datos sobre un número de aproximadamente 14.000 proteínas humanas y aproximadamente 11.000 proteínas de ratón y de rata.[13]

El estudio del proteoma es diferente del estudio del genoma por varias razones. En primer lugar, el grado de complejidad del proteoma humano es significativamente mayor que el del genoma; mientras el análisis del ADN humano se basa fundamentelmente en la secuencia lineal de cuatro tipos de bases, el análisis de las proteínas debe considerar las secuencias de veinte aminoácidos, y estas secuencias se desarrollan en las tres dimensiones del espacio (en vez de la línea que corresponde a las secuencias de bases del ADN). En segundo lugar, el número de proteínas es superior al de genes, debido sobre todo a la capacidad de muchos genes para codificar varias proteínas por empalmes alternativos. En tercer lugar, las proteínas no sólo consisten en secuencias de aa sino que muchas de ellas tienen *modificaciones postraduccionales* que consisten en la adición de residuos de hidratos de carbono o de lípidos, en sitios definidos de la proteína. En cuarto lugar, no existe un proteoma común a todos los tejidos: las células pancreáticas exocrinas, por ejemplo, producen un conjunto de proteínas muy diferente del de los queratinocitos de la piel. Finalmente, los métodos para análisis de las proteínas son considerablemente más complicados y costosos que los usados para el análisis del ADN Los métodos básicos para análisis de proteínas son de 3 categorías: 1 electroforesis bidimensional en geles, 2. espectrometría de masa, y 3. cristalografía de rayos X. Los equipos correspondientes son más costosos: un equipo de espectrometría de masa cuesta más de medio millón de dólares estadounidenses.

Dado que cada tipo celular produce un proteoma característico, los estudios proteómicos se han segmentado en proteomas de tejidos particulares. Algunos de los proyectos de análisis de proteomas particulares más avanzados son.

1 El proteoma de las proteínas plasmáticas de la sangre humana
2. El proteoma hepático (de hepatocitos)
3. El proteoma cerebral (de neuronas de la corteza cerebral).

Por otra parte, se encuentran en desarrollo bases de datos especiales y metodologías informáticas para hacer frente al ordenamiento y procesado de las grandes masas de datos que involucra el estudio del proteoma.[14,15]

Comparación de los resultados del Proyecto Genoma Humano y los estudios del proteoma

El análisis de los genes humanos vino realizándose durante la última mitad del siglo XX, sobre todo en laboratorios universitarios y por parte de grupos pequeños de investigadores, hasta la iniciación del Proyecto Genoma Humano en 1990, financiado por el gobierno de los Estados Unidos y que marcó el inicio de investigaciones en una escala mayor, pero aún basada en laboratorios universitarios, coordinados por centros especialmente equipados para la secuenciación en masa del ADN Los estudios génicos iniciales, al igual que los descubrimientos de fenómenos básicos para adelantos de las técnicas genómicas (enzimas de restricción, vectores para clonación de genes, reacción en cadena de la polimerasa y otros muchos) fueron efectuados por científicos individuales o en pequeños grupos. En los últimos años del siglo XX, empresas de "biotecnología", del tipo de Celera (empresa de los Estados Unidos cuyo Director fue J. Craig Venter hasta 2001) ingresaron en el área de secuenciación del genoma humano en competencia con el proyecto oficial, y con el objetivo aparente de obtener patentes de las secuencias del ADN humano, con fines de lucro. Los resultados de este ingreso de empresas han sido ambivalentes: por ejemplo, el grupo de J. Craig Venter fue exitoso en completar una secuenciación "en borrador" del genoma humano en forma rápida y con datos numerosos y útiles.[2] Sin embargo, estos resultados fueron obtenidos a partir de una masificación del trabajo, despersonalizando los resultados finales (el trabajo publicado está firmado por 266 autores, el primero de ellos fue J. C. Venter) Por otra parte, si bien empresas y laboratorios presentaron en los Estados Unidos solicitudes de patentes de secuencias de ADN humano en número de varios miles, el otorgamiento de esas patentes quedó básicamente en suspenso, debido a la oposición levantada por la mayoría de los más conocidos investigadores científicos, incluido James D. Watson, y a la decisión

política del entonces presidente de los Estados Unidos y del primer ministro del Reino Unido, quienes rechazaron la posibilidad de patentar las secuencias del ADN humano. Previamente, la Organización de las Naciones Unidas, en 1997, había realizado una "Declaración" o documento consensuado, afirmando que el genoma humano es *patrimonio de la humanidad* y, por consiguiente, no patentable.[16] Finalmente, las secuencias del ADN humano, dado que las codificantes son minoría y no codifican generalmente una única proteína, han sido consideradas como poco relevantes para obtener los réditos económicos esperados.[17]

El año 2001, con la publicación de los resultados "en borrador" de las secuencias del ADN humano,[2] parece marcar un punto de inflexión, por cuanto ya concluida la secuenciación en la especie humana, las empresas biotecnológicas rebajan o abandonan la prioridad de este campo para tomar el papel principal en el análisis del proteoma humano. En especial, las empresas farmacéuticas, que dedicaron 20.000 millones de dólares a investigación y desarrollo en el año 2000, están dispuestas a erogaciones aun mayores en el campo de la proteómica, con el fin de patentar proteínas humanas, desarrollar agonistas y antagonistas moleculares para dichas proteínas, nuevas pruebas diagnósticas y nuevas drogas para tratamiento.[17] La predominancia de empresas en el campo de la proteómica podría ser perceptible en una menor publicidad de descubrimientos científicos y en la descripción de nuevas técnicas (el secreto industrial desanima esta publicidad), así como un menor protagonismo de científicos individuales.

Tecnologías para el diagnóstico multigénico o genómico: microarreglos de ADN

En los últimos años de la década de 1990, en laboratorios de la Universidad de Stanford y otras Universidades de los Estados Unidos se desarrolló un ingenioso método que permite observar el grado de funcionamiento (transcripción) ya no de un solo gen, sino de un conjunto de miles de genes, e incluso de todo un genoma.[18] El método de los "microarreglos" , también llamados pastillas de ADN (*DNA chips* en inglés), (que luego se ha extendido a proteínas), consiste en depositar minúsculas microgotas en las microcuadrículas de un casillero virtual de varios miles de espacios sobre el vidrio de un portaobjetos especialmente preparado (fig. 6-5).

En la base de toda la técnica de microarreglos, está la *hibridación específica*, de segmentos de ácidos nucleicos desconocidos, con los segmentos ("diana o blanco") pegados al vidrio. La especificidad de esta hibridación está dada por la

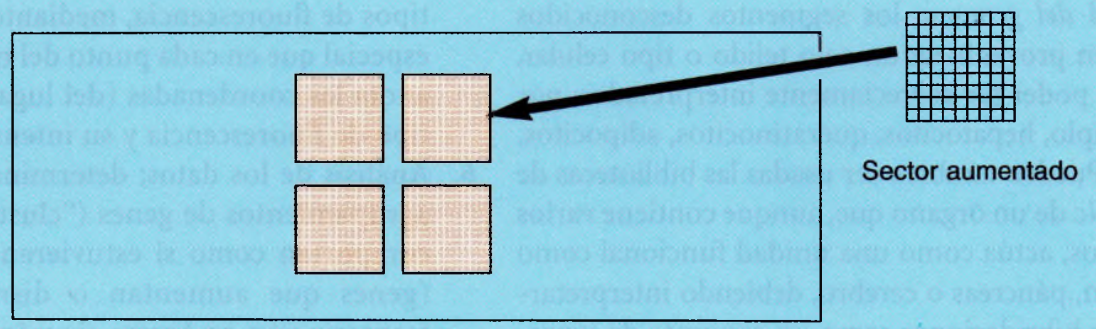


Fig. 6-5. Representación de un microarreglo de ADN ("microchip"). Sobre un portaobjeto de vidrio especialmente preparado, se han depositado varios miles de microgotas ordenadas (la disposición ordenada se obtiene con "inyectores" similares a los de las impresoras a chorro de tinta); cada microgota contiene un segmento de ADN diferente o un oligonucleótido diferente, que han sido adheridos al vidrio del portaobjetos en forma indeleble. Con este portaobjeto con microarreglo, se puede buscar (bañándolo en una mezcla de ARN o de segmentos de ADN) cuáles son los que hibridan in vitro y con cuáles de las secuencias pegadas al vidrio lo hacen.

complementariedad de las secuencias desconocidas con las "diana" pegadas al vidrio. Como se vio en el capítulo respectivo de técnicas, las condiciones de hibridación (pH, presencia de formamida, temperatura y otras) son importantes para la eficiencia de la hibridación; y por otra parte, el grado de exactitud de la complementariedad del segmento desconocido con el segmento "diana" es fundamental. Una vez ocurrida la hibridación, la presencia (o ausencia) y el grado de hibridación ocurrido con cada uno de los miles de segmentos diana, se detecta iluminando con luz láser el microarreglo: puesto que los segmentos *desconocidos* estaban *todos rotulados* con un colorante fluorescente, el nivel de fluorescencia en cada punto es proporcional al nivel de hibridación.

Ahora bien, cada uno de los miles de cuadraditos (o círculos) de un microarreglo corresponde a una reacción diferente de hibridación, que puede consistir (cada una) en la hibridación *de un gen con su ARNm* (o su equivalente, el ADNc). Lo que es fundamental en los microarreglos es que se realizan todas las hibridaciones *simultáneamente* y se analizan como un *sistema*: es decir que se puede visualizar todo el genoma funcionante, o sea la *expresión no ya de un gen, sino del genoma.*

Ahora bien, como cada tipo celular expresa sólo una parte del genoma, en los microarreglos hay dos conjuntos diferentes de hibridantes: mientras los *segmentos diana representan la totalidad del genoma*, los segmentos desconocidos deben provenir de un solo tejido o tipo celular, para poder ser correctamente interpretados; por ejemplo, hepatocitos, queratinocitos, adipocitos, etc. Pueden también ser usadas las bibliotecas de ADNc de un órgano que, aunque contiene varios tejidos, actúa como una unidad funcional como riñón, páncreas o cerebro, debiendo interpretarse las hibridaciones como un conjunto de expresiones génicas de ese órgano.

Por consiguiente los microarreglos permiten la definición de un *perfil de expresión génica de un tejido* y en muchas ocasiones se habla de determinar dicho perfil de expresión génica para conocer el estado funcional de dicho tejido, aunque en realidad los perfiles citados son variables ante variaciones, aun menores, de las condiciones ambientales. Esto ha llevado a que la principal aplicación de estos perfiles sea comparativo: es decir se compara el conjunto de hibridaciones de un tejido "control" con el de un tejido "experimental", lo cual es de gran utilidad en Medicina, en Farmacología y en el diseño de nuevas drogas farmacéuticas. El esquema general de uso de los microarreglos, por consiguiente, consta de los siguientes pasos (fig. 6-6):

1 Preparación de dos muestras de tejido u órgano, idénticas salvo por una variable: una es "control" y la otra es "experimental" (pueden ser: normal y tumoral, o normal y en presencia de suero; o normal y tratada con una droga, etc.)
2. Extracción del ARNm total de ambas muestras (éste es el universo de expresión génica de ese tejido en las muestras)
3. Obtención del ADNc de ambas muestras (con transcriptasa inversa), en presencia de nucleótidos rotulados, pero con rótulos distintos en cada muestra, para un color de fluorescencia distintivo de cada una.
4. Reacción de hibridación sobre un portaobjeto con un microarreglo de todo el genoma. La reacción se realiza bañando el portaobjetos con microarreglo con una mezcla de partes equivalentes de los dos grupos de ADNc.
5. Examen del microarreglo y detección de los tipos de fluorescencia, mediante un escáner especial que en cada punto del microarreglo anota las coordenadas (del lugar exacto), el tipo de fluorescencia y su intensidad.
6. Análisis de los datos; determinación de los agrupamientos de genes ("clusters") que se comportan como si estuvieran conectados (genes que aumentan o disminuyen su transcripción en forma sincrónica y armónica)
7 Interpretación de los datos: comparación con otros ensayos de microarreglos y con bases de datos.

Una característica importante de los microarreglos es que cada punto de la cuadrícula, donde

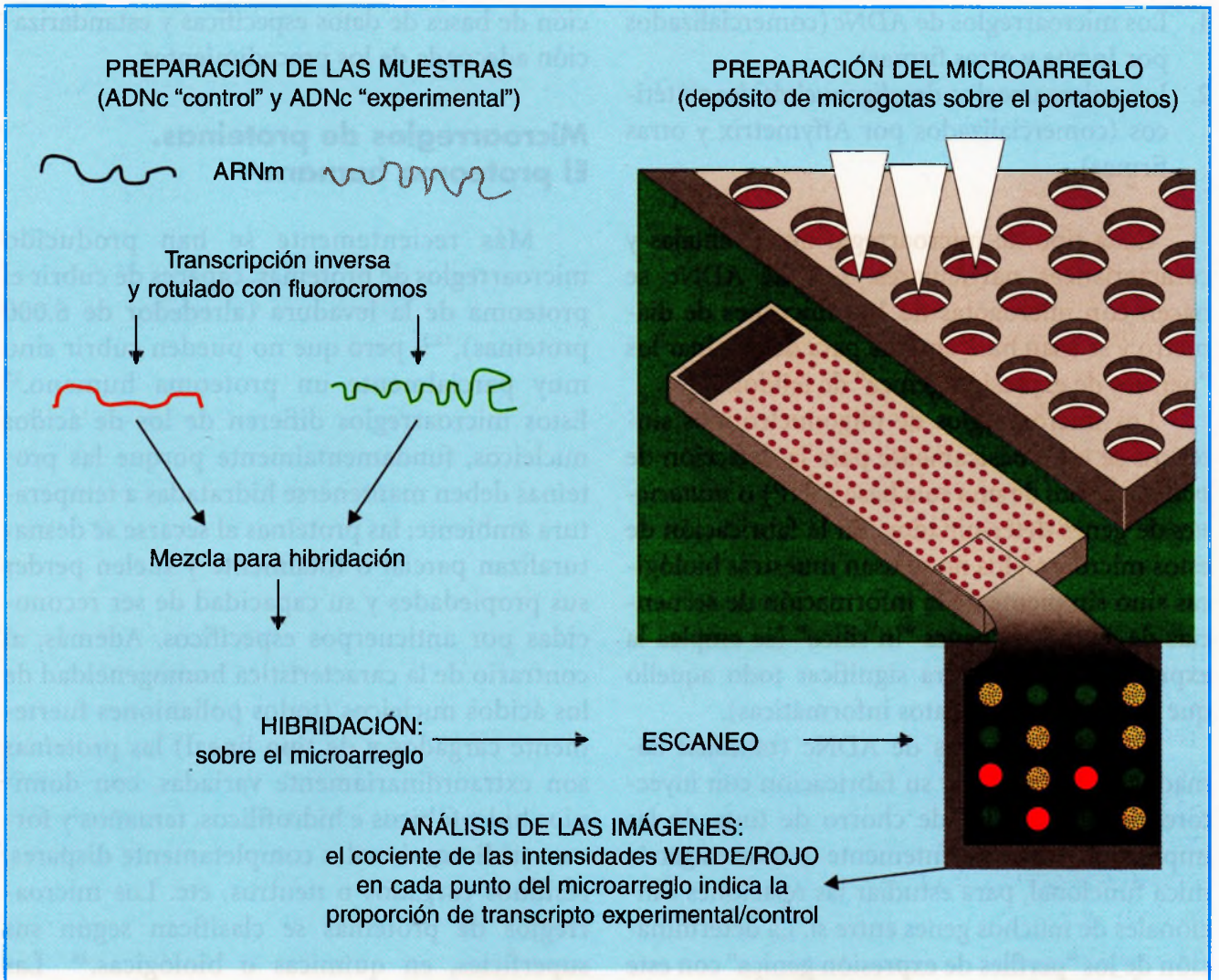


Fig. 6-6. Esquema de los pasos de una utilización de un microarreglo de ADN para analizar comparativamente el "perfil de expresión génica" de un tejido en dos muestras, una control y la otra "experimental" Datos de NIH, Estados Unidos. Significado de los colores: verde = mayor proporción del transcripto experimental, amarillo = neutro o sea ambos equivalentes; rojo = mayor proporción del de control.

se deposita una microgota de ADN "diana" al fabricar el microarreglo, tiene una "dirección" precisa (una ordenada y una abscisa para cada punto) de modo que el ADN "diana" que está pegado al vidrio en dicho punto puede ser identificado por su posición (p. ej., en la ordenada 50 y abscisa 33 de un microarreglo de 100 × 100 [total: 10.000] cuadrados puede estar el ADNc del gen del canal de cloro de la fibrosis quística *CFTR*, y en el siguiente cuadrado el ADNc de otro gen) Como las microgotas son puestas con microinyectores robóticos, se conserva siempre en un archivo de ordenador la posición de cada punto del microarreglo con la identidad del ADN depositado.

Cuando se escanea la hibridación de un microarreglo, la información de la posición de cada punto es agregada a la intensidad y tipo de fluorescencia en ese punto, de modo que se sabe cuál es la identidad del gen que está siendo hibridado en ese punto.

Tipos de microarreglos: de ADNc y de oligonucleótidos sintéticos. Implicancias de sus usos

Hay dos tipos principales de microarreglos de ácidos nucleicos:[19]

1. Los microarreglos de *ADNc* (comercializados por Incyte y otras firmas)
2. Los microarreglos de *oligonucleótidos* sintéticos (comercializados por Affymetrix y otras firmas)

Cada tipo de microarreglo tiene ventajas y características particulares. Los de ADNc se hacen con microgotas de 100 micrones de diámetro y se usan básicamente para determinar los "perfiles de expresión génica" de tejidos.

Los microarreglos de oligonucleótidos sintéticos se usan básicamente para la detección de *polimorfismos* de una sola base (SNP) o *mutaciones* de genes determinados. En la fabricación de estos microarreglos no se usan muestras biológicas sino simplemente la información de secuencias de exones de genes "in silico" (se emplea la expresión *in silico* para significar todo aquello que está en bases de datos informáticas)

Los microarreglos de ADNc (también llamados "impresos" por su fabricación con inyectores similares a los de chorro de tinta de las impresoras) son crecientemente usados en genómica funcional, para estudiar las relaciones funcionales de muchos genes entre sí. La determinación de los "perfiles de expresión génica" con este tipo de microarreglos se ha extendido a muchos campos de la Medicina, en especial el estudio de tejidos tumorales versus tejido normal,[20] la interacción entre agente patógeno microbiano y huésped,[21] el efecto de drogas (tejido tratado versus no tratado),[19] el efecto de envejecimiento (tejido joven versus tejido envejecido) y muchos otros casos.[22] El uso de los microarreglos de ambos tipos ha apoyado la hipótesis de que muchos genes actúan en forma de "redes"[23] Tal como fue expresado claramente por el grupo de la Universidad de Stanford:[18] "mucha de la información del genoma no está destinada a especificar la estructura de la proteína o ARN que se codifican, sino a *controlar con precisión* en *qué células*, bajo *cuáles condiciones* y en *qué cantidades* debe ser producido el producto génico" Este tipo de información es el que se busca con el uso de los microarreglos. Sin embargo, la interpretación de los resultados no es sencilla sino que requiere métodos estadísticos especiales, formación de bases de datos específicas y estandarización adecuada de los procedimientos.

Microarreglos de proteínas. El proteoma humano

Más recientemente se han producido microarreglos de proteínas, capaces de cubrir el proteoma de la levadura (alrededor de 6.000 proteínas),[24,25] pero que no pueden cubrir sino muy parcialmente un proteoma humano.[25] Estos microarreglos difieren de los de ácidos nucleicos, fundamentalmente porque las proteínas deben mantenerse hidratadas a temperatura ambiente; las proteínas al secarse se desnaturalizan parcial o totalmente y suelen perder sus propiedades y su capacidad de ser reconocidas por anticuerpos específicos. Además, al contrario de la característica homogeneidad de los ácidos nucleicos (todos polianiones fuertemente cargados y de tipo lineal) las proteínas son extraordinariamente variadas, con dominios hidrofóbicos e hidrofílicos, tamaños y formas tridimensionales completamente dispares, residuos cargados o neutros, etc. Los microarreglos de proteínas se clasifican según sus superficies, en químicas o biológicas.[25] Las superficies "químicas" escogen selectivamente ciertas proteínas de la muestra, actuando como una separación cromatográfica, por lo cual sólo son útiles para un sector del proteoma. Las superficies "biológicas" capturan proteínas de la muestra por reconocimiento y afinidad molecular, típicamente por anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. La preparación de un microarreglo de proteínas es mucho más compleja, incompleta y costosa que la preparación de uno de ácidos nucleicos, y la interpretación de sus resultados es mucho más incierta. las dificultades para un análisis del proteoma humano con microarreglos de proteínas son inmensas.[25] No hay una relación directa entre la abundancia de una proteína en un tejido y su actividad. muchas proteínas son segregadas como "precursores" o zimógenos, y muchas tienen modificaciones por adición de hidratos de carbono o lípidos. La principal utilidad de los microarreglos de proteínas son los estudios de

afinidad, de proteínas diferentes entre sí y de ciertas proteínas con secuencias de ácidos nucleicos o con lípidos.

El análisis de "perfiles proteínicos" de enfermedades con microarreglos de proteínas es un objetivo aún no alcanzado.[25]

RESUMEN

El completamiento del Proyecto Genoma Humano (PGH) ha provisto la secuencia total del ADN humano (excepto algunas regiones heterocromáticas prácticamente desprovistas de genes). El ADN nuclear humano consta de las 22 moléculas de ADN de los cromosomas 1 a 22 y las moléculas de ADN de ios cromosomas X e Y, que forman un conjunto de aproximadamente 3.200 millones de bases (3.200 megabases, Mb) repartidos entre esas 24 moléculas, aproximadamente en forma proporcional al tamaño de cada cromosoma. Ei estudio dei genoma, es decir dei conjunto de los genes humanos y el ADN que ios contiene, en forma de un conjunto o sistema único, es ei objetivo de la disciplina llamada "genómica". Un sector de esta disciplina es la *genómica comparada*, que estudia en forma comparativa ei genoma de organismos *modelo* como ei ratón o ia mosca *Drosophila*, cuyos ADN también están secuenciados, con el fin principal de descubrir *secuencias conservadas*, es decir que se han mantenido suficientemente parecidas en ei curso de la evolución, porque representan genes y son importantes para ia supervivencia de diferentes tipos de organismos.

El objetivo principal del Proyecto Genoma Humano era obtener ia identificación dei total de genes, que son tentativamente 25.000 (22.700 son genes de proteínas) y dejarlos descritos bajo ia forma de "anotados", es decir con su localización y su función previsible definidas. En ei rubro de función esto está sólo parcialmente concluido, puesto que del 42% de ios genes se desconoce su función, es decir que la "genómica funcional" (estudio y clasificación de las funciones de ios genes de todo el genoma) continúa en desarrollo. El desarrollo de bases de datos genéticos y metodologías informáticas especiales para genetistas son tareas de ia *bioinformática* conectadas con ia genómica. Los aspectos sociales, éticos y legales derivados del PGH constituyen un subprograma "ELSI". La secuenciación dei ADN humano ha sido ei paso previo para la identificación, clasificación y estudio dei conjunto de las proteínas humanas, que constituyen el *proteoma* que se considera formado por alrededor de 1.000.000 de proteínas, dado que los genes humanos en promedio codifican varias proteínas diferentes cada uno, principalmente mediante ei *empalme alternativo* de sus regiones exónicas. Los genes humanos pueden estar en la cadena "positiva" (empezando ei sentido 5' a 3' desde el extremo del brazo corto del cromosoma) o en la "negativa" (empezando ei sentido 5' a 3' desde el extremo dei brazo largo) y varían mucho en tamaño (desde más de 2 Mb el gen de distrofina DMD a menos de 2,5 kb el gen *SRY* y los de las globinas), el número de exones (desde un máximo de 363 exones en el gen de la titina del músculo estriado, hasta numerosos genes con un único exón), el tamaño de los intrones, la localización en regiones ricas o pobres en genes, etc. Actualmente, para buscar la localización y la estructura de un gen humano, se consulta una base de datos por Internet, tal como la base de datos "Entrez" del organismo estadounidense NCBI, y en especial a través del "visor del mapa" (genético) de esa base de datos. El uso de las bases de datos es actualmente de gran importancia; para la Medicina, además de "Entrez" son básicas la base de datos de enfermedades hereditarias "OMIM", la base de datos de genes "Gene cards" y la base datos de genética clínica "GeneClinics". La definición de un gen real no era fácil, porque los criterios para su definición no son absolutamente estrictos. Para las bases de datos un gen debe reunir varias condiciones: 1. debe tener un marco abierto de lectura ("ORF", MAL); 2. debe tener una secuencia conservada; 3. debe ser transcripta en un ARNm; 4. su inactivación por mutación debe generalmente ser perceptible en el fenotipo. Se ha establecido una nomenclatura internacional para los genes humanos, por la cual se los designa con letras y/o números, empezando siempre con una letra, en mayúsculas y cursiva, preferiblemente no más de 6 caracteres, y que se refiera a su función, enfermedad o localización. Las características globales del genoma huma-

no muestran, en los 26.383 genes analizados, que el promedio del número de exones por gen es de 7,8; que el 20% del ADN corresponde a "desiertos génicos" sin un solo gen; que el ADN ocupado por exones es sólo el 1,1 % del total; que los intrones ocupan el 24,4 % del ADN, y el ADN "intergénico" ocupa el 74,5% del ADN. El ADN humano es notablemente homogéneo entre diferentes individuos, porque *en promedio*, tiene sólo una base diferente cada 1.250 bases. Estas variantes se denominan *polimorfismos de mononucleótidos* (SNP), están distribuidas muy desigualmente, sobre todo en los intrones y en el ADN intergénico, y sirven como "marcadores" para localizar genes porque estas variantes son heredables. Los genes humanos en general están muy fragmentados en exones, lo cual sugiere que los genes tienden a representar "dominios" diferentes de las proteínas en cada exón. Hay un 35% del genoma ocupado por secuencias repetidas sin significado funcional; las secuencias repetidas cortas "Alu" tienden a acumularse cerca de genes.

Hay un número significativo de genes aparentemente "repetidos" que ocupan lugares en diferentes cromosomas; algunos de estos genes repetidos son producto de más de una duplicación sucesiva, a partir de un único gen original, en el curso de la evolución, habiendo tomado funciones particulares cada uno de los miembros de esta "familia" génica, por ejemplo, los genes *HOX* del desarrollo embrionario, que forman cuatro grupos de genes parálogos. Los miembros correspondientes a duplicaciones de un gen original se denominan "parálogos". Los genes simples (no duplicados) que desempeñan funciones similares en diferentes especies y que son derivados de un tronco común se llaman "ortólogos". El proteoma humano predecible por las secuencias génicas del ADN humano ha sido clasificado de acuerdo con las normas del "Consorcio de Ontología Génica". Este proteoma muestra, en comparación con otros organismos "modelo" un enriquecimiento relativo en proteínas relacionadas con el sistema inmunitario, con el desarrollo del sistema nervioso, con transducción de señales intercelulares, con la apoptosis (muerte celular programada) y con las funciones de la sangre.

El análisis del proteoma humano se encuentra en sus comienzos, por ser más complejo que el genoma. Se concentra en los segmentos particulares del proteoma que corresponden a algunos tejidos (proteoma hepático o cerebral). Los *microarreglos* de ADN ("chips" de ADN) ya constituyen una importante metodología para el análisis del genoma normal y sus anormalidades funcionales: permiten observar el grado de funcionamiento (transcripción) simultáneo de miles de genes o de todo el genoma, de una vez. Mediante los microarreglos se determina el *perfil de expresión génica* de un tejido normal y sobre todo, se establecen *comparaciones* de perfiles de expresión entre controles y patológicos. Los dos tipos principales de microarreglos tienen varias aplicaciones: los de oligonucleótidos se usan para detectar SNP y mutaciones; los microarreglos de ADNc se usan principalmente para definir perfiles de expresión génica.

Los microarreglos de proteínas son mucho más difíciles de realizar e interpretar; se encuentran en una etapa inicial de desarrollo y se prevé su uso para determinar las afinidades de diversas proteínas entre sí y con otros tipos de moléculas.

REFERENCIAS

1 Colllins FS, Morgan M, Patrlnos A. The human genome project: lessons from large-scale biology. Science 2003; 300:286-290.

2. Venter JC, et al. The sequence of the human genome. Science 2001;291·1304-1351

3. Lander ES, et al (The International Human Genome Consortium). Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001 409:860-921

4. Morton, NE. Parameters of the human genome. Proc Nat Acad Sci USA 1991 88:7474-7476.

5. Tuffery-Giraud S, Chambert S, Demaille J, Claustres M. Point mutations in the dystrophin gene: evidence for frequent use of cryptic splice sites as a result of splicing defects. Hum Mut 1999; 14:359-368.

6. Snyder M, Gerstein M. Defining genes in the genomics era. Science 2003; 300:258-260.
7 Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. Genomics 2002; 79:464-470.
8. Bang ML, Centner T, Fornoff F et al. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system Circ Res 2001·11·1065-1072.
9. Pennisi E. The Human Genome. Science 2001 291·1177 1180.
10. Wolfsberg TG, McEntyre J, Schuler GD. Guide to the draft human genome. Nature 2001 409:824-826.
11 The Gene Ontology Consortium (Ashburner M, et al.). Gene ontology: tool for the unification of Biology. Nature Genet 2000; 25:25-29.
12. Human Proteome Organization (HUPO). http://www.hupo-2003.com
13. Hodges PE, Carrico PM, Hogan JD, O'Neill KE, Owen JJ, Mangan M, et al. Annotating the human proteome: the human proteome survey database (HumanPSDB) and in-depth target database for G protein-coupled receptors (GPCR-PD) from Incyte Genomics. Nucleic Ac Res 2002; 30:137 141
14. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. Nature 2003; 422:193-197
15. Phizicky E, Bastiaens PIH, Zhu H, Snyder M, Fields S. Protein anaysis on a proteomic scale. Nature 2003; 422:208-215.
16. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO). 29th Session of the General Conference: Universal declaration on the human genome and human rights. Paris, 11 November, 1997
17 Ezzell C. Proteins rule. Sci Amer 2002;286:26-33.
18. Ferea TL, Brown PO. Observing the living genome. Curr Op Genet Dev 1999; 9:715-722.
19. Gerhold D, Rushmore T, Caskey CT. DNA chips: promising toys have become powerful tools. TIBS 1999; 24:168-173.
20. Liu ET. Classification of cancers by expression profiling. Curr Op Genet Dev 2003: 13:97 103.
21 Cummings CA, Relman DA. Using microarrays to study host-microbe interactions. Emerg Infect Dis 2000; 6:513-525.
22. Meltzer PS. Spotting the target: microarrays for disease gene discovery. Curr Op Genet Dev 2001 11:258-263.
23. Wyrick JJ, Young RA. Deciphering gene expression regulatory networks. Curr Op Genet Dev 2002; 12:130-136.
24. Zhu H, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. Science 2001 293:2101-2105.
25. Talapatra A, Rouse R, Hardiman G. Protein microaarrays: challenges and promises. Pharmacogenomics 2002; 3:527 536.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

The International HapMap Project. Nature 2003;426, 789-96 (y coment. p.739).

International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. Nature 2005;437·1299-1320 (+ coment.1241-2).

International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature 2007;449:851-61

Cardon LR, Abecasis GR. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. Trends Genet 2003;19:135-40.

Human Genome Variation Society. Locus-specific mutation databases. http://www.hgvs.org/dblist/glsdb.html.

Capítulo 7

Regulación de la expresión génica

El cromosoma como orgánulo complejo. Los nucleosomas y su papel en la actividad transcripcional. Modificaciones de las histonas. Acetiltransferasas, metiltransferasas y otras enzimas modificadoras. Heterocromatina. mecanismos del silenciamiento. Regulación por ARN: interferencia de ARN. Receptores nucleares. Otras formas de regulación de la expresión génica. Importancia de los procesos epigenéticos. El síndrome de Rett

El concepto del cromosoma como un paquete de información génica compactada por una superposición de superhélices enrolladas una sobre otra, que fue visto anteriormente, ha sido superada por un concepto de una realidad mucho más compleja. los cromosomas dentro del núcleo interfásico aparecen ahora como formados por dominios y superficies irregulares dispuestas como mosaicos de receptores, activa dores, enzimas y ARN no codificantes de proteínas, que hacen que cada sector de cromatina tenga una individualidad y una especificidad para reaccionar con moléculas o agregados moleculares específicos. De alguna manera, este concepto se asemeja al reemplazo de la imagen simplista de la membrana citoplasmática por la del mosaico fluido con su multiplicidad de receptores.[1] Uno de los detalles más importantes de esta nueva visión de la cromatina es la existencia de múltiples modificaciones químicas de las histonas nucleosomales, que poseen importancia funcional, por lo cual se habla de un "código de histonas"[2] que, por ser posteriores a la codificación del ADN, son modificaciones "epigenéticas" de la expresión de los genes. No solamente ingresan en el núcleo numerosas proteínas que poseen las señales de *importación nuclear*, a través de los sofisticados complejos de poro y ayudadas por proteínas "cooperativas", sino que estas proteínas tienen destinos específicos sobre ciertas regiones de cromatina que poseen receptores para ellas mismas, y que frecuentemente forman agregados moleculares proteicos, que determinan la actividad o silenciamiento de genes. Las modificaciones de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación, ubicuitinización y otras) y la deposición específica de ARN pequeños "silenciadores" son procesos que pueden establecerse en forma clonal permanente, dejando una impronta propia de ese tipo celular, por medio de mecanismos que actualmente son analizables. En realidad, las células eucariontes, al poseer *cromatina* en lugar de ADN mayormente desnudo como los procariontes, adquirieron la posibilidad de manejar su información génica de una forma mucho más sofisticada, y de mantener "silenciada" permanentemente gran parte de esa información, pero con posibilidad de revertirla a actividad plena en forma regulada e inmediata. En Medicina, estos adelantos ya han permitido esclarecer un número de enfermedades genéticas en las cuales es la

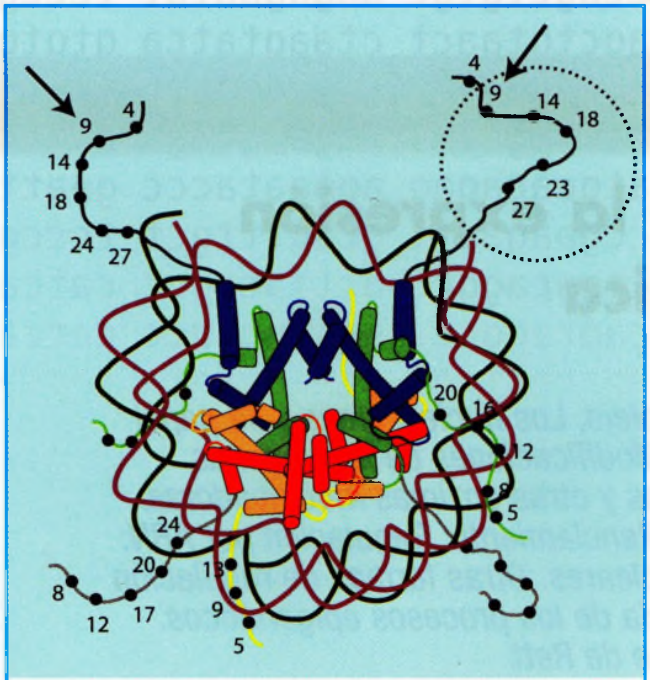


Fig. 7-1 Estructura básica del nucleosoma, vista desde arriba (es decir desde el eje de la fibra de cromatina). Las 2 vueltas de ADN, están en violeta y verde oscuro en la periferia. La histona H3 y la H4 están en azul y en verde, respectivamente, en su parte central (cintas), mientras la H2A en amarillo y la H2B en naranja. Los extremos o "colas" de la H3 (en negro, la derecha resaltada con círculo) salen hacia arriba y los números señalan los aa que frecuentemente son modificados en el "código de histonas" Las colas de la H2B (en gris) salen abajo. También existen aa modificables en la parte central, como el residuo K79 de la H3. Las flechas señalan las lisinas en posición 9 de la H3, cuya metilación es fundamental en el "silenciamiento" génico.

"impronta" o la regulación epigenética la que se halla alterada.[3,4]

Estructura general del nucleosoma y las modificacianes de sus histonas

En Biología celular se estudia la estructura general de los nucleosomas, por lo cual aquí sólo se resumirán los fundamentos pertinentes a la regulación de la expresión génica.

La partícula nucleosómica formada por dos tetrámeros de las histonas H3, H4, H2A y H2B es el núcleo central sobre el que se enrollan aproxi madamente casi 2 vueltas de ADN Uno de los refinamientos recientes es el establecimiento de que son 147 pb (pares de bases) (y no 146) de ADN la longitud que se enrolla en el nucleosoma.[5] El esquema general del nucleosoma (fig. 7 1) muestra que el ADN, en la periferia de la partícula nucleosomal, realiza alrededor de 120 contactos interatómicos con las histonas,[6] lo cual sugería que el octámero y el ADN formaban una unidad estable o fija. Esta noción de "estabilidad" es irreal, por cuanto el octámero es capaz de *deslizarse* a lo largo de trayectos considerables de ADN [7] Esta disociación de las interacciones ADN-nucleosoma es uno de los efectos de los llamados "factores de remodelación de la cromatina", que comprenden factores de transcripción como las proteínas HMG (entre ellas la SRY), enzimas modificadoras de las histonas y otras moléculas capaces de utilizar la energía liberada por la hidrólisis de ATP para esas tareas.[8]

De esta manera, la cromatina no es "fija" ni "estable" sino altamente dinámica.

Principales modificaciones de las histonas nucleosomales

La figura 7 2 muestra las principales modificaciones en las "colas" amino-terminales de las histonas nucleosomales.

Las consecuencias funcionales de las modifi caciones de estas histonas, sobre todo en las "colas" son variadas y aún ıncompletamente conocidas. En términos generales, las acetilaciones (de lisinas y arginina sobre todo), al dismi nuir la carga positiva de las histonas, "liberan" o "fluidifican" la estructura de la cromatına y la hacen pasible de ser transcripta activamente. Por el contrario, la desacetilación de las histonas, al dejar libres sus cargas positivas, son "compactadoras" o "silenciadoras" de la actıvıdad transcriptiva del ADN correspondiente a esa cromatina (fig. 7-3)

Esta generalización, sin embargo, es complicada por un número de variables: el lugar y tipo del aa modificado, el sector de ADN comprendido, la presencia de otras modificaciones vecinas, la presencia de agregados proteínicos y otras. De modo que cada modificación de cada aa de cada histona y las características del medio circundan te son necesarios para comprender el "códıgo de histonas"

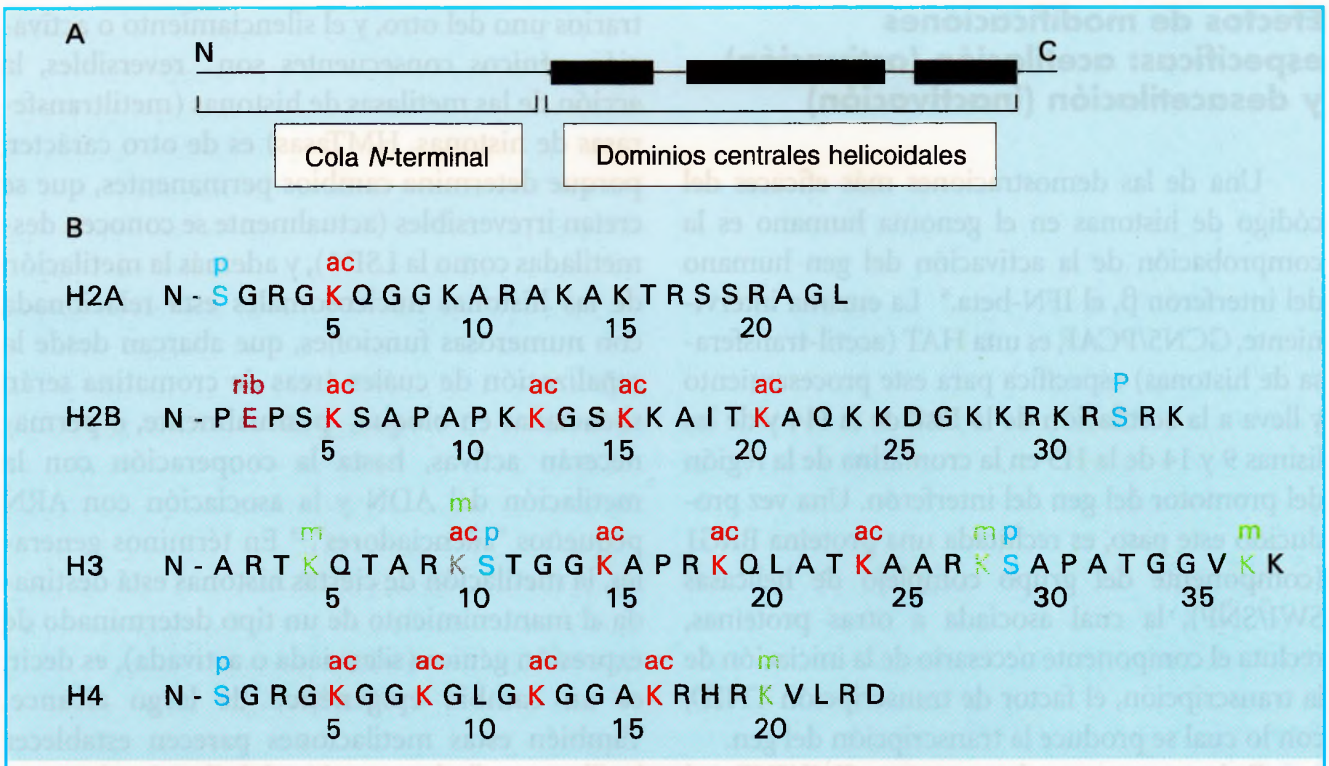


Fig. 7-2. Esquema de las "colas" N-terminales de las histonas nucleosomales, con sus aa modificables marcados en código de una letra (K: lisina, S: serina). Las principales modificaciones son las acetilaciones (ac) y las metilaciones (m), también las fosforilaciones (P) de serinas y las ribosilaciones (rib).

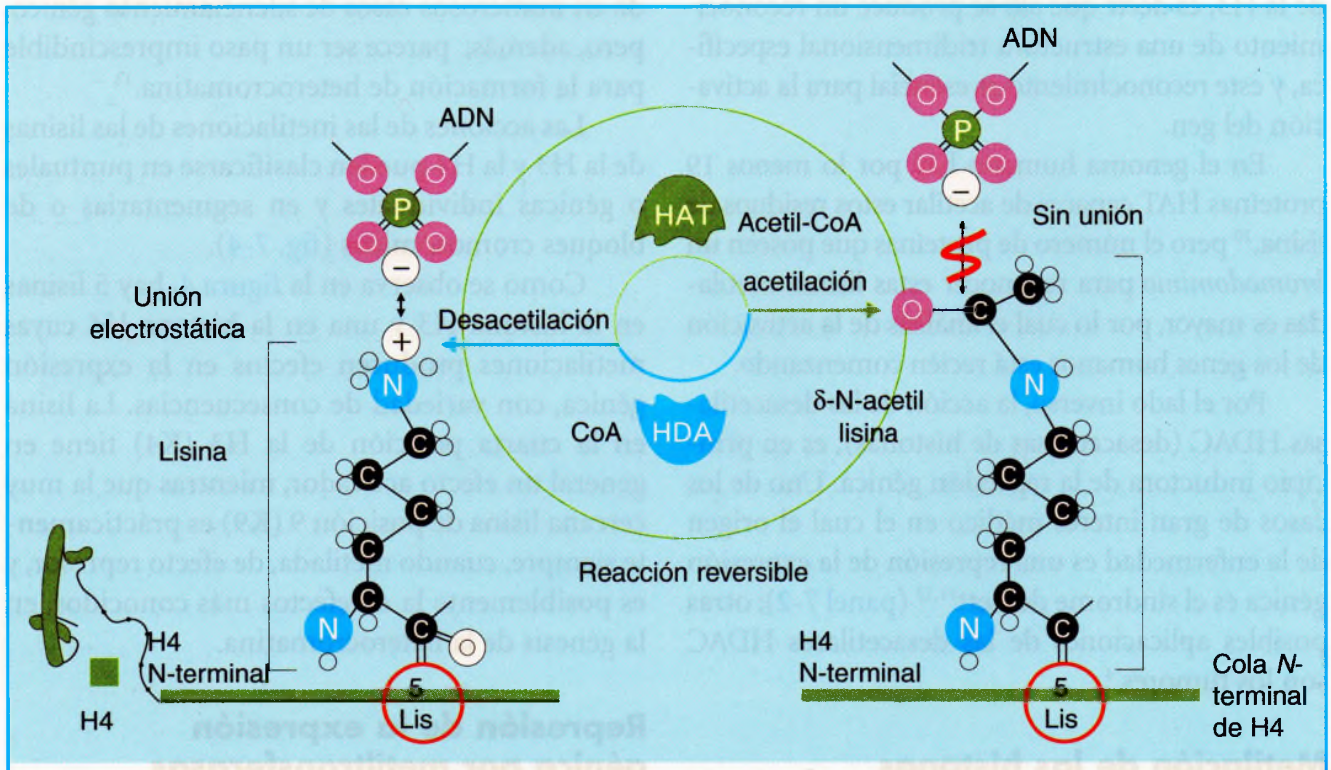


Fig. 7-3. Efectos generales de la acetilación y de la desacetilación de las histonas nucleosomales. Las enzimas "HAT" son acetiltransferasas de histonas (acetilan) y activan, en general, la cromatina. Las CoA-HDA (CoenzimaA-desacetilasas de histonas) efectúan un proceso inverso (el color verde identifica el eje general de la histona H4). Se ejemplifica la histona H4 pero el proceso es similar con las demás histonas.

Efectos de modificaciones específicas: acetilación (activación) y desacetilación (inactivación)

Una de las demostraciones más eficaces del código de histonas en el genoma humano es la comprobación de la activación del gen humano del interferón β, el IFN-beta.[9] La enzima interviniente, GCN5/PCAF, es una HAT (acetil-transferasa de histonas) específica para este procesamiento y lleva a la acetilación de la Lis8 de la H4 y de las lisinas 9 y 14 de la H3 en la cromatina de la región del promotor del gen del interferón. Una vez producido este paso, es reclutada una proteína BRG1 (componente del grupo complejo de helicasas SWI/SNF), la cual asociada a otras proteínas, recluta el componente necesario de la iniciación de la transcripción, el factor de transcripción TFIID, con lo cual se produce la transcripción del gen.

Es interesante que las proteínas SWI/SNF y el TFIID tienen un *dominio* especial, llamado bromodominio, que reconoce específicamente la forma espacial de los residuos *acetilados* (pero no los desacetilados) de las lisinas 8 de H4 y las 9 y 14 de la H3, es decir que allí se produce un reconocimiento de una estructura tridimensional específica, y este reconocimiento es esencial para la activación del gen.

En el genoma humano hay por lo menos 19 proteínas HAT capaces de acetilar estos residuos de lisina,[10] pero el número de proteínas que poseen un *bromodominio* para reconocer estas lisinas acetiladas es mayor, por lo cual el análisis de la activación de los genes humanos está recién comenzando.

Por el lado inverso, la acción de las desacetilasas HDAC (desacetilasas de histonas), es en principio inductora de la represión génica. Uno de los casos de gran interés médico en el cual el origen de la enfermedad es una represión de la expresión génica es el síndrome de Rett[11,12] (panel 7 2); otras posibles aplicaciones de las desacetilasas HDAC son los tumores.[4]

Metilación de las histonas nucleosomales

Mientras las acetilasas y desacetilasas de histonas (HAT y HDAC) actúan en sentidos contrarios uno del otro, y el silenciamiento o activación génicos consecuentes son reversibles, la acción de las metilasas de histonas (metiltransferasas de histonas, HMTasas) es de otro carácter, porque determina cambios permanentes, que se creían irreversibles (actualmente se conocen desmetiladas como la LSD1), y además la metilación de las histonas nucleosomales está relacionada con numerosas funciones, que abarcan desde la señalización de cuáles áreas de cromatina serán silenciadas en bloque, puntualmente, o permanecerán activas, hasta la cooperación con la metilación del ADN y la asociación con ARN pequeños "silenciadores"[13] En términos generales, la metilación de ciertas histonas está destinada al mantenimiento de un tipo determinado de expresión génica (silenciada o activada), es decir, es un cambio epigenético de largo alcance. También estas metilaciones parecen establecer las "barreras" a la extensión del silenciamiento en bloque de la cromatina, es decir, delimitan su alcance espacial, además del temporal. La metilación más notable es la de la lisina 9 de la H3 (véanse flechas en fig. 7 1), porque está implicada en numerosos casos de silenciamiento génico, pero, además, parece ser un paso imprescindible para la formación de heterocromatina.[14]

Las acciones de las metilaciones de las lisinas de la H3 y la H4 pueden clasificarse en puntuales o génicas individuales y en segmentarias o de bloques cromosómicos (fig. 7-4)

Como se observa en la figura 4, hay 5 lisinas en la histona H3 y una en la histona H4 cuyas metilaciones producen efectos en la expresión génica, con variedad de consecuencias. La lisina en la cuarta posición de la H3 (K4) tiene en general un efecto activador, mientras que la muy cercana lisina de posición 9 (K9) es prácticamente siempre, cuando metilada, de efecto represor, y es posiblemente la de efectos más conocidos, en la génesis de la heterocromatina.

Represión de la expresión génica por metiltransferasas (en lisinas K9 y K27 de H3)

La metilación en K9 de la histona H3 está ampliamente difundida en zonas de heterocro-

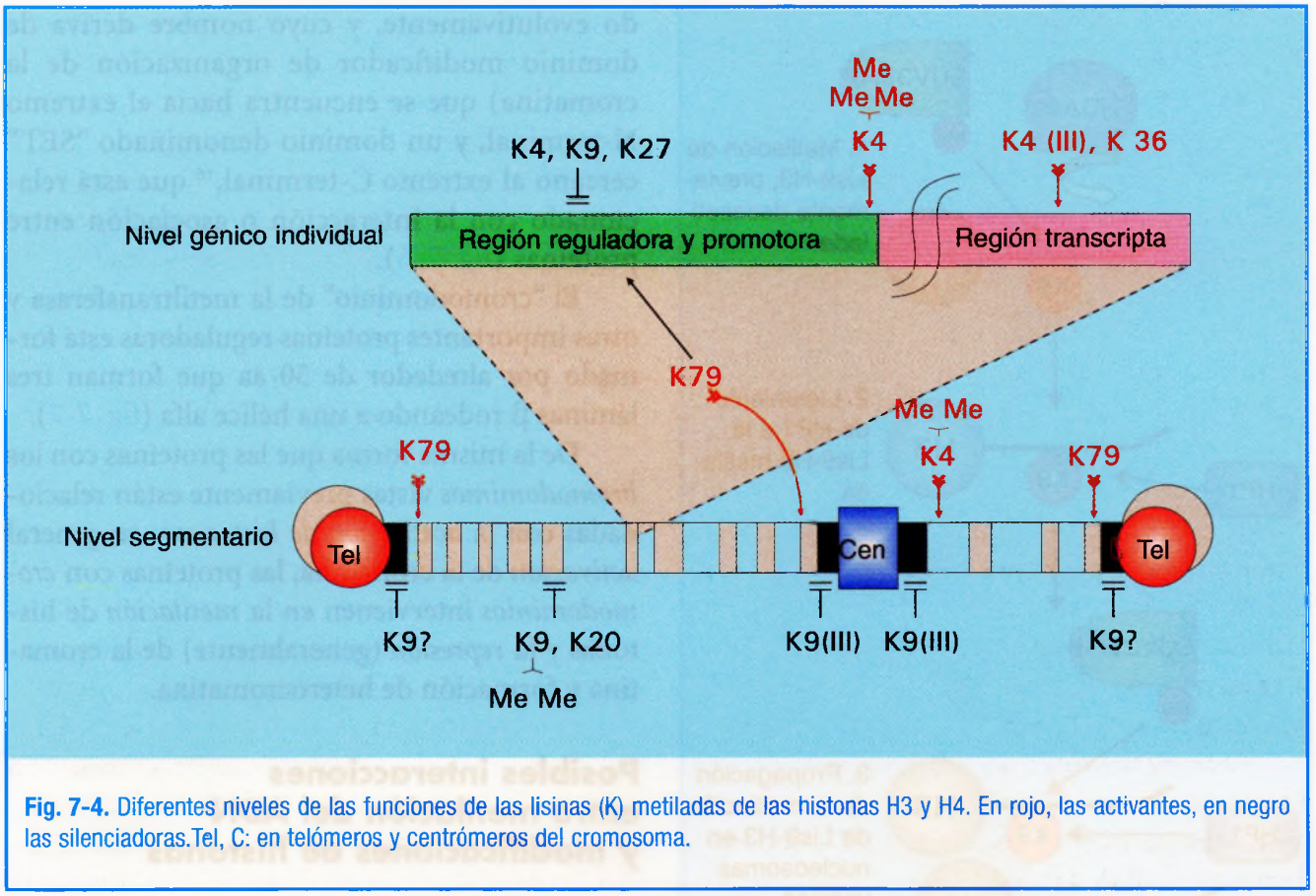


Fig. 7-4. Diferentes niveles de las funciones de las lisinas (K) metiladas de las histonas H3 y H4. En rojo, las activantes, en negro las silenciadoras.Tel, C: en telómeros y centrómeros del cromosoma.

matina, tales como las regiones centroméricas, las regiones subteloméricas (en las cuales es usual el "silenciamiento" de la transcripción previo a la zona de hexámeros TTAGGG) y en los bloques de heterocromatina constitutiva tales como el pericentromérico del cromosoma 1 Además, la metilación de la K9-H3 es parte del proceso de represión transcripcional en el cromosoma X inactivo (lyonizado),[15] es decir que la metilación de la K9-H3 interviene tanto en la heterocromatina constitutiva como en la facultativa. Sin embargo, hay diferencias entre ambos procesos de metilación en los dos tipos de heterocromatina. Una diferencia fundamental es que la heterocromatina constitutiva requiere una proteína auxiliar, la HP1, mientras que el cromosoma X inactivo no requiere esta proteína HP1, y además presenta una trimetilación de una lisina más interna, la K27 H3. La proteína accesoria HP1, propia de la heterocromatina constitutiva, tiene afinidad justamente por la K9-H3 metilada (posee un *cromodominio*) con afinidad para esa histona modificada, y por eso se une a estos nucleosomas con K9-H3 metilada, para a su vez reclutar la proteína humana SUV39H1, que es una metiltransferasa de histonas capaz de metilar otras K9-H3, extendiendo así el proceso represivo de la expresión génica a los nucleosomas vecinos. Por consiguiente, el proceso de heterocromatinización constitutivo requiere varios pasos: 1) la desacetilación de la K9-H3 (porque el acetilo impide su metilación), 2) la metilación de la K9-H3 (por una metiltransferasa del tipo de la SUV39H1), 3) la asociación de la proteína HP1, 4) el reclutamiento de nuevo de la metiltransferasa SUV39H1 para extender la represión a nucleosomas vecinos (fig. 7 5)

A su vez, para limitar esta represión a un sitio determinado, se establecen *barreras de la extensión* de heterocromatinización, la permanencia de acetilación de la lisina 9 de la H3 parece ser un indicador que determina el límite geográfico de la heterocromatina;[14] sin embargo, otras modificaciones de la *cuarta* lisina (K4-H3), tales como su dimetilación, pueden intervenir en la formación de esta barrera. Adicionalmente, la metilación de la lisina 79 también es probable que intervenga en la barrera. Estas barreras (en

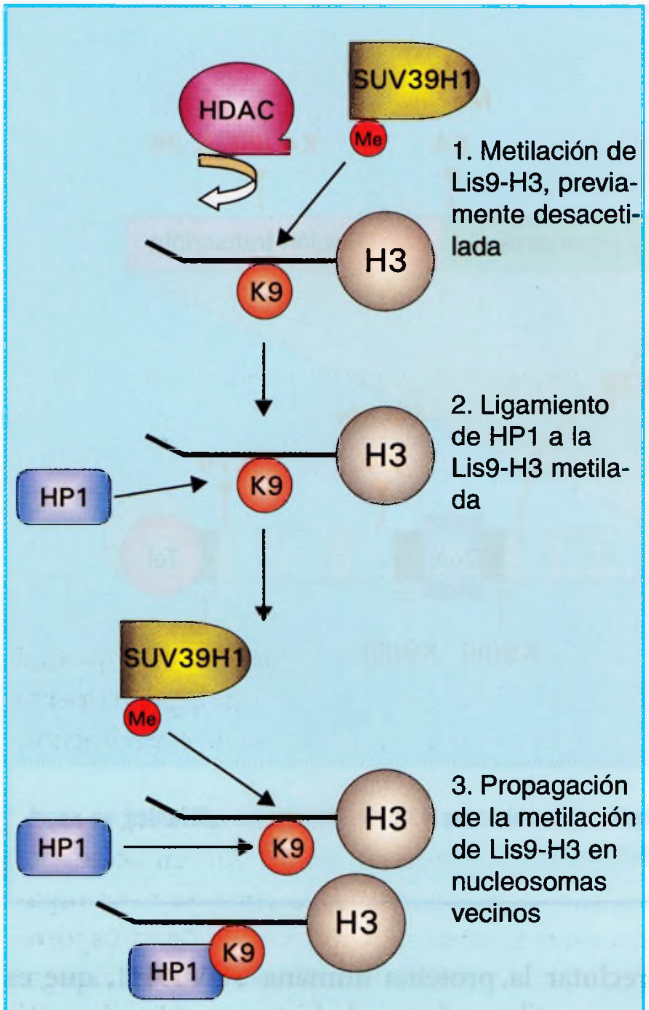


Fig. 7-5. Esquema de la posible secuencia de eventos para establecer una región de represión de la expresión génica por metilación de la K9-H3. La enzima humana SUV39H1 es una metiltransferasa que metila la lisina 9 de H3. La proteína HP1 es necesaria para la manutención del silenciamiento en la heterocromatina constitutiva. Los pequeños círculos rojos pegados a la K9 señalan el grupo metilo

las lisinas 4 y 79) serían puntos de ingreso de acetilasas y factores de remodelación que interfieren con el reclutamiento de silenciadores, y limitan el territorio de represión de la cromatina.[14] La intervención de la metilación de lisina (K20) de otra histona, la H4, es aún poco conocida.

La metiltransferasa humana SUV39H es una proteína que ha cobrado interés en varias áreas médicas, no sólo por su intervención en la organización de heterocromatina por su capacidad metilante de la H3-K9 La SUV39H1 tiene un *cromodominio* (se denomina así a un módulo espacial de unos 50 aa muy conservado evolutivamente, y cuyo nombre deriva de dominio modificador de organización de la cromatina) que se encuentra hacia el extremo N-terminal, y un dominio denominado "SET" cercano al extremo C-terminal,[16] que está relacionado con la interacción o asociación entre proteínas (fig. 7-6)

El "cromodominio" de la metiltransferasa y otras importantes proteínas reguladoras está formado por alrededor de 50 aa que forman tres láminas β rodeando a una hélice alfa (fig. 7 7)

De la misma forma que las proteínas con los *bromodominios* vistas previamente están relacionadas con la *acetilación de histonas* y en general *activación* de la cromatina, las proteínas con *cromodominios* intervienen en la *metilación* de histonas y la *represión* (generalmente) de la cromatina y formación de heterocromatina.

Posibles interacciones entre metilación del ADN y modificaciones de histonas

La metilación de citosinas en ciertas regiones del ADN es un proceso observado en numerosos organismos, en los cuales parece dirigido a inactivar retroposones y otras secuencias de tipo extranjero al propio organismo.[17] Estas metilaciones son catalizadas por ADN metiltransferasas que, por ejemplo, intervienen en la extensa metilación de las CpG en la región génica del gen FMR1, origen del síndrome de X-frágil (véase cap. 18) Sin embargo, la metilación del ADN no es un método general de represión de los genes normales propios. En cambio, parece existir una relación entre regiones metiladas de ADN y reclutamiento del aparato metilante de histonas y, por consecuencia, represión génica permanente. La proteína MECP2, cuyas mutaciones originan el síndrome de Rett, se liga a las regiones metiladas CpG del ADN, y es sugestivo que a su vez esta proteína MECP2 recluta una desacetilasa (HDAC), la cual posibilita finalmente que la represión se haga permanente por la metilación de la K9-H3 (mecanismo general de silenciamiento) [18] Por este motivo se piensa que, si bien en el organismo humano la metilación del ADN no es un proceso defensivo y represivo normal,

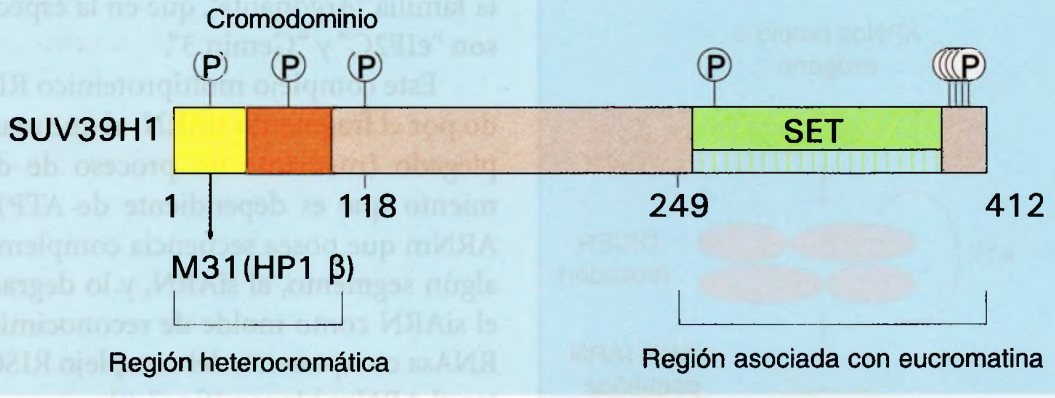


Fig. 7-6. Esquema de la metiltransferasa SUV39H1 con sus dos dominios característicos. El dominio SET y el extremo C-terminal se fosforiian en ia proteína nativa. El dominio izquierdo (cromodominio) se asocia a proteínas de la heterocromatina, como la M31 (en mamíferos) o la HP1 (en otros organismos).

puede gatillar el mecanismo general de silenciamiento cromatínico a través de las modificaciones de histonas.

La expresión génica y los ARN no codificantes: la interferencia de ARN

A partir de 1997 se han acumulado evidencias, en un gran número de organismos, de un fenómeno inesperado: *la interferencia de ARN* (sigla. ARNi) [19] Básicamente, el fenómeno de ARNi consiste en una serie de reacciones originadas en la presencia de un ARN de doble cadena, que es detectada por la célula y pone en marcha el mecanismo que termina *suprimiendo (degradando)* ese ARN de doble cadena, y a veces produciendo otros efectos de tipo represivo, que pueden lograr el silenciamiento permanente del proceso por el cual se origina ese ARN de doble cadena. La interferencia de ARN presenta grandes variaciones entre distintos organismos eucariontes, de modo que aquí se hará referencia a la especie humana, en la cual sólo algunos de los procesos de ARNi están presentes, pero que ya presentan un gran interés médico. Por otra parte, este fenómeno de ARNi ha provisto de una *herramienta tecnológica* para inactivar prácticamente la expresión de cualquier gen en muchos organismos, incluido el humano. Este *aspecto técnico* es de gran utilidad para analizar la función de los genes, por cuanto es más fácil y seguro que el "noqueado" génico (alteración experimental de una parte esencial de un gen), previamente usado para este fin en animales de experimenta ción.

El ARN de doble cadena (ARNdc) que da origen a este proceso, puede ser un sector de ARNm normalmente transcripto por ese organismo, o pueden ser transcriptos de transposones, o pueden ser virus de ARN exógenos al organismo. Incluso este proceso de ARNi puede desencadenarse en células humanas por la introducción experimental de ARNdc, siempre que su longitud no sea mayor que la que desencadena la respuesta inmune contra virus de ARN (más de

Fig. 7-7 Representación de un "cromodominio" propio de las metiltransferasas. Las 3 láminas beta están representadas por flechas y la hélice alfa es el cilindro central con una punta hacia arriba.

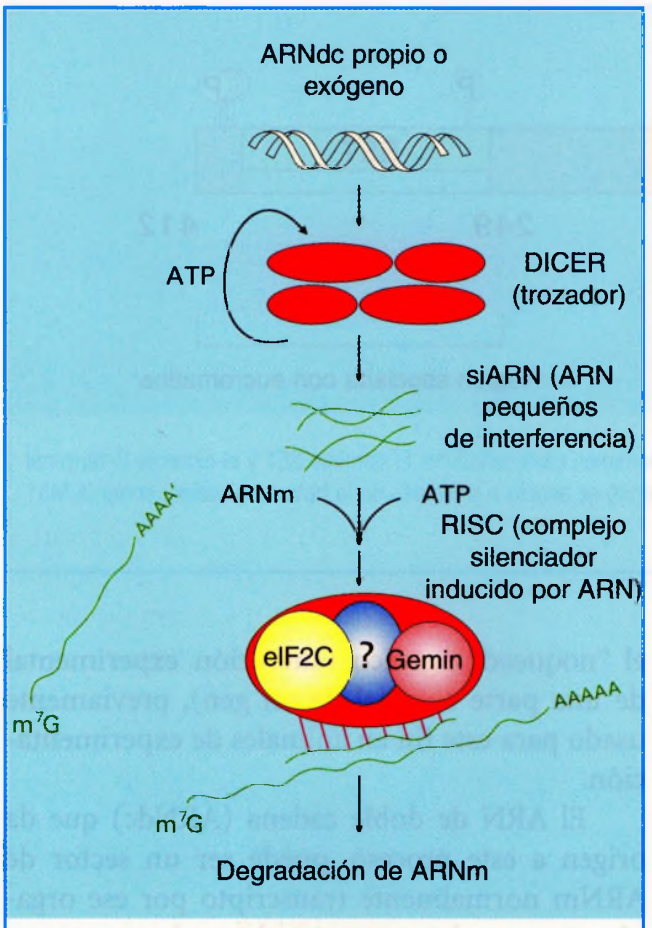


Fig. 7-8. Esquema general del proceso de interferencia de ARN. El ARN de doble cadena puede ser un producto propio de la célula o puede ser exógeno (virus, o ARNdc administrado experimentalmente). m^7G: caperuza de los ARNm.

30 nucleótidos desencadenan la producción de interferón y otras respuestas) [20] Es por ello que para inducir ARNi en mamíferos se usan "ARN pequeños de interferencia" = *s*mall *i*nterference *ARNs*, de sigla *siARNs*) que son ARN de doble cadena y de 21 ó 22 nucleótidos de largo, fabricados ya comercialmente.

El mecanismo general del proceso de ARNi comprende tres etapas (fig. 7-8) [21] En la primera etapa el ARNdc inductor encuentra una RNAsa de tipo III, formada por dos dímeros antiparalelos, que reconoce y corta este ARNdc en trozos menores, muchas veces de 21 a 25 nucleótidos de largo. Estos fragmentos son equivalentes a los ARN pequeños de interferencia (siARNs), que en una segunda etapa son recogidos por un complejo multiproteínico llamado "RISC" (*RNA-induced silencing complex*), que contiene proteínas de la familia "Argonauta", que en la especie humana son "eIF2C" y "Gemin 3"

Este complejo multiproteínico RISC, activado por el fragmento siARN, al que mantiene desplegado (mediante un proceso de desenroscamiento que es dependiente de ATP) busca un ARNm que posea secuencia complementaria, en algún segmento, al siARN, y lo degrada, usando el siARN como molde de reconocimiento y una RNAsa componente del complejo RISC para cortar el ARNm blanco (fig. 7-8).

El papel biológico del fenómeno de ARNi es diferente según los organismos. En vegetales sirve como protección contra la invasión de virus, formando un símil de sistema inmunológico. En algunos invertebrados, además de proteger contra virus, inhibe la proliferación de transposones. En los mamíferos, varios de los componentes de este fenómeno están presentes (el DICER, "trozador" humano, localizado en el citoplasma en células HeLa, y el complejo multiproteínico homólogo de RISC, también asociado al sistema de endomembranas en el citoplasma) [19] El proceso de ARNi humano es diferente del observado en invertebrados y en vegetales: no se inicia con ARNdc mayores de 30 nucleótidos, no se potencia con polimerasas dependientes de ARN, y las proteínas intervinientes son diferentes (aunque algunas son homólogas a las de invertebrados) El papel biológico de este fenómeno en nuestra especie aún no está completamente aclarado, aunque se ha demostrado su utilidad médica, por ejemplo, en la hepatitis C;[22] y existen proyectos de silenciamiento experimental de genes anormales.[23]

Receptores nucleares. Tipos, estructura y elementos de respuesta en el ADN

Un considerable número de moléculas pueden ingresar en el núcleo celular y allí ejercer efectos sobre la expresión de ciertos genes, puesto que esas moléculas encuentran receptores nucleares (proteínas nucleares) que cuando se unen a las moléculas ingresadas (ligandos), actúan como factores de transcripción, activando o silenciando la expresión génica. Los receptores

nucleares no son necesariamente proteínas únicas, ni su función es un proceso directo, sino que muchas veces son complejos de múltiples proteínas, o actúan a través de mediadores (correguladores: correpresores y coactivadores) Los efectos de los receptores dependen de los factores modificantes de histonas y de remodelación de la cromatina, citados en los párrafos previos y que son los elementos básicos de regulación de la expresión génica, por cuanto un receptor no puede ejercer acciones sobre cromatina previamente reprimida en forma permanente. Los receptores nucleares pueden ser receptores hormonales, de proteínas y otras sustancias no hormonales, o pueden considerarse receptores "huérfanos" cuando sus ligandos no son conocidos. Los receptores nucleares conocidos del genoma humano son alrededor de 50.[24] Existe una base datos de receptores nucleares consultable en Internet en http://www.ens-lyon.fr/LBMC/laudet/nurebase html. Los receptores nucleares pueden considerarse miembros de una "superfamilia" y clasificarse en seis subfamilias (cuadro 7 1).[25]

La estructura general de los receptores nucleares contiene dos dominios esenciales y algunos accesorios (fig. 7-9)

Las secuencias de ADN a las cuales se asocian los receptores directamente, o indirectamente a través de otra proteína, se denominan "elementos de respuesta al receptor" o RRE, y, si es un receptor hormonal, se llaman "elementos de respuesta a la hormona" (HRE), que pueden ser secuencias palindrómicas o secuencias repetidas, de corta longitud.

Cuadro 7-1. Clasificación de los receptores nucleares en sus seis subfamilias, con la enumeración de sólo algunos de los receptores miembros*. Hay además un número de receptores "huérfanos" de los cuales se desconoce el ligando. (Basado en los datos de Aranda y Pascual, Physiol Rev 2001; 81:1269-1304.)

Tipo	Receptor (sigla)	Ligando
CLASE I	TR Receptor de hormona tiroidea	Tiroxina (T3-T4)
	RAR Receptor de ácido retinoico	Ac. Retinoico
	VDR Receptor de vitamina D	Vitamina D3
	PPAR Receptor activado por proliferantes peroxisómicos	Eicosanoides y otros
	PXR Receptor de pregnano X	Pregnanos
CLASE II	RXR Receptor de retinoide X	9-cis-ácido retinoico
	HNF4 Factor 4 nuclear de hepatocitos	Tioésteres de ác. grasos-CoA
	TR2 Receptor testicular	No conocido
CLASE III	GR Receptor de glucocorticoides	Glucocorticoides
	AR Receptor de andrógenos	Andrógenos, DHT
	PR Receptor de progesterona	Progestinas
	ER Receptor de estrógenos	Estradiol
CLASE IV	NGF1B (Inducido por factor de crecimiento nervioso)	No conocido
CLASE V	SR-1 Factor esteroideogénico	Oxiesteroles
CLASE VI	GCNF Factor nuclear de células germinales	No conocido

*Subfamilias de receptores nucleares de mamíferos (selección de algunos ejemplos).

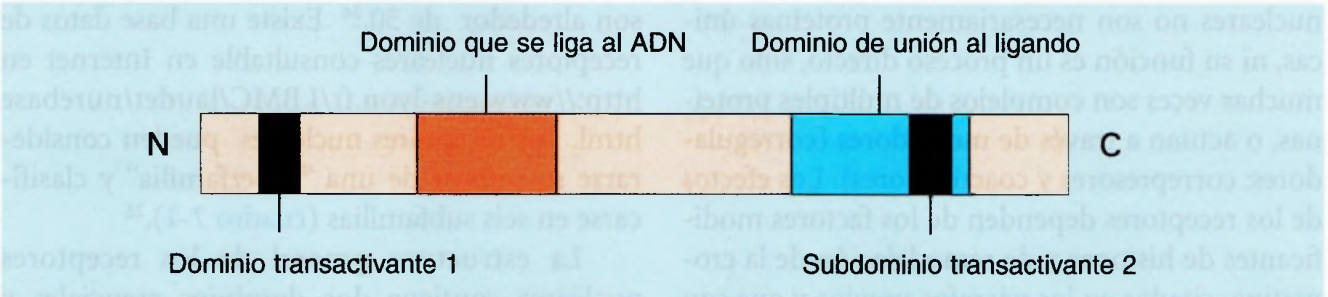


Fig. 7-9. Estructura genérica de los receptores hormonales nucleares humanos. El dominio ligante de ADN contiene dos motivos "dedos de zinc" que contienen un átomo de Zn cada uno, coordinado entre 4 residuos de cisteína, y que reconocen secuencias de ADN. El dominio de unión al ligando (hormona) es más variable y contiene varias hélices α y cambia de forma espacial cuando se une al ligando. Además estos receptores pueden interaccionar con otras proteínas a través de "dominios transactivantes"

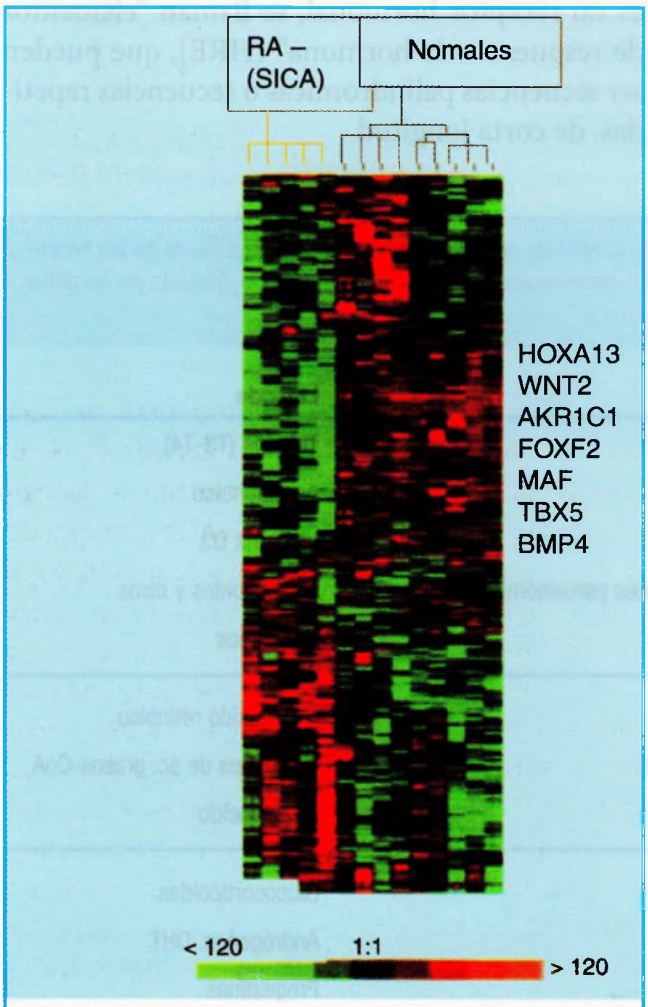


Fig. 7-10. Microarreglos de ADNc provenientes de pacientes con testículo feminizante (SICA; las 5 columnas de la izquierda) y de controles normales (XY· las 9 columnas de la derecha). Las diferencias del nivel de expresión génica se muestran con un código de colores en el cual el color verde señala menos de 200 veces del nivel de expresión señalado por el rojo. Algunos de los genes reguladores con grandes diferencias de expresión están anotados a la derecha. (de Holterhus, et al., Genome Biology 2003; 4: R37 BioMed Central Ltd., http://genome biology.com/2003/4/6/R37

El receptor de andrógenos como ejemplo de regulación estabilizada

El receptor de andrógenos RA es una importante proteína cuyas mutaciones pueden producir el *síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos* (SICA=CAIS, inglés), tam bién conocido como *síndrome de testículo feminizante*, y cuyo gen está en el cromosoma X y es estudiado en el capítulo respectivo. Recientemente se han estudiado con microa rreglos de ADN (véase el capítulo correspon diente) las diferencias de expresión génica entre fibroblastos provenientes de pacientes con SICA y fibroblastos de controles normales (XY) El resultado muestra que hasta 404 productos de transcripción de genes diferentes, sobre un total analizado de 32.968 genes en microarreglos, tienen diferencias mayores de 200 veces en el nivel de expresión génica. Algunos de los genes con estas grandes diferencias de expresión son genes reguladores importantes en el desarrollo embrionario (fig. 7 10) Como los tejidos analizados son de adultos (tanto los pacientes como los norma les), se supone que los efectos más importan tes de las mutaciones del gen RA inician sus efectos en el desarrollo embrionario y quedan estabilizados, a partir de ese momento, por modificaciones de la cromatina, en los clones de fibroblastos. Además de esto, la figura 7 10 muestra un ejemplo del análisis simultáneo de la expresión de miles de genes en un tipo celu lar mediante los microarreglos, tecnología que tiene un uso creciente.

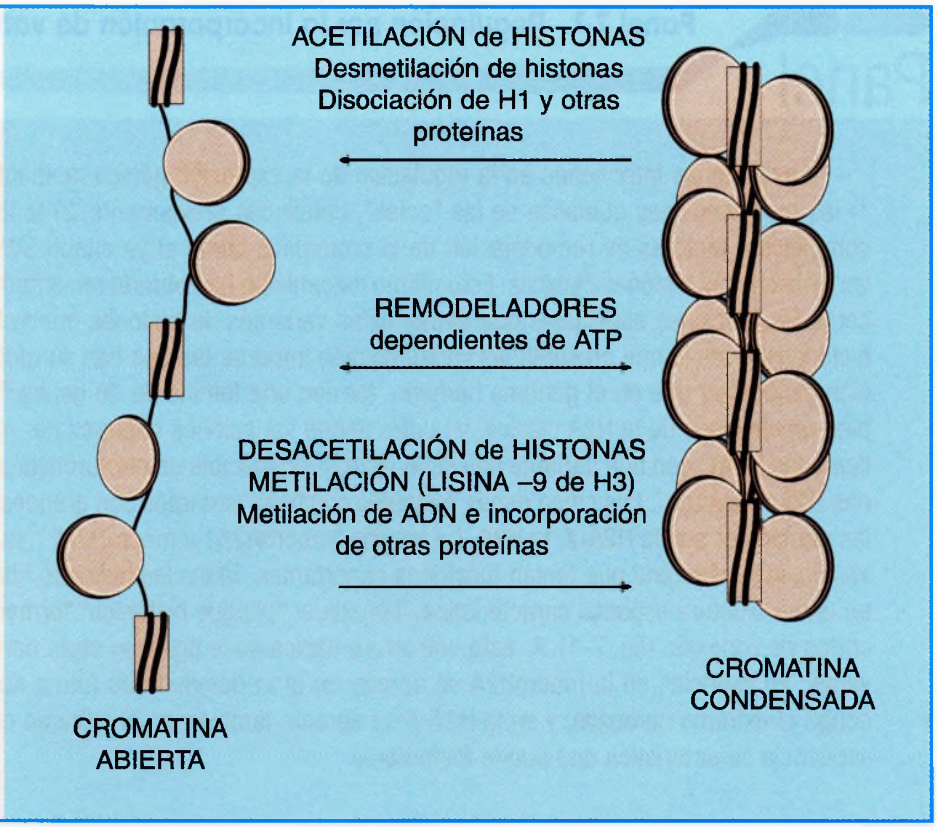


Fig. 7-11 Representación de algunos de los procesos que modulan la expresión génica y determinan por un lado la cromatina "abierta" y transcribible y la cromatina "condensada" o silenciada.

Otras formas de regulación de la expresión génica

En los párrafos precedentes se han descrito algunos de los más básicos procesos de regulación de la expresión génica, pero que no incluyen todos los mecanismos, en especial aquellos que regulan la vida media de los ARN transcriptos y los mecanismos postranscripcionales de regulación, que se estudian en biología celular. Se ha tratado aquí de mostrar la enorme versatilidad de la cromatina para regular esa expresión, en comparación con los mucho más simples sistemas de regulación de los procariontes, que no poseen cromatina. Los avances de los años recientes han mostrado la importancia creciente de las proteínas reguladoras y de la arquitectura de la cromatina en dejar o no que se exprese la información contenida en los exones del ADN, es decir, que los procesos epigenéticos tienen gran relevancia.

Una definición de los procesos epigenéticos

En una historia imaginaria, descrita en la revista *Science*,[27] se establece un intercambio ficticio de cartas entre un genetista del año 1910 y biólogos moleculares del presente, de donde sale nuevamente establecida la noción fundacional de la Genética, ciencia que estudia la herencia y la variación, como procesos, y que no es necesariamente una derivación de cien cias químicas. De allí también sale una defini ción de los fenómenos *epigenéticos* que han sido el tema central de este capítulo. Estos procesos epigenéticos son los que implican cam bios en las funciones génicas, que son transmi sibles por mitosis en clones y meióticamente a otras generaciones, y que no implican necesariamente cambios en la secuencia del ADN Los síndromes de Prader-Willi y de Angelman, y otros fenómenos de herencia de impronta géni ca (véase el capítulo correspondiente) son tam bién representantes de la importancia médica de los procesos epigenéticos.

Como resumen ejemplificador, en la figura 7 11 se resumen algunos procesos de modula ción de la función génica (panel 7 1)

Panel 7-1 Regulación por la incorporación de variantes de histonas

Panel

Las histonas intervienen en la regulación de la expresión génica mediante al menos tres mecanismos: 1) las modificaciones químicas de las "colas", detalladas previamente, 2) la formación o "reclutamiento" de complejos o factores de remodelación de la cromatina, como el ya citado SWI/SNF y 3) la incorporación de variantes de las histonas clásicas. Este último mecanismo ha cobrado recientemente un gran interés, al conocerse las funciones especiales que tienen estas variantes de histonas (macroH2A, H2A-X y H2A-Z).[28,-31] La histona H2A es la que presenta las variantes más importantes que han surgido durante el curso de la evolución biológica y que en el genoma humano forman una familia de 16 genes.[30] Seis de esos genes son simples repeticiones de la H2A clásica, y cuatro tienen variaciones mínimas de menos de 4 aa, todas entonces llamadas H2A1, con una variante adicional (H2A2) reconocible electroforéticamente: son todas ellas las histonas H2A "mayores". Los cinco genes restantes codifican variantes con grandes diferencias de las "mayores"; las principales son la H2A-X, la H2A-Z y las dos "macroH2A1 y macroH2A2", que presentan una gran *conservación*, lo cual sugirió que tenían funciones importantes. Todas las histonas "clásicas" (nucleosomales) poseen una estructura espacial característica, llamada el "pliegue histónico" formado por tres hélices alfa y lazos cortos de conexión (fig. 7-1). A esta estructura básica se le agregan otras partes en estas variantes conservadas; en especial, en la macroH2A se agrega un gran dominio que forma dos tercios de la proteína y que ocupa el extremo carboxilo, y en la H2A-X se agrega, también en el extremo carboxilo, una corta cola con la secuencia característica que puede fosforilarse.

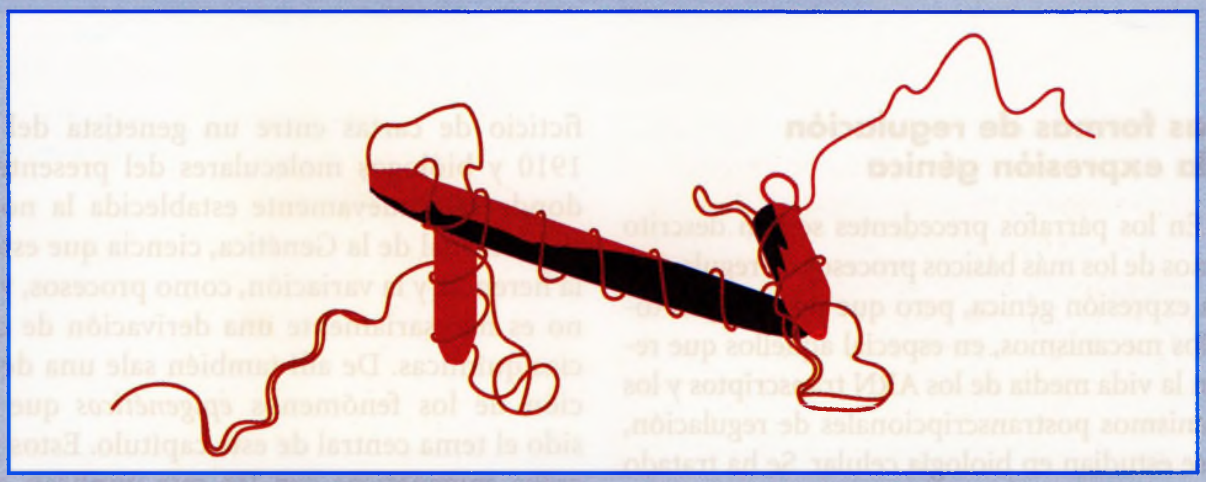


Fig. 1. Estructura espacial de la histona clásica H2A, que muestra sus tres hélices alfa (cilindros con un extremo cónico) unidos por lazos cortos, que constituyen en conjunto el "pliegue" típico de las histonas. Se aprecian las dos "colas", la amino-terminal, a la derecha, y la carboxilo-terminal a la izquierda; a esta última se le adicionan segmentos importantes en las variantes de H2A: las macroH2A y la H2A-X.

La histona variante H2A-X (cuya forma fosforilada se llama gammaH2A-X) está asociada con el procesamiento y reparación de las fracturas dobles de las dos cadenas del ADN, ya sean fisiológicas, accidentales o provocadas. En este sentido, la presencia de esta variante en un lugar del núcleo celular, detectable con un anticuerpo y por inmunofluorescencia, es un buen marcador de la presencia de fracturas de doble cadena. Esto ocurre en al menos tres importantes procesos: en los *linfocitos T*, en los que ocurre fisiológicamente una recombinación entre los ADN codificantes de regiones variables y regiones constantes de inmunoglobulinas; en la *apoptosis*, en la cual la presencia de endonucleasas desencadena la aparición de la gammaH2A-X, y en la profase *meiótica*, donde la enzima SPO11 produce fracturas de doble cadena del ADN para iniciar la recombinación (véase cap. 12). Además, cuando se irradia un organismo con radiaciones ionizantes, rápidamente

(en menos de un minuto,[30]) aparecen "focos" de gammaH2A-X en los núcleos celulares. La forma activada de esta histona, gammaH2A-X, es fosforilada en su extremo carboxilo, en la secuencia consensuada SQEY (serina-glutamina-glutámico-tirosina), donde la serina es el cuarto residuo empezando del extremo carboxilo, y es fosforilada por la quinasa ATM (ataxia-telangiectasia mutated) o por una quinasa activada por ADN (DNA-PK).

Las dos macroH2A están relacionadas con la inhibición de la transcripción, de tipo facultativo, con algunas diferencias entre ambas, y las dos presentan un notable grado de conservación (un 95% de homología entre las proteínas del pollo y las de rata, separadas por 300 millones de años de evolución).[29] La macroH2A1 de rata (367 aa) y la humana (372 aa) son casi idénticas (fig. 2). La humana está codificada por el gen *H2AFY* (*H2A histone family, member Y*), presente en el cromosoma 5 q31.1.

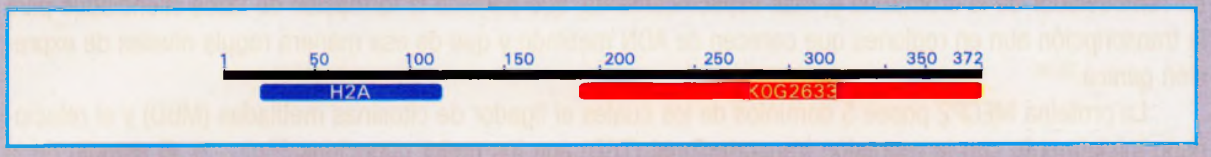


Fig. 2. Esquema de la variante macroH2A1. La región del extremo amino (azul) es homóloga de la histona clásica H2A. El resto (2/3) incluido el extremo carboxilo, forma una región (rojo) desvinculada de las histonas, con capacidad enzimática y muy conservada.

Panel 7-2. El síndrome de Rett y la represión de la expresión génica

El síndrome de Rett es uno de los más frecuentes orígenes de retraso mental profundo en mujeres, con una incidencia de 1:10.000-1:15.000 nacimientos. El gen mutado es el de la proteína 2 ligante de citosinas metiladas (en secuencias metil-CpG) del ADN, MECP2, que se localiza en el cromosoma X en Xq28, y cuyo reconocimiento llevó a aclarar considerablemente el origen de esta dolencia.[11, 12]

El síndrome de Rett es una enfermedad neurológica muy severa, que afecta casi exclusivamente a mujeres. Aunque se han informado casos similares en varones [32] se estima que es frecuentemente letal en ellos. Este síndrome debido a alteraciones del gen *MECP2*, ligado al cromosoma X humano, debería ser expresado siempre por los portadores varones. Sin embargo, como ocurre con otros genes localizados en el cromosoma X tales como el gen determinante de la *incontinentia pigmenti*, sus mutaciones dominantes muestran un patrón característico de dominancia ligada al sexo femenino, y en los varones son raramente detectadas puesto que su severidad es aun mayor y determina la muerte prenatal o en el primer año de vida.

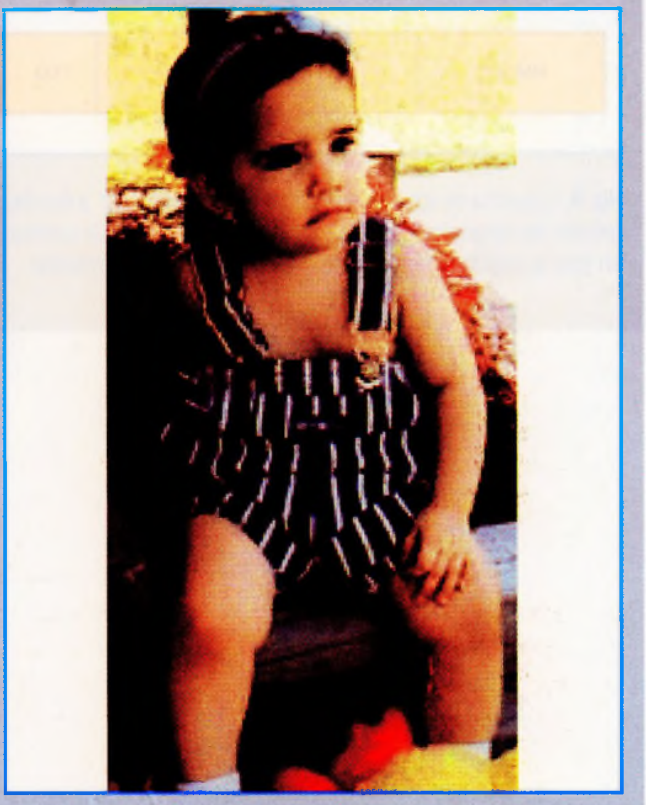


Fig. 1. Niña con síndrome de Rett. Inexpresiva, sin fijar la mirada, con trastornos de lenguaje y de la coordinación muscular, además del retraso mental.

En las niñas, al nacer, el aspecto y el desarrollo parecen normales, hasta que entre los 6 y los 18 meses de vida el desarrollo neurológico parece detenerse, el crecimiento de la circunferencia craneana se estanca, las conductas normales del lactante se van perdiendo, surgen movimientos estereotipados de las manos (sin objeto alguno) y si bien las niñas continúan con vida, padecen un profundo retraso mental ya en los primeros años (fig. 1 de este panel).

El gen *MECP2* codifica una proteína reguladora, que actúa dentro del núcleo celular, en principio, sobre sectores del ADN que contienen el dinucleótido CpG con la citosina metilada. La búsqueda de los genes "blanco" o diana no ha terminado todavía, pero hay evidencias sustanciales de que la proteína no es un represor global de la transcripción y tampoco es imprescindible para la represión transcripcional en el cerebro, como se pensó inicialmente. Los datos experimentales actuales indican que la proteína MECP2 actúa como un factor remodelador de la cromatina y, más específicamente, que permite la formación de lazos silenciados para la transcripción aun en regiones que carecen de ADN metilado y que de esa manera regula niveles de expresión génica.[33,34]

La proteína MECP2 posee 5 dominios de los cuales el ligador de citosinas metiladas (MBD) y el relacionado inicialmente con la represión transcripcional (TRD) son los mejor conocidos.[33] (fig. 2). El estudio de la localización de las mutaciones en los distintos dominios ha permitido relacionar ciertas mutaciones con fenotipos especiales.[33]

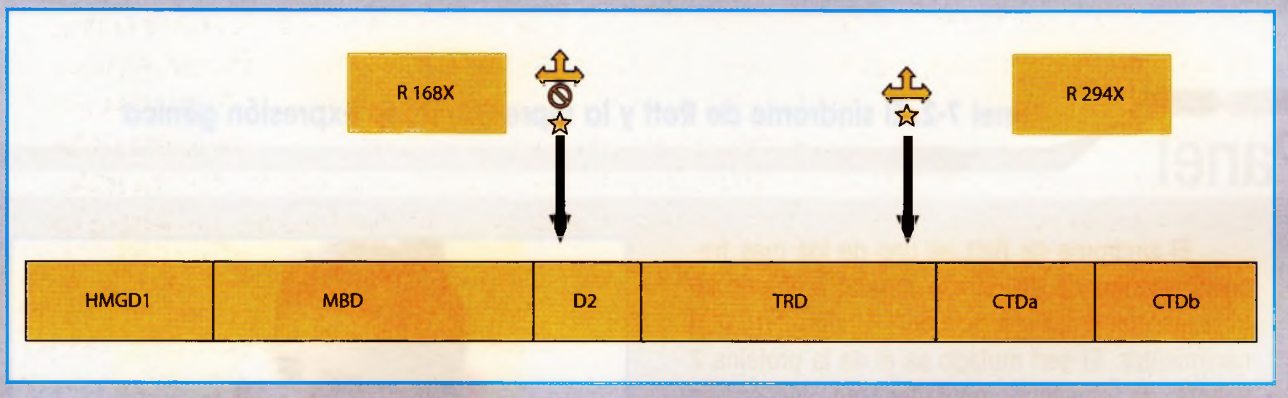


Fig. 2. Esquema de los dominios de la proteína MECP2 y dos de sus mutaciones que se relacionan con rasgos del fenotipo. Estrellas: defecto del lenguaje; signo de prohibido, incapacidad de caminar; flechas triples, movimientos estereotipados. Las mutaciones revelan que la región C-terminal es importante en la enfermedad.

RESUMEN

La transición evolutiva entre los procariontes, con nucleoides de ADN mayormente desnudo, y eucariontes, provistos de cromatina, significó un paso muy importante no sólo para la formación de cromosomas verdaderos, sino un gran avance en la versatilidad con la cual las células eucariontes pueden regular la expresión de la información de su ADN. Los nucleosomas no son solamente partículas que enrollan dos vueltas de ADN (147 pares de bases) sino que presentan exquisitas variedades de modificaciones químicas en sus "colas", en especial la histona H3 y la H4, formando lo que se ha llamado un "código de histonas".

Las enzimas que acetilan las colas de histonas (HAT o histona-acetilasas) son en general "activadoras" de la expresión génica, y al contrario, las CoA-HDAC (desacetilasas de histonas unidas a coenzima A) son silenciadoras de la expresión en la cromatina. La activación del gen del interferón beta es un caso clásico de intervención de una HAT, que luego recluta otra proteína SWI/SNF, que a su vez recluta el factor de transcripción basal TFIID, ambas con un "bromodominio" que reconoce residuos acetilados específicos de H3 y de H4. La *metilación* de "colas" de histonas, en especial de la lisina 9 de la H3, es de gran importancia funcional, puesto que determina el "silenciamiento" permanente de la cromatina, y es un elemento básico para la formación de heterocromatina constitutiva y también facultativa. En la constitutiva, la metiltransferasa más importante (SUV39H1) metila la lisina 9 de H3 y recluta la proteína accesoria HP1, ambas capaces de reconocer regiones con lisina 9 metilada y que contienen un "cromodominio" especial. A su vez, para especificar los límites de la heterocromatina, hay otras modificaciones de histonas que establecen una "barrera" a este silenciamiento. En el síndrome de Rett (véase panel 7-2) falla una proteína ligante de metilcitosinas, MEC2P, que normalmente se une a dos proteínas, una de ellas una HDAC. Este proceso no se realiza y quedan inactivadas regiones génicas aún no determinadas que llevan a un serio retraso mental y neuromuscular.

El fenómeno de interferencia de ARN (RNAi) es una reacción celular ante la presencia de ARN de doble cadena, muy extendida en muchos organismos, incluso el humano. En esta reacción interviene un tetrámero proteínico "trozador" (DICER), que convierte el ARNdc en segmentos de alrededor de 21 nucleótidos, (siRNA), los que se unen a otro complejo multiproteínico (RISC) el cual degrada ARNm que tenga complementariedad exacta de secuencias con los siARN. De esta forma, el proceso de ARNi silencia la expresión génica de genes específicos y puede usarse experimentalmente como herramienta silenciadora.

Los receptores nucleares son factores de transcripción que responden a un ligando especial, hormonal o no, y que forman una gran superfamilia que comprende seis familias de receptores especiales. El receptor de andrógenos humano (RA), cuyo gen está ligado al cromosoma X y cuyas mutaciones determinan el síndrome de testículo feminizante, actúa durante la época embrionaria regulando la expresión de más de 400 genes, los cuales son individualizables en microarreglos de ADN. Los fenómenos "epigenéticos" comprenden las modificaciones de las funciones génicas que son heredables y que no involucran un cambio en la secuencia de bases del ADN; poseen gran interés médico, en especial en anomalías de la "impronta" génica.

REFERENCIAS

1 Elgin SCR, Workman JL. Chromosomes and expression mechanisms. A year dominated by histone modifications, transitory and remembered. Curr Opin Genet Dev 2002; 127 129.

2. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. Nature 2000; 403:41-45.
3. Gabellini D, Tupler R, Green MR. Transcriptional derepression as a cause of genetic diseases. Curr Opin Genet Dev 2003;13:239-245.

4. Huang C, Sloan EA, Boerkoel CF Chromatin remodelling and human disease. Curr Opin Genet Dev 2003;13:246-252.
5. Davey CA, Sargent DF Luger K, Maeder AW, Richmond JT. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle al 1.9 A resolution. J Mol Biol 2002;319:1098-1113.
6. Luger K Structure and dynamic behavior of nucieosomes. Curr Opin Genet Dev 2003;13:127 135.
7 Pennings S, Meersseman G, Bradbury EM. Mobiiity of positioned nucieosomes on 5S rDNA. J Mol Biol 1991;220:101 110.
8. Becker PB. Nucleosome sliding: facts and fiction. EMBO J 2002;21:4749-4753.
9. Agalioti T, Chen G, Thanos D. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. Cell 2002;111:369-379.
10. Yang X-J, Seto E. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. Curr Opin Genet Dev 2003;13:143-153.
11 Shahbazian MD, Zoghbi HY. Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. Am J Hum Genet 2002;71·1259-1272.
12. Amir RE, Van der Veiver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP" encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet 1999;23:185-188.
13. Sims RJ, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. Trends in Genet 2003;19:629-639.
14. Grewal SIS, Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. Science 2003;301·798-802.
15. Peters AHFM, Mermoud JE, O'Carroll D, Pagani M, Schweizer D, Brockdorff N, Jeniwein T. Histone H3 lysine methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. Nat Genet 2002;30:77-80
16. Marmorstein R. Structure of SET domain proteins: a new twist on histone methylation. Trends Biochem Sci 2003;28:59-62.
17 Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. Curr Opin Genet Dev 1999;9:158-163.
18. Fuks F Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP Kouzarides T The methyl-CpG-binding protein MECP2 links DNA methylation to histone methylation. J Biol Chem 2003;278:4035-4040.
19. Cerutti H. RNA intereference: travelling in the cell and gaining functions? TIGS 2003;19:39-46.
20. Baglioni C, Nilsen TW. Mechanism of antiviral action of interferon. Interferon 1987;5:23-42.
21 Denli AM, Hannon GJ. RNAi: an ever growing puzzle. TIGS 2003;28:196-201
22. Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. PNAS USA 2003;100:2014-2018.
23. Moss EG. Silencing unhealthy alleles naturally. Trends in Biotechnol 2003;21·185-187
24. Duarte J, Perriere G, Laudet V, Robinson-Rechavi M. NUREBASE: database of nuclear hormone receptors. Nucl Ac Res 2002;364-368.
25. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. Physiol Rev 2001·1269-1304.
26. Holterhus P-M, Hiort O, Demeter J, Brown PO, Brooks JD. Differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor. Genome Biol 2003;4:R37
27 Wu C-T Morris JR. Genes, genetics and epigenetics: a correspondence. Science 2001·1103-1105.
28. Perche, P-Y, Robert-Nicoud M, Khochbin S., Vourc'h C. Differentiation du nucleosome: le role des variants de l'histone H2A. M/S 2003;19:1137 1145.
29. Pehrson JR, Fuji RN. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. Nuc Ac Res 1998;26: 2837-2842.
30. Redon C, Piich D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. Curr Op Genet Dev 2002;12:162-169.
31 Bassing CH, Alt FW. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in ciose proximity. Cell Cycle 2004;3:149-153.
32. Villard L. MECP2 mutations in males. J Med Genet 2007;44:417-423.
33. Hite, KC, Adams VH, Hansesn, JC. Recent advances in MECP2 structure and function. Biochem Cell Biol 2009;87:219-227
34. Thambirajah, AA, Ausió, J. A moment`s pause: putative nucleosome-based influences on MeCP2 regulation. Biochem Cell Biol 2009;87·791 798.

REFERENCIAS ADICIONALES

Anand R, Marmorstein R. Structure and mechanism of lysine-specific demethylase enzymes. J Biol Chem 2007;282:35425-35429.

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. Nat Rev Genet 2009;10:32-42.

Naqvi AR, Islam NM, Choudhury NR, Haq QM. The fascinating world of RNA inerference. Int Biol J Sci 2009;5:97-117

Capítulo 8

Mutación

Definición y clasificación de las mutaciones. Tasas de mutación. Mecanismos de las mutaciones. Sistemas de reparación del ADN. Enfermedades asociadas. Conservación de las secuencias del ADN. Mutágenos. Espectros de mutación. Reparación de rupturas de doble cadena. convergencia de áreas de Genética

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Se denomina "mutación" a todo cambio permanente en la secuencia de bases del ADN de un organismo. Por consiguiente, las mutaciones son fenómenos que ocurren a un nivel molecular y no son observables (en principio) mediante el examen de los cromosomas con el microscopio, sino que para su detección se requieren métodos de examen de moléculas, tales como la secuenciación del ADN o la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) mediante primeros específicos.

Los cambios *cromosómicos*, que a veces han sido denominados "mutaciones cromosómicas", tienen nombres específicos: cambios numéricos (aneuploidías) y reordenamientos o rearreglos estructurales (inversiones, translocaciones, deleciones), y son diagnosticables mediante métodos microscópicos. Por lo tanto, es preferible tratar separadamente estos dos tipos de fenómenos y reservar el nombre de mutación para los cambios moleculares. En ciertos casos como las microdeleciones[1] y las translocaciones crípticas[2] que afectan regiones cromosómicas pequeñas, como una sub-banda, y que físicamente se corresponden con cantidades cercanas a una megabase de ADN, un cambio cromosómico puede aproximarse al campo de las mutaciones pero, en general, hay una distinción clara entre ambos tipos de fenómenos. Los cambios que afectan segmentos de ADN menores a unas 10 megabases son submicroscópicos con los métodos tradicionales de examen con microscopio de luz, pero el uso creciente de hibridación in situ y fluorescencia revelan ahora cambios menores (véase cap. 18)

Tipos de mutaciones

Las mutaciones pueden clasificarse de acuerdo con un criterio *morfológico* o de acuerdo con un criterio *funcional* (fig. 8-1)

De acuerdo con su *morfología*, las mutaciones pueden ser·

a) *Puntuales* (afectan una única base, es decir, un par de bases complementarias) Este tipo de mutación consiste en un error en la estructura química de una base, lo cual determina que, al replicarse el ADN, en vez de incorporar la base complementaria correcta, se incorpore una diferente. Estas mutaciones puntuales son *sustituciones* de bases, y a su

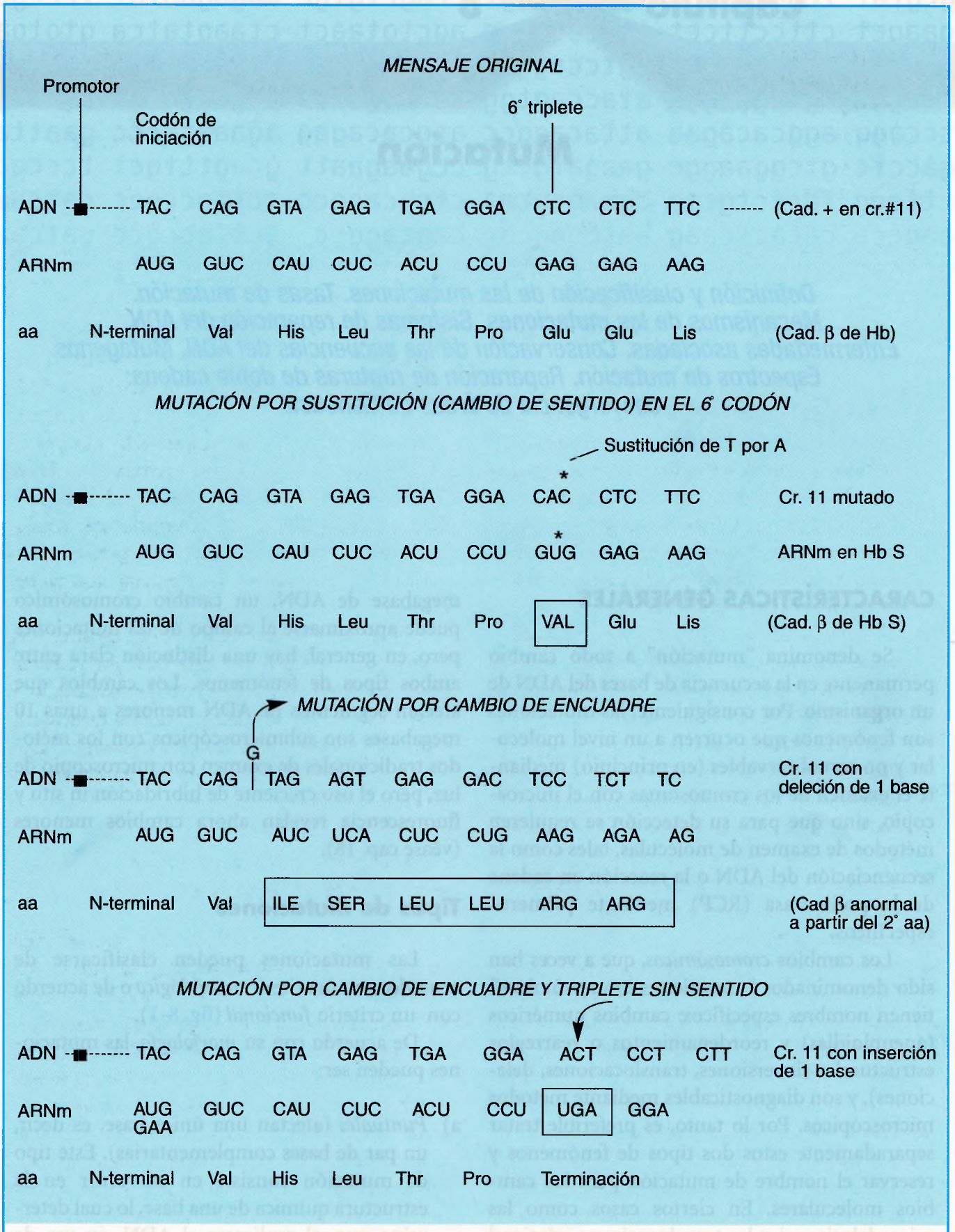


Fig. 8-1 Varios tipos de mutación ejemplificados por las secuencias para la cadena β de la hemoglobina humana (Hb), cuyo ADN se encuentra en el cromosoma 11. La Hb S es una hemoglobina anormal (de la anemia falciforme). Los sectores envueltos por un recuadro son aminoácidos erróneos en la proteína final y el codón UGA de terminación.

vez se clasifican en *transiciones*, cuando el cambio ocurre de una base de tipo purínico a otra purina, o de una base pirimídica a otra, y *transversiones*, cuando el cambio es de una pirimidina a una purina (p. ej., de citosina a adenina) o viceversa.

b) *De extensión variable o segmentarias* (cuando pueden afectar más de una base) Pueden ser· *deleciones*, *inserciones*, o *expansiones de repeticiones de tripletes* (véase más adelante)

Desde el punto de vista *funcional*, las mutaciones pueden ser·

a) *Silenciosas.* En este caso no se observa ningún efecto en el fenotipo y no parecen ser influidas por la selección natural. Corresponden a cambios de bases en regiones no codificantes que tampoco contienen secuencias de control, por ejemplo en ADN satélite, en minisatélite, en la parte media de intrones, en retroposones, etcétera.
b) *De cambio de encuadre* (por deleción o inserción) En este caso se produce un cambio en el "marco" de lectura de los tripletes, por la pérdida o la adición de una o dos bases, o por inserción de una o dos (o múltiplos de dos) Dado que el efecto de la deleción de una base puede ser compensado por la inserción de otra (y viceversa), existen mutaciones "compensadoras" que revierten parcial mente el efecto de cambio de encuadre (corrigen el mensaje a partir del lugar de la segunda mutación)
c) *Sin sentido.* Corresponden al cambio de una base que convierte un triplete codificante en uno sin sentido, que al ser reconocido por los factores de terminación produce la cesa ción de la cadena polipeptídica en ese nivel (dan interrupción de síntesis proteínica)
d) *De cambio de sentido* (limitado a un triplete; son las sustituciones)
e) *De elementos de control.* Corresponden a mutaciones que afectan secuencias tales como un promotor, un intensificador u otras secuencias reguladoras.
f) *De expansión de repetición de tripletes.* Este tipo de mutación ha sido reconocido en años recientes como un importante factor causal de varias enfermedades hereditarias, en especial de herencia "dominante", como la corea de Huntington, la distrofia miotónica y el síndrome del "X frágil" (véase más adelante)

En todos los tipos de mutaciones, el error en la secuencia debe ser autorreproducible en cada división celular, pues de lo contrario quedaría limitado a la única célula en la que se ori ginó, la cual podría morir (apoptosis) sin consecuencias mayores para un organismo multicelular. Por otra parte, al hablar de mutaciones clásicas se sobreentiende que la mutación afecta la línea germinal, para ser transmitida a la próxima generación ("mutación germinal") En la línea germinal, en diferentes etapas del desarrollo, hay un número considerable de células (gonocitos, ovogonios, espermatogonios y sus derivados) que pueden ser afectadas por mutaciones.

Mutaciones somáticas. Se denominan "mutaciones somáticas" aquellas que ocurren originariamente en células no germinales, con capacidad de formar clones (células troncales) Estas mutaciones somáticas, si bien no son hereditarias, son importantes en Medicina puesto que pueden originar tumores.

Mutaciones por expansión de tripletes repetidos

En forma inesperada, en 1991 se identificó un nuevo tipo de mecanismo mutacional en pacientes con síndrome de X frágil, consistente en la expansión de regiones de ADN que contienen normalmente tripletes repetidos (p. ej., un determinado triplete repetido 10 veces), por este mecanismo, el número de repeticiones aumenta desde el número normal a un número en el cual se desencadena la enfermedad.[3] Además, se veri ficó la existencia de números intermedios de tripletes repetidos en los progenitores de pacientes. Este tipo de mecanismo mutacional no es raro, puesto que en poco tiempo se lo identificó en seis enfermedades humanas[4] y actualmente se conocen más de 40 enfermedades neurológicas

atribuidas a esta clase de mutaciones (también llamadas "dinámicas" e "inestables")

Mutaciones espontáneas y mutaciones inducidas

Se denominan mutaciones espontáneas aquellas que ocurren en organismos en condiciones ambientales normales o en microorganismos en condiciones normales de cultivo.[5] En contraste, son mutaciones "inducidas" aquellas que ocurren bajo condiciones específicas, en las que se postula un agente mutagénico determinado como *acelerador* de la tasa espontánea de mutación, es decir que la mducción de mutaciones, en general, no produce mutaciones específicas de un gen, sino una mayor frecuencia de todo tipo de mutaciones. El carácter espontáneo de las mutaciones en ambientes normales muestra que las mutaciones (en una tasa "basal" o usual) son factores normales en la vida de los organismos. En realidad, las mutaciones son elementos *imprescindibles* para la evolución biológica (véase más adelante)

TASAS DE MUTACIÓN

Tasas de mutación espontánea

Las tasas de mutación espontánea son más difíciles de establecer en la especie humana que en organismos unicelulares, puesto que en estos últimos se establece en los cultivos. Las células humanas en cultivo son útiles para establecer tasas de mutación cuando se conoce el producto génico o la secuencia del gen; sin embargo, en la práctica las tasas de mutación humanas se dedu cen por la incidencia de nuevas mutaciones dominantes, tales como las que provocan corea de Huntington, neurofibromatosis o acondroplasia. Con esta metodología, las tasas de mutación (dominantes) oscilan entre 1×10^{-5} y 10×10^{-5} Las tasas de mutación mencionadas se expresan siempre para un *gen determinado* y por generación (del organismo humano, alrededor de 20 años) Las tasas de mutación espontánea humanas miden especialmente la probabilidad de que se originen errores graves que inactivan un gen,

Cuadro 8-1. Tasa de mutación espontánea (por gen y por generación) para algunos genes humanos determinantes de enfermedades

Gen	Tasa de mutación (método directo)
Corea de Huntington	1×10^{-5}
Neurofibromatosis (NF-1	16×10^{-5}
Acondroplasia	10×10^{-5}
Retinoblastoma	$2{,}5 \times 10^{-5}$
Osteogénesis imperfecta (OI-1	$1{,}8 \times 10^{-5}$
Esclerosis tuberosa	$1{,}2 \times 10^{-5}$

es decir, que determinan una variante génica incapaz de funcionar, llamado *alelo nulo.* Las tasas humanas (cuadro 8-1) muestran que este tipo de fenómeno es relativamente raro. Recientemente se han efectuado estudios poblacionales que han aclarado también que las tasas de mutación *para un mismo gen* son mayores en los varones (panel 8-1) [6,7]

Relación entre tasa de mutación espontánea y cambios en el ADN

Las tasas de mutación espontánea útiles en Medicina se refieren a genes específicos (esto es, al lugar o *locus* de un gen determinado) Estas tasas revelan la probabilidad de daño espontáneo grave a un sector codificante y bien definido en el ADN Sin embargo, muchas veces ocurren otros tipos de cambios en el ADN que no llegan a expresarse como enfermedades, o que ni siquiera llegan a expresarse de ninguna manera en el aspecto del organismo, porque afectan regiones no codificantes en el ADN, o porque aun afectando una región codificante, reemplazan un aminoácido por otro en una región de la proteí na que no afecta su función normal. Éstos son ejemplos de mutaciones "silenciosas" y que pueden crear "polimorfismos" (véase más adelante)

Las tasas de mutación no expresan *todos* los cambios que se producen en el ADN y tampoco el promedio, porque en realidad suceden muchos más cambios a nivel del ADN Si se consideran una población de 100.000 habitantes y el

Panel 8-1. La tasa de mutación de los genes humanos es considerablemente mayor en el varón

Panel

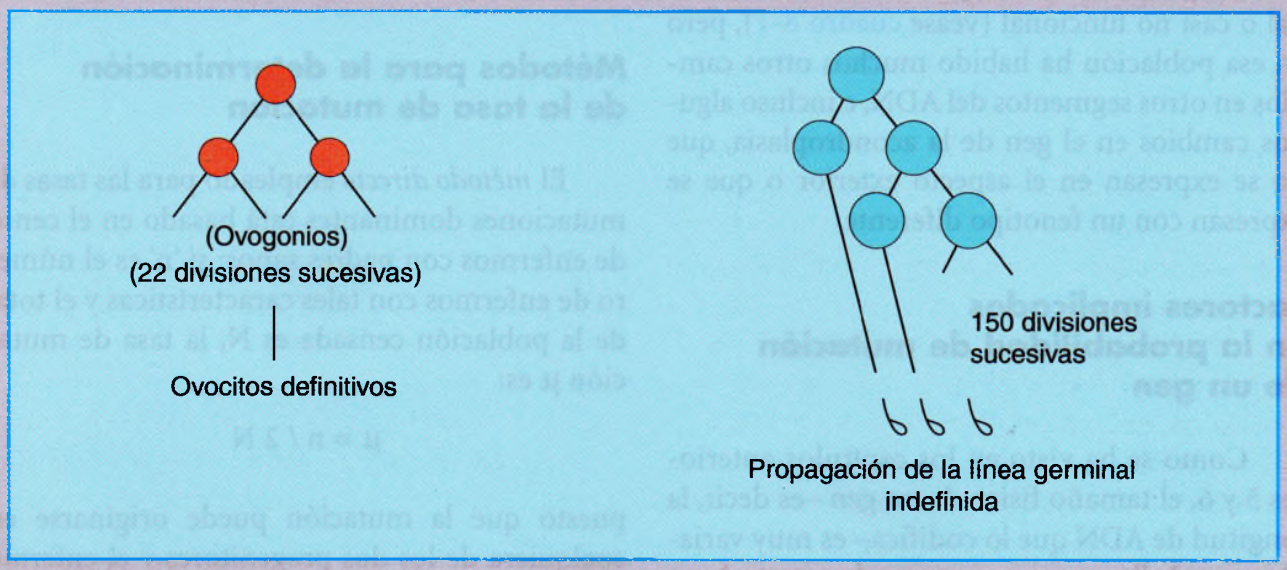


Fig. 1. Mitosis en la ovogénesis (izquierda) y en la espermatogénesis (derecha), como posible origen de las diferentes tasas de mutación entre varones y mujeres.

Estudios recientes han permitido confirmar que la tasa de mutación es variable de acuerdo con el sexo y que es considerablemente mayor en el varón.[6,7] En un estudio muy abarcativo de la población de Gran Bretaña, y aprovechando las ventajas metodológicas del estudio de la hemofilia B (los pacientes están casi totalmente registrados y sus familiares son accesibles), se tomó al gen del factor IX (cuya mutación causa la hemofilia tipo B) como modelo para determinar la tasa de mutación sobre casi 60 millones de personas. La tasa de mutación nueva (de novo) en la hemofilia B es alta con respecto a la transmisión de una mutación originada previamente, de modo que este gen es apto como modelo. Se observó que la tasa de mutación en varones es de $18{,}8 \times 10^{-6}$, pero en la mujer la tasa de mutación es sólo $2{,}18 \times 10^{-6}$, es decir que la tasa de mutación de este gen es en los varones 8,6 veces mayor que en las mujeres.[6] Aunque las tasas de mutación son diferentes para distintos genes (véase el texto principal) esta mayor tasa de mutación en el sexo masculino parece ser generalizable a todo el genoma, aunque no se posean todos los datos deseables para analizar mejor este tema[7] (Ellegren, 2007). La explicación tentativa más conocida de la mayor mutabilidad del varón estriba en las diferencias entre el número de divisiones en la ovogénesis y en la espermatogénesis (fig. 1). Mientras en la ovogénesis la proliferación de células germinales cesa definitivamente entre el 4° y 5° mes de desarrollo intrauterino, y luego se transforman en ovocitos definitivos (de los cuales ovulan unos 500 en total), en la espermatogénesis, a partir de la pubertad hay proliferación indefinida de cohortes de espermatogonias, con un número de divisiones estimado en 23 por cada año a partir de la pubertad. Por consiguiente, el total de mitosis que atraviesa la línea germinal femenina se estima en sólo 22 divisiones sucesivas, mientras que en la línea masculina, dependiendo de la edad, es de 150 divisiones a los 20 años de edad, y 610 divisiones a los 40 años.[7] Dado que hay evidencias considerables acerca del aumento de la probabilidad de producirse una mutación con el transcurso de muchas divisiones celulares (véase texto principal) esta hipótesis, aunque no sea completamente satisfactoria, es un inicio de explicación de la mayor mutabilidad en el varón, lo cual ha llevado a considerar que el origen de las variedades en la evolución está dirigido por el sexo masculino.

gen determinante de la acondroplasia, en esa población hay 200.000 genes de ese tipo (cada persona posee 2) y la tasa de mutación espontánea mide la probabilidad de que uno de esos 200.000 alelos (variantes génicas) sea no funcional o casi no funcional (véase cuadro 8-1), pero en esa población ha habido muchos otros cambios en otros segmentos del ADN, e incluso algunos cambios en el gen de la acondroplasia, que no se expresan en el aspecto exterior o que se expresan con un fenotipo diferente.

Factores implicados en la probabilidad de mutación de un gen

Como se ha visto en los capítulos anteriores 5 y 6, el tamaño físico de un gen –es decir, la longitud de ADN que lo codifica– es muy variable y puede llegar a ser muy grande, como el gen de la distrofina, que ocupa más de 2 Mb de ADN ($> 2 \times 10^6$ pares de bases) También es obvio que las secuencias de genes diferentes poseen generalmente distintas frecuencias de bases, distintos números de intrones y de repeticiones de bases.

Ciertos factores influyen en la probabilidad de mutación de un gen y hacen que las tasas de mutación sean disímiles para genes diferentes:

1 Tamaño génico. Cuanto mayor es la extensión del ADN ocupada por un gen, mayor es la probabilidad de que ocurra un error en la replicación del ADN de esa región y una consiguiente mutación. El gen de la distrofina y el de la neurofibromatosis son muy grandes y su tasa de mutación consiguientemente es alta.
2. Tipo de secuencias de bases. Ciertas bases, tales como la citosina cuando está metilada (5-metil citosina), son especialmente proclives a producir errores. Por otra parte, las secuencias que contienen repeticiones de bases, de dobletes de bases y de tripletes de bases tienden a producir errores con más frecuencia (esto tendría importancia para las mutaciones por expansión de tripletes repetidos)
3. Número y extensión de intrones de cada gen. A un mayor número de intrones, se corresponde una mayor probabilidad de mutación para el procesamiento (corte y empalme) del transcripto de ese gen.

Métodos para la determinación de la tasa de mutación

El *método directo* empleado para las tasas de mutaciones dominantes está basado en el censo de enfermos con padres sanos; si 'n' es el número de enfermos con tales características y el total de la población censada es N, la tasa de mutación μ es:

$$\mu = n \quad 2\,N$$

puesto que la mutación puede originarse en cualquiera de los dos progenitores y el enfermo lleva un solo gen mutado. Las poblaciones generalmente son todos los nacidos vivos en un período determinado. Para interpretar los datos correctamente, es importante que la mutación estudiada se exprese claramente y en la totalidad de los afectados, es decir que su "penetrancia" sea de un 100%. Por otra parte, la enfermedad o aspecto expresado por el mutante debe ser exclusiva de ese gen, y no debe haber otros genes que puedan causarlo (o sea que no haya *heterogeneidad génica* para este rasgo), ni factores ambientales que puedan simular esta enfermedad (que no haya *fenocopias*)

El *método indirecto* puede ser usado para mutaciones recesivas que son deletéreas o dañinas, previa estimación de la fertilidad relativa de un paciente (f) expresada en valores entre 0 (fertilidad nula) y 1 (fertilidad normal), es decir· 1-f. De esto se llega a la fórmula:

$$\mu = (1 - f)\,X$$

siendo X la prevalencia de enfermos. La fertilidad relativa se estima por comparación de los números de descendientes de enfermos y sus hermanos sanos.

Todas estas tasas tienen factores de error, pero no se alejan demasiado de las estimaciones teóricas.

Medición molecular de las tasas de mutación

En los últimos años, se han utilizado las poderosas herramientas de la Genética Molecular para determinar la incidencia de errores en el producto génico, es decir, generalmente la proteína codificada (errores de aminoácidos) o directamente los errores en el ADN genómico (cambios en las bases de los nucleótidos) Ambos tipos de procedimientos muestran un mayor número de errores (especialmente en bases del ADN) que lo deducido por los métodos descritos antes. Las proteínas codificadas se estudian generalmente por *electroforesis en poliacrilamida* o *en almidón.* Este método ha demostrado que hay muchos productos génicos que funcionan normalmente, pero presentan uno o más aminoácidos cambiados; en el caso de ser una enzima, estas variantes funcionales son isoenzimas, y las variantes que se detectan por una velocidad electroforética diferente son *electromorfos.* Más informativo aún es el análisis de la secuencia del ADN, que revela cambios de nucleótidos que pueden no afectar la funcionalidad del producto ni su secuencia de aminoácidos, al introducir, por ejemplo, un cambio que conduce a un triplete "sinónimo" que codifica el mismo aminoácido original. Este tipo de análisis se facilita con la reacción en cadena de la polimerasa (RCP = PCR), que ha servido para detectar la frecuencia de cambios de bases en genes específicos en diferentes enfermedades hereditarias.

MECANISMOS DE LA MUTACIÓN

Origen de las mutaciones espontáneas

Las mutaciones espontáneas ocurren principalmente por errores espontáneos en la replicación del ADN y, en menor medida, por una tasa basal o "normal" de agentes mutagénicos en el ambiente, como radiación basal del suelo, radiación cósmica, niveles usuales de sustancias, tales como peróxidos, ácido nitroso y otras, capaces de inducir mutaciones al actuar sobre el ADN de células germinales durante cualquier fase del ciclo celular (cambios *premutacionales*, que requieren una replicación errónea posterior del ADN para ser una mutación) Si no hay agentes mutagénicos identificados, estas mutaciones pueden ocurrir por el cambio espontáneo de una conformación química de una base (formas tautoméricas de bases), por la pérdida espontánea de bases púricas (depurinación del ADN influenciada por el pH bajo) y por otros mecanismos, en especial la movilización espontánea de transposones en organismos superiores.

La influencia de factores ambientales está evidenciada por la acumulación de cambios premutacionales, con el paso del tiempo, en células que no se están replicando, como en semillas o granos de polen o en espermatozoides congelados. Por otra parte, las células humanas en cultivo acumulan mutaciones con el tiempo.[8] Sin embargo, los factores de mayor gravitación son errores en la replicación del ADN

Formas tautaméricas de bases y depurinación del ADN

La base normal citosina puede, con baja frecuencia, presentar en forma transitoria una forma *imina*, con el N_3 hidrogenado; en esta condición, la citosina, en vez de aparearse con guanina, puede hacerlo con adenina (fig. 8-2).

De la misma manera, la base normal timina puede infrecuentemente adoptar la forma *enólica* y, bajo tal forma, puede aparearse con guanina (en vez de adenina) Estas formas tautoméricas raras pueden encontrarse en proporción de 1 en 10^4 con respecto a la forma usual, y si se encontrase en la forma tautomérica rara al momento de replicarse el ADN, se introduciría una mutación. (La tasa habitual de mutación es considerablemente menor, de tal manera que debe existir una corrección para este tipo de error que, por lo menos, atenúa su frecuencia.)

Por otra parte, normalmente puede producirse con baja frecuencia (e influenciable por pH bajo) la hidrólisis de la unión glucosídica entre las purinas y la desoxirribosa, lo que determina la pérdida de bases púricas ("depuración" del ADN) Nuevamente, si este efecto

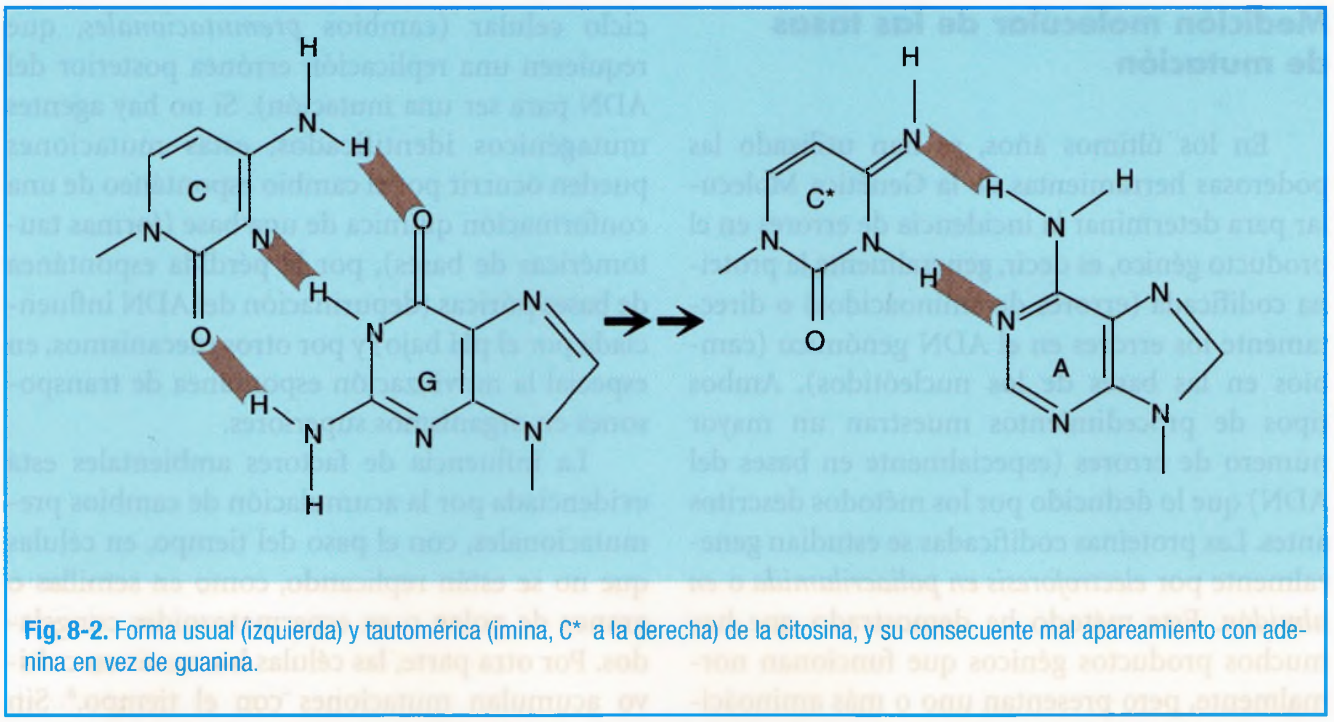


Fig. 8-2. Forma usual (izquierda) y tautomérica (imina, C* a la derecha) de la citosina, y su consecuente mal apareamiento con adenina en vez de guanina.

ocurre durante la replicación, se introducirán mutaciones por deleción (cambio de encuadre) Si se considera que 5.000 purinas pueden perderse por día y por célula, la tasa espontánea de mutación sería elevadísima. Por consiguiente, se piensa que existe una monitorización constante del ADN para evitar (y una vez producidos, reparar) los errores en la codificación del ADN Efectivamente, todos los organismos eucariontes poseen refinados y múltiples sistemas de *reparación del ADN*

Errores introducidos durante lo replicación del ADN

Las causas más frecuentes de mutación ocurren durante la replicación del ADN, por la colocación de bases incorrectas durante la síntesis de este ácido nucleico. En realidad, la síntesis de ADN es extraordinariamente fiel, considerando que en el desarrollo total de un ser humano se producen unas 10^{15} divisiones celulares, que deben replicar en cada división el genoma humano de 3×10^9 bases, y, si se cometiera sólo un error en un millón de bases, ello implicaría 3.000 errores por división celular y 10^{18} errores en el desarrollo humano, lo cual sería *absolutamente inviable.* Por el contrario, la realidad muestra que el nivel de error por división es de 0,33 (1 en 10^{10} bases), o sea una sola base errónea cada tres divisiones celulares.[9]

Errores introducidos por las ADN polimerasas in vitro

La demostración más clara del origen de mutaciones es el grado de error que poseen las enzimas naturales, las ADN polimerasas (de mamíferos), cuando se realiza una síntesis in vitro de ADN bajo ciertas condiciones. Las cinco principales clases de ADN polimerasa en mamíferos son α, β, δ, ε y γ. Las polimerasas α y δ intervienen en la replicación del genoma en mamíferos, mientras las β y ε están vinculadas a procesos especiales de reparación del ADN y la γ está vinculada a la replicación del ADN mitocon drial (cuadro 8-2)

En ciertas condiciones, las polimerasas α y β no poseen la actividad correctora, 3'-5' exonu cleásica, por la presencia inhibidora de una subunidad específica (esa actividad correctora está directamente presente en la ADN polimerasa de *E. coli*), y por ello introducen un error cada 1 100 a 33.000 bases, cuando se realiza síntesis in vitro con las polimerasas purificadas, o cada 500.000 bases, cuando se utilizan complejos de replica-

Cuadro 8-2. Tipos de ADN polimerasas eucarióticas y sus características

Tipo de polimerasa	PM	Principal función	Actividad exonucleásica	Sensibilidad a inhibidor
α	340 kDa (4 subun.)	En replicación genómica	Inhibida 3'-5'	+ Afidocolina
β	45 kDA	Reparación ADN	———	– Afidocolina
δ	200 kDa (2 subun.)	En replicación genómica	3'-5'	+ Afidocolina
ε		Se une a la ciclina		
γ	60 kDA	Reparación ADN		– Afidocolina
		Replicación ADN Mt		

ción.[10] Estas altísimas tasas de error implican la existencia de mecanismos correctores in vivo.

La "lectura de prueba" por las polimerasas provee una reducción de errares

Si bien el mecanismo de "lectura de prueba" está sólo bien estudiado en el procarionte *E. coli*, su funcionamiento resulta muy probable también en la replicación del ADN en eucariontes. Esencialmente, esta lectura de prueba es una actividad transitoria de la ADN polimerasa, luego que ha sido seleccionado el trifosfato de nucleótido, escindido a monofosfato y colocado en la cadena naciente; si en ese momento el nucleótido recién adosado no hace un apareamiento correcto con la base enfrentada y distorsiona la simetría o el tamaño de la doble hélice, la adición de un siguiente nucleótido queda postergada, y la ADN polimerasa puede ejercer una actividad exonucleásica 3'-5' sobre el nucleótido recién incorporado: es decir que la polimerasa vuelve sobre su último trabajo y lo corta, y luego reinicia la búsqueda del nucleótido correcto. Mediante la "lectura de prueba" y la propia selección de nucleótidos que realiza la polimerasa inicialmente, se reduce a 1 en 10^7 la tasa de errores (fig. 8-3) [9]

Hipermutabilidad del virus del sida

Numerosas observaciones atestiguan la enorme capacidad del virus del sida (virus de inmunodeficiencia humana, HIV) para mutar su genoma. La explicación de esta hipermutabilidad estriba en que la primera replicación del genoma viral al infectar una célula humana es efectuada por la transcriptasa inversa, sobre el molde de ARN virósico. Esta transcriptasa inversa, a diferencia de la ADN polimerasa, no tiene capacidad de "lectura de prueba", de tal manera que se producen muchos más errores; posteriormente, el ARN es hidrolizado y el ADN de cadena única sirve de molde para las ADN polimerasas celulares, que "inmortalizan" los errores introducidos previamente y llevan a que puedan existir entre 10^{14} y 10^{18} tipos de virus.[11]

SISTEMAS POSREPLICATIVOS DE REPARACIÓN DEL ADN

En los últimos años, se han ido descubriendo una sorprendente ductilidad y refinamiento de los sistemas de reparación del ADN en la especie humana y en los eucariontes en general. Por medio de estos refinados y complejos sistemas de reparación, que comprenden una parte significativa del genoma, las células se encuentran muy bien protegidas, no sólo de la introducción de errores por azar, sino también de la mayor parte de los agentes dañinos (mutagénicos) del ambiente; de esta manera, se ha ido resolviendo la paradoja de que los organismos de larga vida, como la especie humana, se sobrepongan a la cantidad de agentes químicos y físicos ambientales capaces de alterar la composición química y la estructura del ADN

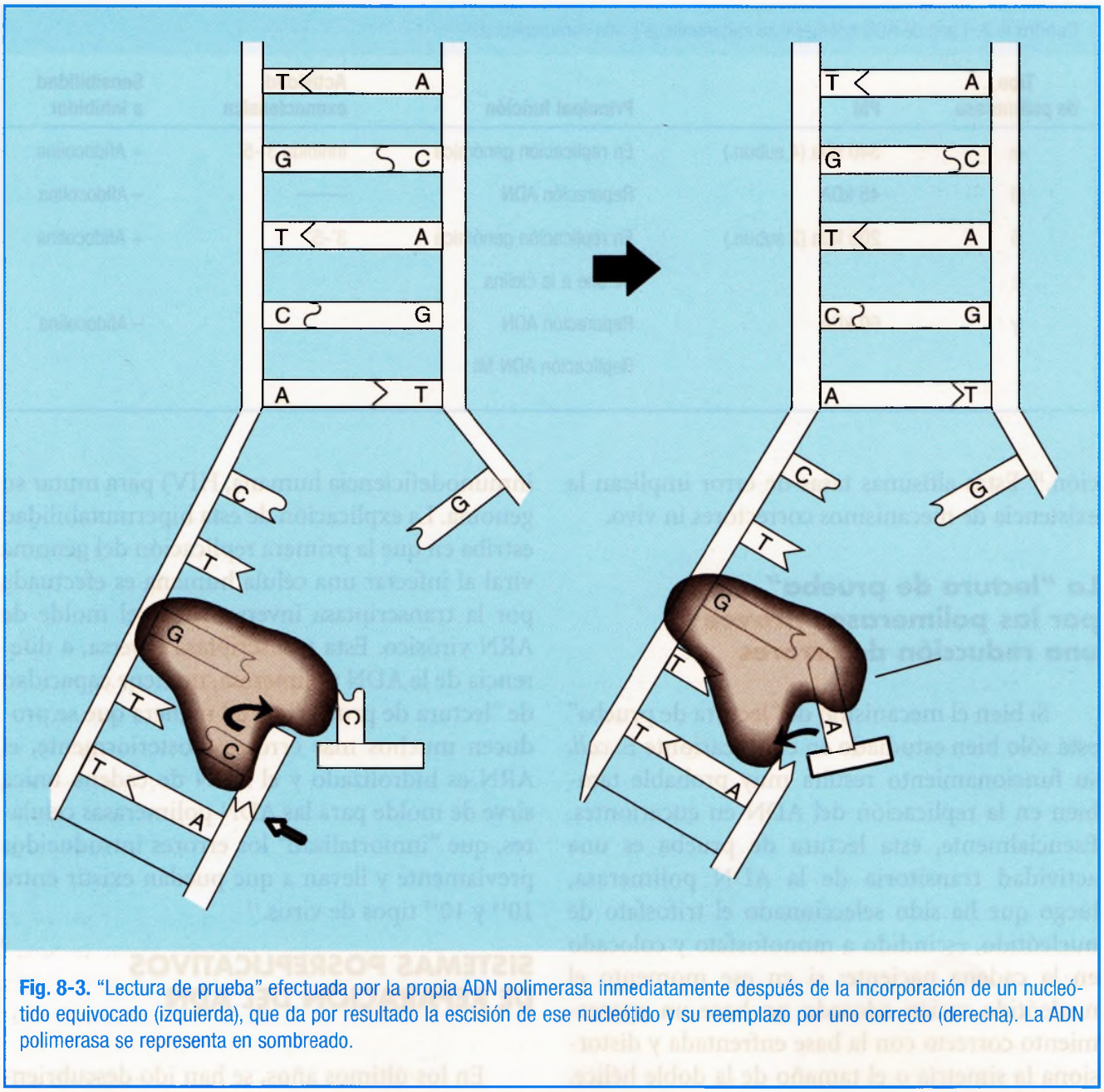


Fig. 8-3. "Lectura de prueba" efectuada por la propia ADN polimerasa inmediatamente después de la incorporación de un nucleótido equivocado (izquierda), que da por resultado la escisión de ese nucleótido y su reemplazo por uno correcto (derecha). La ADN polimerasa se representa en sombreado.

Simultáneamente, se han ido reconociendo un grupo de enfermedades hereditarias y de tumores en los cuales están mutados uno o más genes integrantes de los sistemas de reparación, es decir, las *enfermedades de los sistemas reparativos de ADN* (véase más adelante) Además, se han puesto en evidencia las relaciones profun das que existen entre los sistemas de reparación y los procesos básicos de transcripción, por un lado, y de la recombinación meiótica, por otro. Por ello, el estudio de los sistemas de reparación ocupa un lugar importante en la Genética Humana.

Los sistemas de reparación del ADN se clasifican en cuatro grandes grupos:

a) *Sistema de reparación de mal apareamiento de bases (REMA).* Es posreplicativo temprano, repara el mal apareamiento de uno o unos pocos pares de bases; en Medicina está cobrando gran importancia por su papel en la *inestabilidad de microsatélites* descubierta en ciertos tumores (véase más adelante)
b) *Reparación por escisión de bases (REBA).* Es posreplicativo tardío y reemplaza general mente a un único nucleótido dañado, en

especial los sitios depurinados en el ADN (véase antes)

c) *Reparación por escisión nucleotídica (REN = NER en inglés).* Es posiblemente el más extenso sistema de reparación del ADN, ocurre en cualquier momento del ciclo celular, incluso en células en reposo divisional; reemplaza lesiones que abarcan de dos a muchas bases del ADN, en especial lesiones que distorsionan mucho la doble hélice, como las lesiones por luz ultravıoleta (UV); sus genes comprenden a los responsables del xeroderma pıgmentoso y otras enfermedades.

d) *Reparación de rupturas de doble cadena.* Este tipo de reparación es el más intensamente estudiado en la actualidad. se asocia con los mecanismos de recombinación meiótica (véase cap. 12).

Estos sistemas proveen la reparación del ADN para cambios inducidos por agentes ambientales, como luz ultravioleta (UV), agen tes desaminantes, agentes alquilantes (que introducen un grupo alquilo a una base) y otros, que no están relacionados con los errores durante la replıcación, pero que si no fueran corregidos, en el momento de replicarse introducirían cambios permanentes (por ello éstos son llamados *cambios premutacionales*) Afortunadamente, estos sistemas están muy desarrollados en los eucariontes y normalmente borran casi todos los cambıos premutacionales. Sin embargo, sı una mutación afecta a uno de estos componentes de sistemas de reparación, puede provocar una seria enfermedad, como xeroderma pigmentoso, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom y otras dolencias.

Mecanismo de reparación en la desaminación y alquilación de bases

Las tres bases citosina, adenina y guanina pueden perder un grupo amino por una variedad de causas: hidrólisis espontánea, acción del ácido nitroso, etc. Estas bases desaminadas quedan en forma ceto y corresponden a bases que no ocurren naturalmente en el ADN y que no forman uniones hidrógeno con las bases complementarias correctas, sino con otras, por lo cual deben ser corregidas antes de la replicación para impedir la producción de mutaciones. Especialmente importante es el caso de la citosina, que en eucariontes se encuentra muchas veces metilada como 5-metil citosina y que al desaminarse se convierte en timina, alterando así la codificación genética (cuadro 8-3)

Por otro lado, varias sustancias altamente mutagénicas, como la metilnitrosoguanidina, las nitrosaminas, el dimetilsulfato y el metilmetanosulfonato, transfieren grupos metilo, etilo u otros grupos alquilo a bases del ADN, provocando cambios premutagénicos que, sı no son repara dos antes de la replicación, llevan a mutaciones.

Un cambio premutagénico inducido por este tipo de agente es la metilación de guanina, que produce 6-O-metil guanina, base anormal que puede aparearse con timina y provocar una mutación. En el caso de producirse esta base anormal, existe un mecanismo directo de protección por la enzima 6-O-metil-guanina metil transferasa, que es capaz de desmetilar la base anormal. El mecanismo general de la eliminación de bases alquiladas, desaminadas y anormales puede estar a cargo del sıstema *REBA* o del

Cuadro 8-3. Desaminación de bases del ADN humano, productos resultantes y cambios inducidos en el apareamiento

Base original	Producto de desaminación	Cambio inducido en apareamiento	
Citosina	Uracilo	de C-G	a U-A
5-m Citosina	Timina	de C-G	a T-A
Adenina	Hipoxantina	de A-T	a H-C
Guanina	Xantina	de G-C	a X-C (con 2 uniones –H)

sistema *REN*, como se expone en los dos ejemplos siguientes.

Reparación por escisión de bases (REBA)

Este tipo de reparación opera a través de varios pasos:

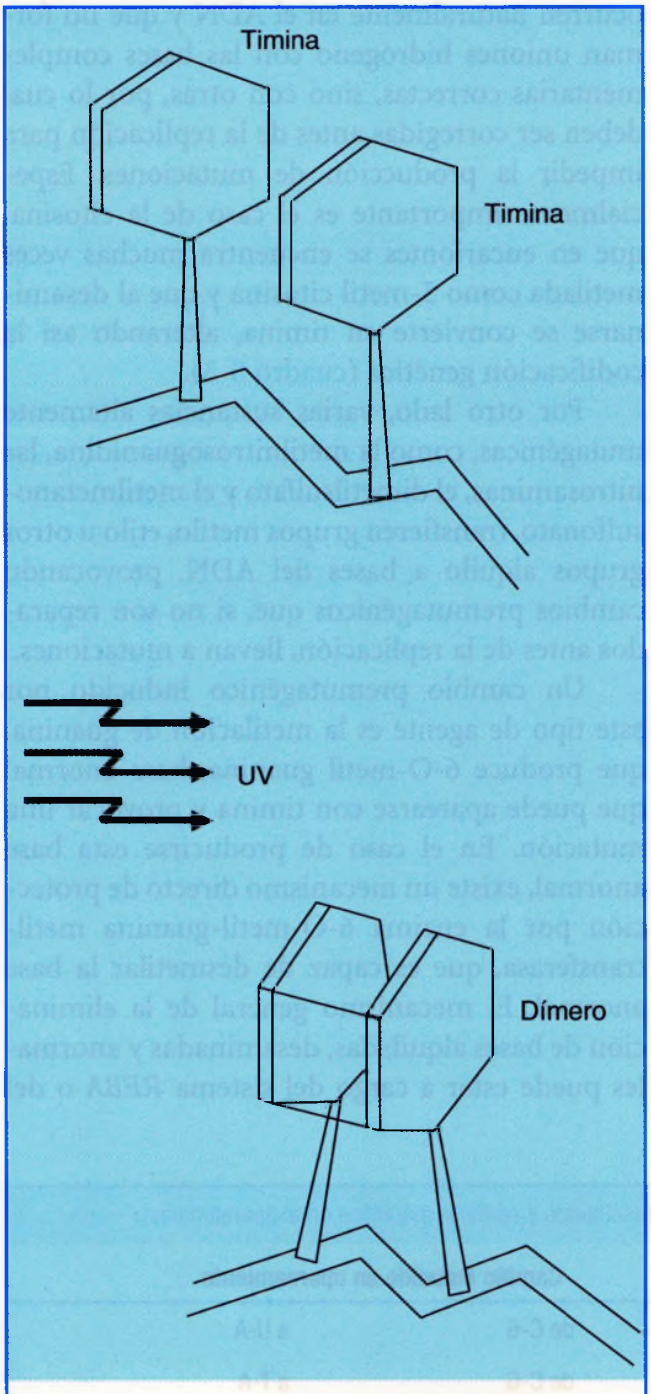


Fig. 8-4. Formación de dímeros de timina por acción de luz UV. El dímero es escindido por una nucleasa (escinucleasa), para luego proceder a la reparación de la cadena.

1. Reconocimiento de bases anormales (alquiladas, etc.).
2. Intervención de una *glucosilasa específica* (para cada tipo de base anormal) que corta la unión glucosídica de la base con la desoxirribosa.
3. Una endonucleasa reconoce el lugar sin una base púrica (*endonucleasa apurínica, APE*) o, menos frecuentemente, sin una base pirimídica, y corta la cadena que contiene el lugar vacío.
4. Una ADN polimerasa de reparación, usando la cadena indemne de molde, restaura la cadena cortada y, mediante una ligasa, se termina de unir la cadena reparada.

En la especie humana se han encontrado glucosilasas específicas, que pueden reemplazar las propias de bacterias, así como endonucleasas APE (apurínicas) y sobre todo varias helicasas (enzimas que "destuercen" la hélice del ADN), que muestran que estos mecanismos funcionan en el hombre.[12]

Reparación de los daños por radiación UV con el sistema REN

Uno de los cambios premutagénicos más estudiados es la alteración de bases del ADN por radiación UV Este daño ocurre generalmente en las secuencias donde hay dos timinas lado a lado; la radiación UV produce *dímeros de timina*, con dos uniones entre las bases adyacentes que dan una estructura de ciclobutano y que distorsiona la estructura de la doble hélice (fig. 8-4) La reparación de este tipo de cambio está a cargo de endonucleasas especiales, que cortan un segmento de cadena simple que contiene al dímero, y luego el hueco es llenado por una ADN polimerasa y una ligasa, aunque en la especie humana la reparación de los dímeros de timina está básicamente a cargo del REN (véase más adelante)

Mecanismos moleculares de la reparación de mal apareamiento (REMA)

Este tipo de reparación ocurre inmediatamente después de la acción de la ADN polimera-

sa, mientras hay "señales" que permiten distinguir la cadena nueva (recién sintetizada) de la cadena original o molde. Esta reparación de "mal apareamiento" (*mismatch repair*) se basa en el reconocimiento de la región del ADN con bases incorrectamente apareadas. En la especie humana, las principales proteínas de este sistema son cinco, y de ellas la más importante es la hMSH2 (de *h*umana, *M*utante *S*, *H*omóloga, tipo 2), que tiene importancia médica por encontrarse alterada (su gen está mutado) en el cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP = HNPCC en inglés) [13]

En las células humanas se han encontrado otras cuatro proteínas, relacionadas con la hMSH2 y parecidas a ella, que se reúnen y forman heterodímeros asociados con ella, de lo cual resulta una acción mucho más potenciada y diversificada para la reparación de bases mal apareadas.[14] La acción de la proteína hMSH2 es *reconocer y unirse específicamente al ADN* con bases mal apareadas; de lo dicho anteriormente, se deduce que la unión al ADN se realiza por un conjunto polimérico de hMSH2 y sus proteínas asociadas (fig. 8-5)

Una vez que la zona mal apareada se acopló con el complejo hMSH2, una nucleasa corta la cadena con la base errónea y elimina a ésta, y una ADN polimerasa sintetiza la secuencia correcta, que se liga al resto de la cadena con una ligasa. Este sistema de reparación puede reconocer un par mal apareado, o un pequeño grupo (hasta cinco) de bases mal apareadas,[15] que la "lectura de prueba" de la ADN polimerasa (δ en mamíferos) no ha corregido en la replicación. Mediante la reparación del sistema REMA, se mejora unas 1.000 veces la fidelidad de la replicación (hasta un error en 10^{10} nucleótidos) (panel 8-2), por lo cual, como se vio antes, la tasa de mutación es finalmente de 0,33 por división.

Reparación por escisión nucleotídica (REN)

Éste es el sistema reparativo más importante para preservar al ADN de los daños por factores ambientales químicos y físicos. Más de una docena de genes humanos (16 hasta el año 2000) pertenecen a este sistema y han sido clonados, especialmente a partir de enfermos de *xeroderma pigmentoso*. La característica general de este sistema reparativo es que involucra el recorte, no sólo de las bases dañadas del ADN, sino de un trecho bastante largo, de alrededor de 30 nucleótidos, de la cadena del ADN que comprende las bases dañadas y su región aledaña. Recientemente, se ha descubierto que gran parte de este tipo de reparación (REN) está acoplada a la actividad transcripcional del complejo de transcripción funcional (véase cap. 5) y, más concretamente, que está asociada al factor de transcripción FTIIH (véase cap. 5)

Enfermedades por alteración del sistema REN: xeroderma pigmentoso

En la enfermedad llamada *xeroderma pigmentoso* (panel 8-3) está alterado el sistema REN y, por consiguiente, la reparación de las lesiones por la luz UV no se realiza normalmente. El grado de compromiso del REN en esta enfermedad es variable, desde ligero hasta total. Los enfermos (véase fig. 1 del panel 8-3) presentan fotosensibilidad, y en la piel expuesta a la luz solar se desarrollan progresivamente las lesiones: pecas, aumento del pigmento, atrofia de la piel, tumores benignos (angiomas y queratoacantomas) y finalmente tumores malignos (de células basales o espinosas), además de fotofobia y otros síntomas.

El xeroderma pigmentoso es un ejemplo típico de heterogeneidad genética, dado que diversas mutaciones, de por lo menos siete genes diferentes, pueden ocasionar la enfermedad. Estos siete genes han sido clonados, y a ellos se les agregan dos genes conocidos de una enfermedad vinculada, el síndrome de Cockayne, y otro gen de una proteína asociada al XP (cuadro 8-4)

Dos de las proteínas del XP son *helicasas*, es decir, enzimas que destuercen las dos hélices del ADN y, al hacerlo, hidrolizan ATP (son ATPasas dependientes de ADN, su sustrato) Estas dos helicasas (XPB y XPD, véase cuadro 8-4) for-

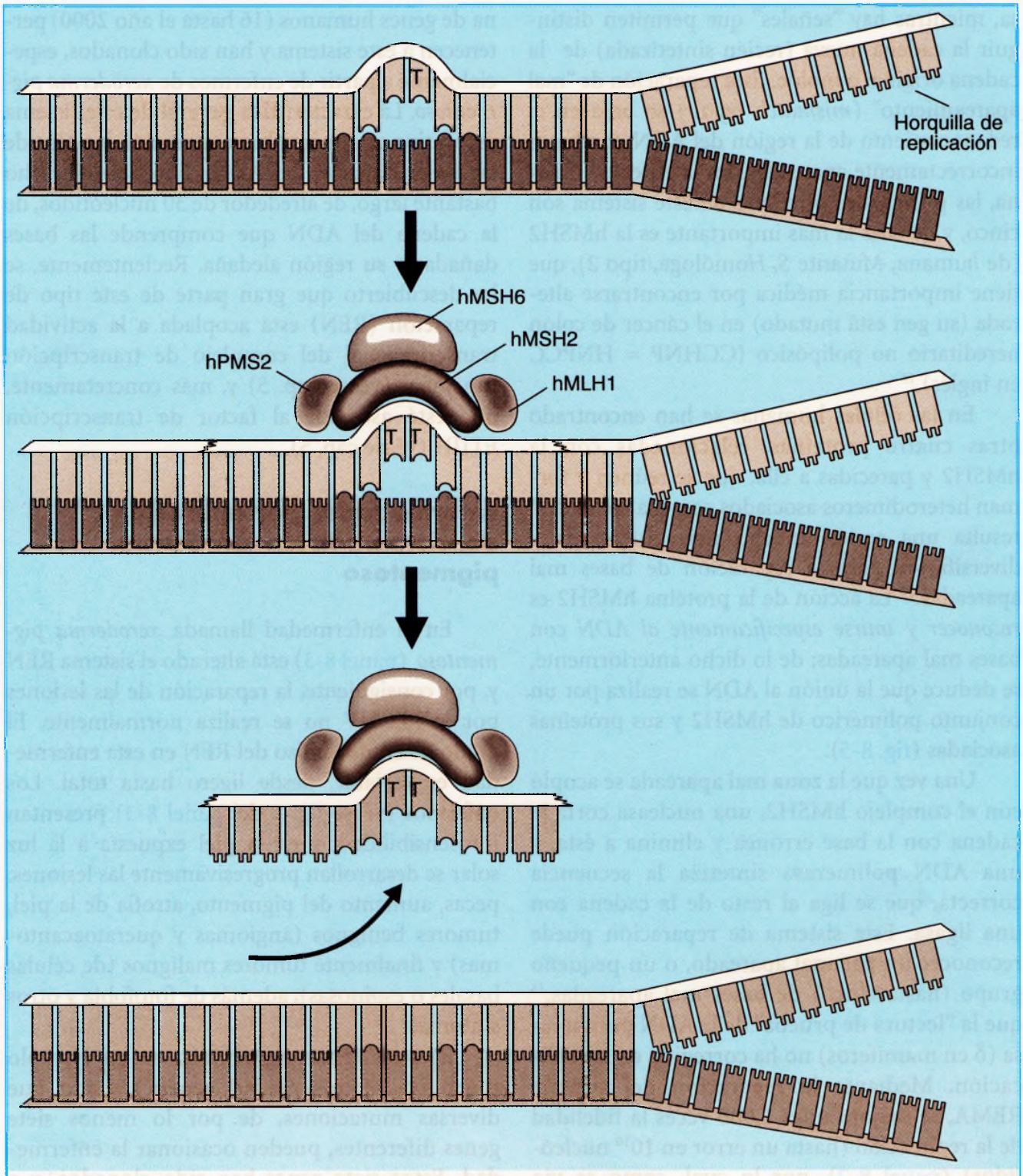


Fig. 8-5. Reconocimiento, asociación y reparación de una (o varias) bases mal apareadas (T) por la proteína hMSH2 y sus proteínas asociadas (hMSH6; hPMS2; hMLH1 y el cofactor de la polimerasa de ADN, PCNA).[15]

man parte integrante del aparato de transcripción normal en el factor de transcripción FTIIH.[18,19] De esta manera, se ha establecido la *relación funcional entre reparación de ADN y transcripción.*

Vinculación entre reparación de tipo REN y transcripción

Recientemente se ha comprobado que uno de los componentes del complejo de transcrip-

Panel 8-2. Inestabilidad de microsatélites (IMS = MSI, en inglés) en el cáncer colónico hereditario no polipósico (CCHNP)

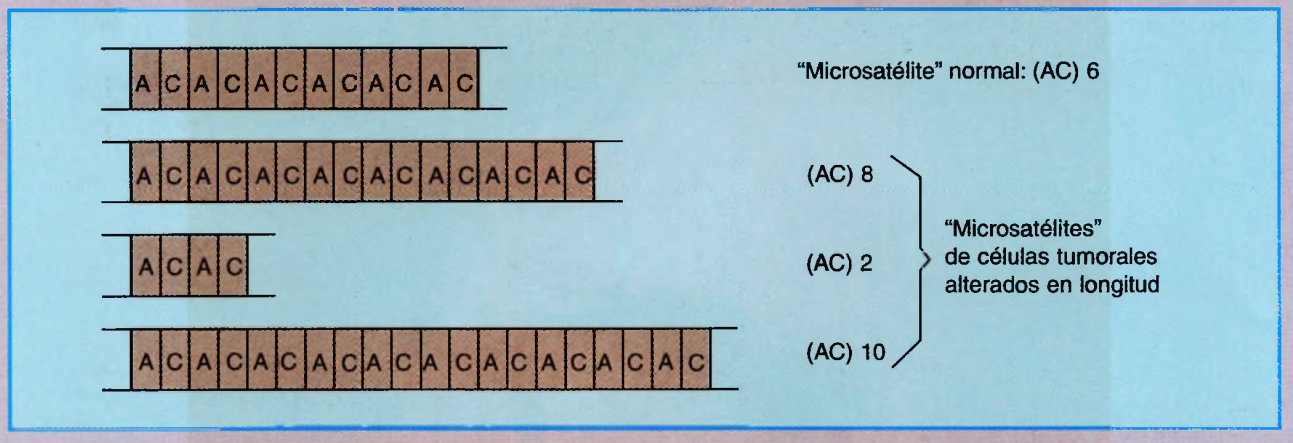


Fig. 1. Variaciones de una secuencia de ADN "microsatélite", como las que se pueden encontrar en células de cáncer de colon hereditario (CCHNP) y de otros tumores.

La principal aplicación médica del conocimiento de la reparación por mal apareamiento *REMA* llegó en 1993, cuando se observó que las células de tumores hereditarios del colon (CCHNP) mostraban una curiosa variabilidad en la longitud de las secuencias del ADN microsatélite (véanse cap. 4 y texto principal).[16] Estas secuencias *microsatélite* son repeticiones de dinucleótidos (como AC-AC...; o GT-GT...) en una región del ADN y no codifican ninguna información genética conocida, sino que son variantes moleculares inocuas del ADN, muy polimórficas (variables) en la población humana, pero que se heredan estrictamente, como lo hacen las secuencias de los genes; dentro de todas las células de un individuo, estas secuencias "microsatélite" deben ser estrictamente idénticas. En vez de suceder eso, las células de los tumores de colon muestran variaciones de la longitud del microsatélite, y es más corta o más larga que la secuencia del microsatélite de las células normales, no cancerosas, del mismo individuo; en realidad, las células tumorales muestran una gran variación en la longitud del microsatélite. Esta variación de longitudes es fácil de detectar por medio de electroforesis en geles de acrilamida, y este tipo de detección ha pasado a ser importante en clínica oncológica: la *prueba de inestabilidad de microsatélite* (fig. 1).

Esta variación en la longitud de las secuencias microsatélites está determinada por una alteración del sistema de reparación de mal apareamiento *REMA*, que está a cargo de la proteína hMSH2 y sus proteínas asociadas. El gen de hMSH2 (localizado en el cromosoma 2) aparece mutado en el 60% de los pacientes con CCHNP, y el resto tiene mutaciones de las proteínas asociadas.[17] Esta *inestabilidad de microsatélite* se debe a que los errores que produce la ADN polimerasa al replicar una secuencia de este tipo (con repeticiones) consisten generalmente en un deslizamiento de la cadena molde con respecto a la cadena nueva de ADN, que de esta manera puede adquirir, o perder, uno o varios pares de bases. Normalmente, la proteína hMSH2 reconoce la redundancia de bases y se une a ellas, llevando a la corrección del error de longitud. Si el gen de la hMSH2 está alterado en uno de los dos cromosomas homólogos (es decir, si es heterocigota para esta mutación), bastará que por azar se altere el otro gen alélico para desarrollar esta inestabilidad en la célula tumoral. A su vez, dicha inestabilidad provoca, especialmente en la mucosa del colon, la tendencia a la activación anormal de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (véase cap. 19) que favorecen el desarrollo de este tipo de tumor. Es importante recordar que en las glándulas de Lieberkühn del colon hay una alta frecuencia de divisiones mitóticas y también un alto nivel de producción normal de hMSH2, la cual sería necesaria para mantener normal la proliferación de estas células.[13] Típicamente, estos pacientes son heterocigotas para una mutación de hMSH2 o de los genes de proteínas asociadas, y durante el curso de la vida, algunas células de la mucosa del colon sufren una mutación en el alelo normal restante (*pérdida de la heterocigosidad*, véase cap. 19).[17] Se considera que la mutación del gen *hMSH2* y sus asociados acelera la tasa de mutación de otros genes en las mismas células (efecto o fenotipo "mutador") y favorece más la progresión de un tumor.[17]

Panel

Panel 8-3. El xeroderma pigmentoso

Fig. 1. Adolescente enferma de xeroderma pigmentoso que muestra lesiones pigmentadas en la superficie del rostro expuesta a la luz natural. La fotofobia le hace cerrar los ojos. En el pliegue del ala de la nariz se ha desarrollado un epitelioma basocelular. (Gentileza del Profesor Dr. Alejandro Cordero.)

Esta enfermedad es rara, con una incidencia variable según los países (en Estados Unidos. es de un caso en 250.000 personas). A pesar de su infrecuencia, el *xeroderma pigmentoso* (abreviado XP) es de gran interés para la Genética, porque ha permitido aislar varios de los principales genes del REN y sus proteínas, generalmente designados por la sigla XP y una letra adicional. El tipo de herencia del XP es siempre autosómico recesivo, de modo que es frecuente la consanguinidad de los padres de un paciente.

Cuadro 8-4. Genes conocidos cuyas mutaciones se asocian con el xeroderma pigmentoso (XP) y con el síndrome de Cockayne (CS)

Gen	Localización	Función
XPA	9q34	Proteína ligante a ADN dañado
XPB	2q21	Helicasa 3'-5' (integrante dxel FTIIH)
XPC	3q25	Reparaciòn general de ADN
XPD	19q13	Helicasa 5'-3' (integrante del FTIIH)
XPE	11q12	Proteína ligante a ADN dañado
XPF	16p13,1	Endonucleasa de corte en 5'
XPG	13q32	Endonucleasa de corte en 3'
ERCC1	19q13	Proteína asociada con XPF
XPV	6p21 1	Polimerasa H
CSA		Proteína interactiva (s. de Cockayne A)
CSB	10q11	Factor acoplante REN-transcripciòn helicasa del s. de Cockayne B

ción, el factor FTIIH, no sólo contiene una parte de los constituyentes del sistema de reparación REN, sino que por sí mismo puede intervenir completo, junto a las proteínas XPA y XPG (véase cuadro 8-4), para efectuar la reparación de tipo REN Es decir que este factor FTIIH tiene una función doble: por un lado, es uno de los componentes esenciales para la transcripción normal y, por otro lado, junto a otras proteínas, interviene en la reparación (REN) Este factor FTIIH interviene en la reparación mediante su capacidad de "abrir" el ADN por medio de sus dos helicasas que trabajan en sentidos inversos: la XPB abre de 3' a 5', mientras que la XPD abre de 5' a 3' Esta "apertura" del ADN permite que las endonucleasas XPG y XPF/ERCC1 hagan los dos cortes de la cadena dañada, que luego es reparada por la ADN polimerasa (fig. 8-6)

En el comienzo de la transcripción, el factor FTIIH abre el ADN mediante sus dos helicasas y permite el recorrido de la ARN polimerasa. El FTIIH es, pues, un importante aparato de apertura de las dos hélices del ADN, tanto en la reparación como en la transcripción. Ha sido comprobada la asociación frecuente de transcripción y reparación (*reparación acoplada a la transcripción, RAT*) Esto resulta lógico, debido a que el aparato de transcripción está permanentemente recorriendo el ADN para leerlo y, por consiguiente, es un método eficaz para detectar regiones dañadas del ADN Cuando la ARN polimerasa se encuentra con una región lesionada del ADN, instantáneamente se detiene la transcripción y el complejo transcripcional comienza a trabajar en el *modo reparativo*: se recluta nuevamente el FTIIH, en función de reparación, se produce la escisión de alrededor de 30 nucleótidos que contienen la región dañada, se repara la cadena, y recién entonces puede continuar la transcripción. Por otra parte, cuando el FTIIH trabaja en modo reparativo, posee una actividad fosforilante (de quinasa) que puede detener el ciclo celular. De esta manera, se integran tres áreas: transcripción, reparación y regulación del ciclo celular.

Otras enfermedades asociadas con sistemas de reparación

El *síndrome de Cockayne* ("enanismo caquéctico") es una enfermedad rara, vinculada al XP, puesto que estos pacientes también presentan fotosensibilidad y está afectado el sistema REN Las dos formas (A y B) de este síndrome se diferencian por el momento de aparición de los síntomas; es más temprana (fetal) la forma B.

Hay retraso de crecimiento y retraso mental, degeneración de la retina y un aspecto de senilidad muy precoz. La vida media de estos pacientes es de 12 años.

A nivel celular, el defecto reside en un *retardo*, pero no una abolición, *del sistema de reparación REN acoplado a la transcripción (RAT)*. Se conocen dos genes (*CSA* y *CSB*) cuya mutación se relaciona con este síndrome, que además se puede asociar con un tipo de XP Se considera que este síndrome se debe a la falla de cualquiera de tres componentes: la proteína reguladora codificada por *CSA*, la helicasa codificada por *CSB* o la endonucleasa 3' codifi

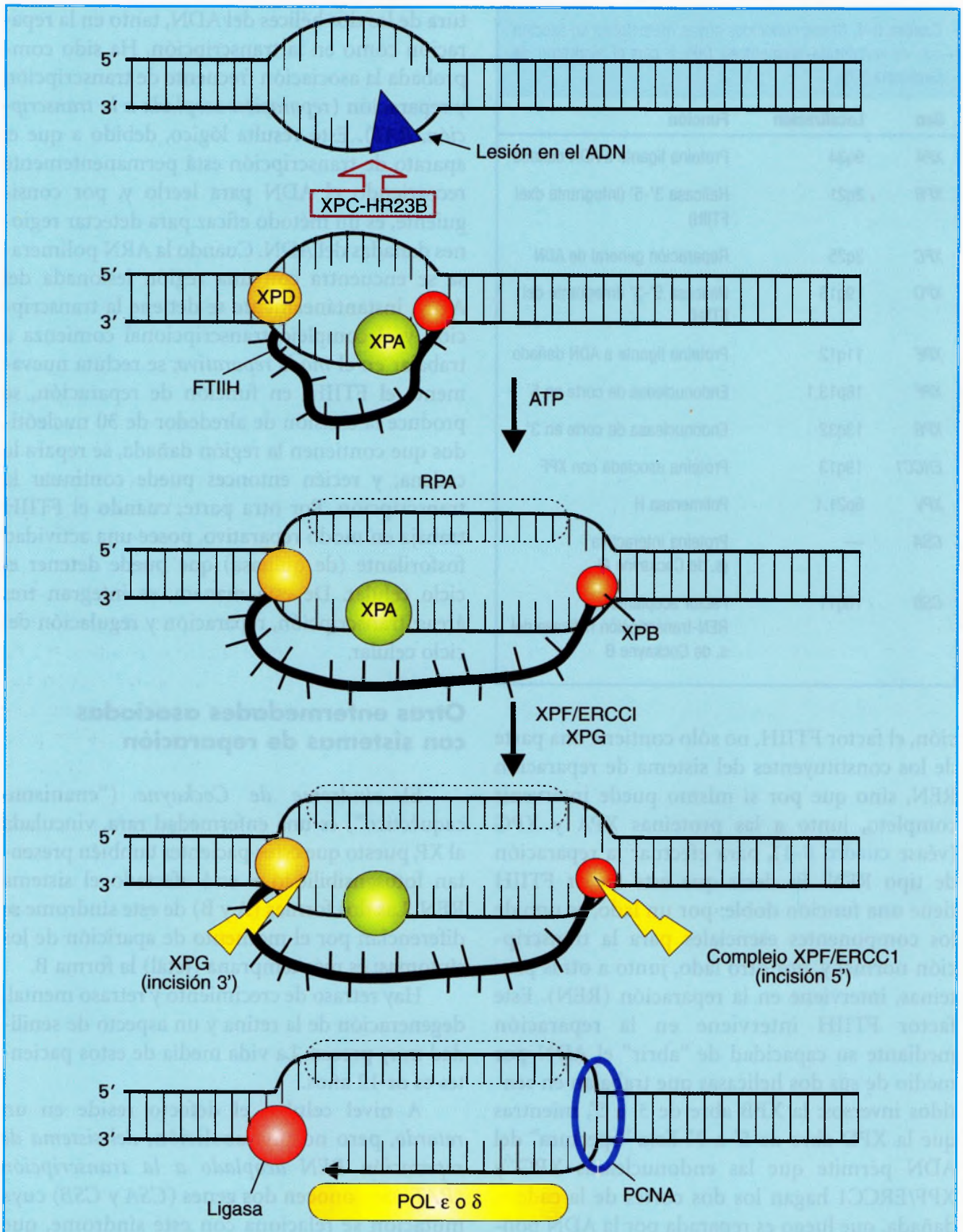


Fig. 8-6. Intervención del factor de transcripción FTIIH en la reparación REN del ADN. La lesión es reconocida por XPC, luego XPA recluta el factor FTIIH. Las helicasas XPB y XPD abren el ADN en sentidos opuestos, y luego las endonucleasas XPG y XPF/ERCC1 (rayos) cortan los extremos de la cadena dañada. En el paso final de corrección interviene la polimerasa especial épsilon (o a veces la delta) [14,19] PCNA: cofactor de la polimerasa de ADN.

cada por *XPG*, que impiden, cualquiera de ellas, la asociación normal del FTIIH con los componentes del REN

El *síndrome de Bloom* es muy raro, salvo en los judíos asquenazíes de Europa oriental; es un síndrome de inestabilidad genómica, con un excesivo número de fracturas cromosómicas y un aumento de diez veces en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH, véase cap.11), un aumento de la incidencia de tumores malignos, retraso de crecimiento, fotosensibilidad ligera (eritema o enrojecimiento facial) e hipermutabilidad. El gen alterado (*MBL = BLM, Bloom mutation*) codifica una proteína de la familia de las helicasas (RecQ) y se localiza en 15q26.1 [20] Por consiguiente, es una enfermedad monogénica, de herencia recesiva, caracteri zada por el exceso de recombinación somática del ADN

La *anemia de Fanconi* es una anemia grave, aplásica y hereditaria, que se acompaña de *inestabilidad cromosómica* (rupturas de cromátidas, reordenamientos cromosómicos estructurales, pérdidas de segmentos cromosómicos y "quiasmas somáticos"), hiperpigmentación y hemorragias por trombocitopenia. El tipo de herencia es autosómico recesivo y se ha demostrado que hay varios genes relacionados con esta enfermedad (panel 8-4)

El *síndrome de Werner* o "envejecimiento prematuro hereditario" es una enfermedad rara, con incidencia de uno por millón, cuyo defecto radica en la mutación del *gen WNR* ("Werner"), que codifica una *helicasa* de 1.432 aa.[21] Este sín drome corresponde a la temática sobre envejeci miento.

LAS MUTACIONES EN LA NATURALEZA

Función biológica de las mutaciones

Si bien los organismos eucariontes poseen métodos muy eficientes para preservar la fideli dad de la replicación del ADN, no llegan a anular la producción de un número limitado de mutaciones en cada generación. En la especie humana este número es diferente en varones y en mujeres, dado que el número de mutaciones en la línea germinal depende del número de generaciones celulares, que es mayor en la espermatogénesis que en la ovogénesis; puede estimarse que aproximadamente entre 10 y 100 cambios nucleotídicos (de los cuales sólo la décima parte puede ocasionar mutaciones visibles) pueden ser introducidos por generación. La mayoría de las mutaciones *visibles* son perjudiciales y su permanencia es limitada por la selección natural, sin embargo, algunas mutaciones fenotípicamente *visibles* son ventajosas para la adaptación ante cambios ambientales y serán resguardadas por la selección, así como otras, que caen en regiones no esenciales para la función de una proteína, serán "neutrales" y producirán un polimorfismo en las proteínas codificadas. Pero, además, la mayoría de los cambios de nucleótidos ($^{9}_{10}$), que no afectan ADN codificante, son "neutrales" respecto de la selección natural. De esa manera, en cada generación se van introduciendo cambios silenciosos de bases, que se presentan como *polimorfismos* en las secuencias no codificantes de proteínas. Estos polimorfismos de secuencias, mucho más probables que en las regiones que codifican proteínas, las hacen más variables; pero además, ciertas secuencias, tales como repeticiones de uno o más nucleótidos, son especialmen te proclives a aumentar la frecuencia de errores de la ADN polimerasa, de forma tal que ciertas secuencias son "hipervariables" La presencia de polimorfismos de secuencias, en general, y de las hipervariables, en particular, es útil para que sean usadas como "marcadores" de genes.

Lo teoría "neutralista" de la evolución

El genetista M. Kimura desarrolló, a partir de la década de 1960, una teoría de la evolución biológica que hoy es ampliamente aceptada y que se basa en el efecto neutral de la mayor parte de los cambios en el ADN [22] Esta teoría ha superado a la teoría sintética o neodarwinista, que se basaba en el mecanismo casi exclusivo de la selección natural. De acuerdo con la teoría neutralista, la gran mayoría de los cambios que ocurren espontáneamente con el curso del

tiempo en los organismos de una especie a nivel del ADN, del ARNm y de las proteínas, no son causados por la selección natural (que filtra y deja pasar sólo los cambios favorables o adaptativos), sino por la fijación al azar (*deriva genética*) de cambios que son efectivamente neutrales (ni ventajosos ni perjudiciales), bajo una presión de mutación constante. Esta teoría neutralista no pierde de vista la selección natural, sino que considera que sólo una pequeña proporción de los cambios del ADN pueden ser afectados por ella, porque la vasta mayoría de los cambios en un instante dado no son perjudiciales ni ventajosos.

Precisamente desde este punto de vista se puede explicar la gran frecuencia de "polimorfismos" en proteínas y en las secuencias del ADN. Estos polimorfismos, que no tienen un valor adaptativo aparente, no son otra cosa que etapas transitorias de la evolución, a nivel molecular, hasta obtener la fijación (o presencia en la totalidad de la población) de una secuencia particular. Esta teoría neutralista realiza importantes predicciones: la tasa de cambios a nivel del ADN es proporcional a la tasa de mutación, medida por generación o por año; esto a su vez determina que, para cada proteína o región génica, exista una tasa de cambio constante por año, es decir que puede definirse un "reloj molecular" para cada región génica.

La existencia de un "reloj molecular" en el ADN permite calcular el tiempo transcurrido entre la emergencia de dos especies a partir de una ancestral al medir el número de cambios "neutrales" en las secuencias de ADN de esas especies. Por otra parte, la teoría neutralista también predice que las tasas de cambio son mayores en las regiones que tienen menor importancia biológica y viceversa, es decir que los cambios tienden a ser "conservadores". La existencia de "relojes moleculares" en las secuencias de ADN, y las diferencias de velocidad en estos relojes, en secuencias de diferente importancia, están comprobadas por la observación de las secuencias de ADN en diversos organismos. También la teoría neutralista predice una tasa de cambios mucho mayor a nivel de los virus a ARN, tienen tasas de cambio evolutivo aproximadamente un millón de veces mayor por año que los organismos con genomas de ADN (véase antes la hipermutabilidad del virus del sida). Por otra parte, la teoría neutralista considera que la duplicación de genes en organismos con genomas grandes es un cambio neutral, lo cual explica la frecuencia de familias génicas o duplicaciones génicas.

Secuencias conservadas de ADN

Sobre la base de lo dicho anteriormente, es posible definir como *secuencias conservadas* (o conservativas) aquellas secuencias de ADN que son compartidas en gran parte de su extensión en distintas especies de organismos, porque codifican proteínas o ARN que son de importancia para la supervivencia de organismos diversos. Estas secuencias pueden haberse originado muy antiguamente en el curso de la evolución biológica (p. ej., los citocromos son proteínas que intervienen en los procesos oxidativos aeróbicos y, desde un punto de vista evolutivo son muy antiguos, ya que probablemente existen desde la aparición de organismos que utilizan el oxígeno como aceptor de electrones). Estas secuencias conservadas sufren, a lo largo del tiempo evolutivo, la presión de mutación que introduce algunos cambios en la secuencia de aminoácidos, los cuales no llegan a alterar la función de la proteína codificada. Cuanto menor es la cantidad de cambios con el tiempo, *más conservada* es la secuencia, es decir que su integridad funcional resiste menos cambios. Una de las secuencias más conservadas es la de la histona H3, que solamente presenta tres aminoácidos cambiados sobre 102, entre vegetales como la arveja y mamíferos como la rata. Esto indica que la secuencia del gen de la histona H3 es altamente conservada.

Cuando se analizan secuencias de ADN genómico y se encuentra un posible gen, es habitual la consulta a bases de datos de secuencias de ADN para saber si la secuencia observada se encuentra también en otros organismos, y cuántas sustituciones de bases tiene en organismos emparentados y en organismos lejanos,

Panel 8-4. La anemia de Fanconi y sus genes

Panel

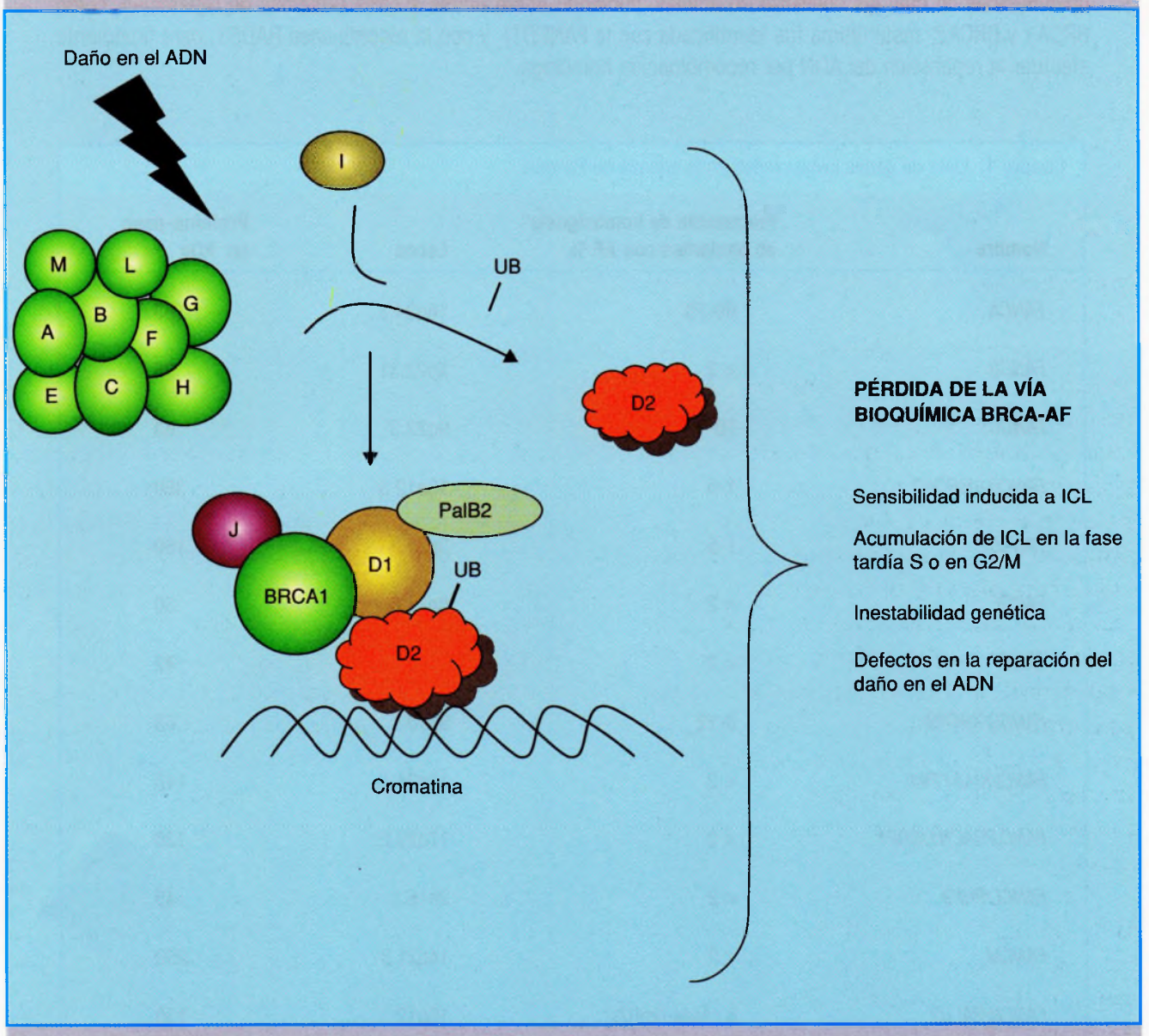


Fig. 1. Esquema de la vía bioquímica de la anemia de Fanconi (AF) y de la proteína BRCA1. UB: ubicuitina. MABLECGFH: complejo de proteínas de Fanconi formado por 9 proteínas. I, J, D1 y D2, otras proteínas de esta vía que se unen a la proteína PalB2 y a la BRCA1 para intervenir en la reparación del ADN. PALB2 = proteína asociada a BRCA2 (*partner and localizer of BRCA2*). ICL: entrelazamiento de hélices (del ADN).

La anemia de Fanconi, más que una anemia común, es un síndrome en el cual está afectado un sistema de genes de reparación del ADN que intervienen en algunos tipos especiales de lesiones del ADN: típicamente, cuando agentes entrelazantes (*cross-linking* en inglés) producen uniones anormales entre las dos hélices del ADN, tales como los agentes alquilantes (que introducen radicales o grupos alquílicos en el ADN), ciertas radiaciones ionizantes y algunas fracturas de doble cadena del ADN (Green AM, Kupfer G, 2009). El grupo de genes que intervienen en este síndrome, salvo uno, es de reciente aparición en la evolución biológica, y

aparece desarrollado sólo en mamíferos. Este grupo de genes incluye en total trece, de los cuales nueve intervienen en la formación de un "núcleo central" o complejo de proteínas Fanconi, compuesto por las M, A, E, L, B, C, G, F y H (cuadro 1). Este complejo es necesario para que la proteína I (FANC I) y la D2 (FANC D2) sean ubicuitinadas, lo cual las convierte en activas, pudiendo ahora unirse a otras proteínas de reparación, como BRCA1 y BRCA2 (esta última fue identificada con la FANCD1) y con la recombinasa RAD51, para finalmente efectuar la reparación del ADN por recombinación homóloga.

Cuadro 1. Lista de genes involucrados en la anemia de Fanconi

Nombre	Frecuencia de homozigosis en pacientes con AF. %	Locus	Proteína-peso en kDa
FANCA	60-70	16q24.3	163
FANCB	< 2	Xp22.31	95
FANCC	10-15	9q22.3	63
FANCD1/BRCA2	1-5	13q12.3	380
FANCD2	1-5	3p25.3	160
FANCE	< 2	6p21.3	60
FANCF	< 2	11p15	42
FANCG/XRCC9	8-12	9p13	68
FANCI/KIAA1794	< 2	15q25-6	146
FANCJ/BACH1/BRP1	< 2	17q23.2	130
FANCL/PHF9	< 2	2p16.1	43
FANCM	< 2	14q21.3	250
FANCN/PALB2	8 casos (2007)	16p12	130

para determinar si es o no una *secuencia conservada.*

Otro procedimiento usado en el caso de descubrir una secuencia de un nuevo gen es el llamado *Arca de Noé.* Se obtiene ADN de varios organismos, cercanos y lejanos al usado, y se efectúa una corrida electroforética *conjunta* de todos los ADN y, mediante el empleo de una sonda del ADN descubierto, se busca el grado de hibridación de la sonda con los distintos ADN Cuando se trata de un gen importante para el funcionamiento básico de los organismos, es probable que se observe un grado alto de hibridación en la mayoría o en todos los ADN

Ciertas proteínas admiten más cambios porque sus funciones son muy limitadas, como los fibrinopéptidos, que son partes del fibrinógeno

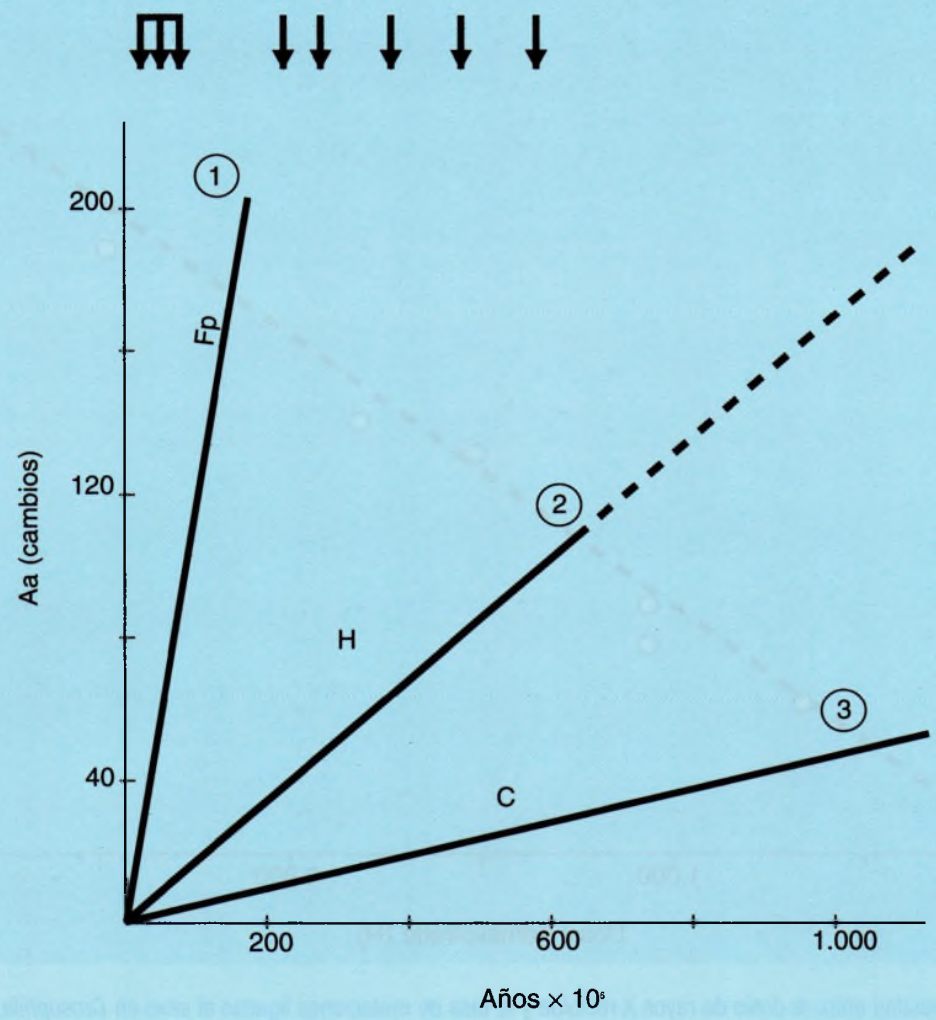


Fig. 8-7 Tasas de cambio en la secuencia de aminoácidos de: 1 fibrinopéptidos, 2) globina (hemoglobina) y 3) citocromo C, durante la evolución biológica. El tiempo transcurrido (abscisas) puede medirse en millones de años o en períodos geológicos. Los cambios se miden entre especies "modernas" de reciente aparición, como la humana, y especies "antiguas" que existían hace mucho tiempo. La secuencia más conservada es la del citocromo C y la menos conservada es la de los fibrinopéptidos.

que son cortadas y descartadas durante la producción de fibrina para la coagulación.

Este tipo de proteínas son *poco conservadas* y acumulan muchos más cambios con el paso del tiempo. Muchas otras proteínas son de un grado mediano de conservación (fig. 8-7) A nivel del ADN, los segmentos no codificantes son muy poco conservados, es decir que rápida mente sufren cambios que hacen que esas secuencias sean *divergentes* aun en especies bastante cercanas.

INDUCCIÓN DE MUTACIONES

Agentes "mutagénicos"

El genetista norteamericano H.J. Muller fue el primero en desarrollar en la década de 1920 un método artificial para aumentar la tasa de mutaciones mediante la aplicación de rayos X a la mosca *Drosophila.* Se ha comprobado que los rayos X, así como las demás radiaciones ionizantes, son poderosos agentes para *acelerar* la tasa de mutación.

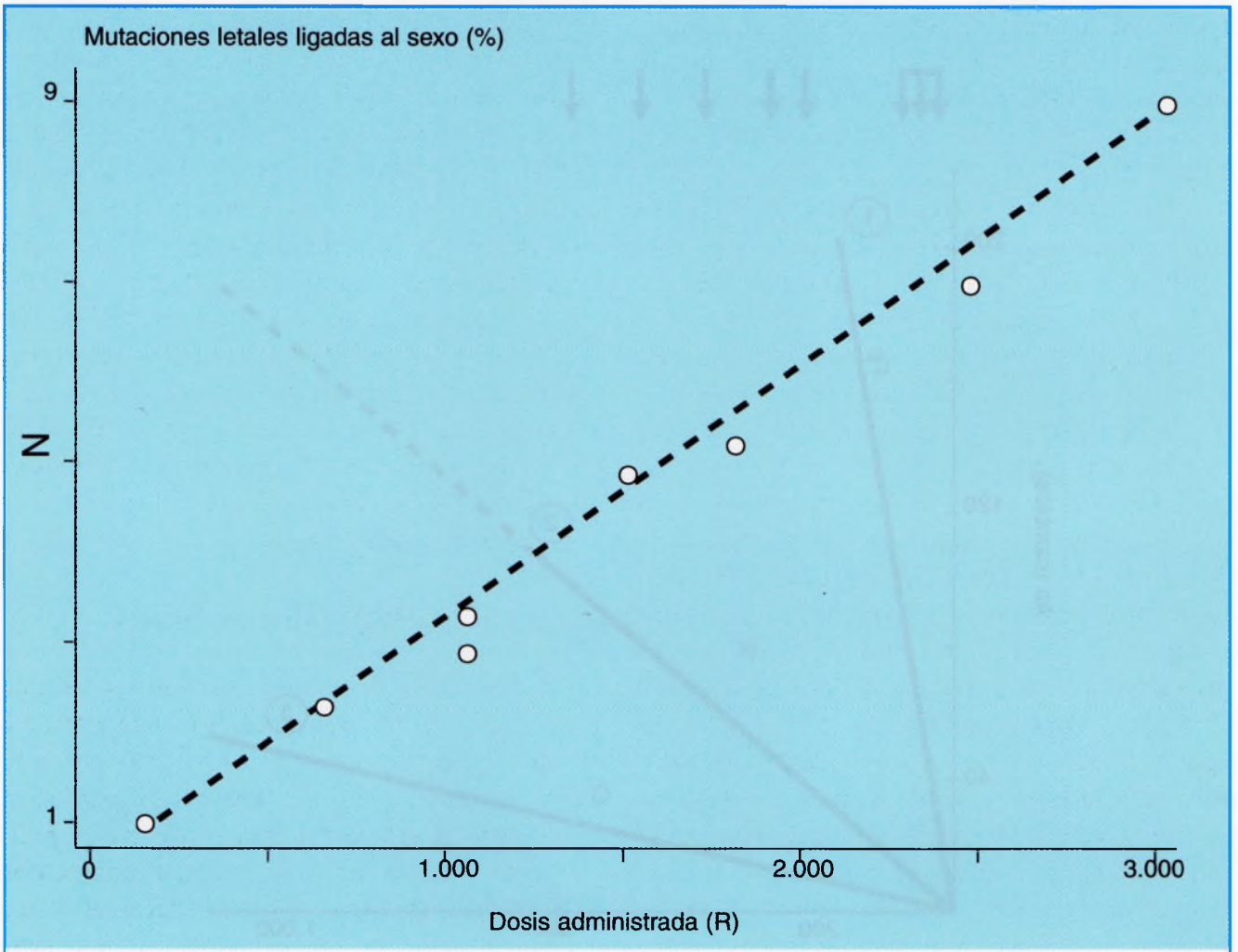


Fig. 8-8. Proporcionalidad entre la dosis de rayos X recibida y la tasa de mutaciones ligadas al sexo en *Drosophila*.

Las radiaciones aumentan la tasa de mutación en proporción directa a la intensidad de ionización provocada por la radiación (fig. 8-8); las dosis de radiación se miden en unidades Roentgen ($2{,}08 \times 10^9$ iones por cm^3 de aire), útiles para medidas físicas; en Medicina se usan más las siguientes unidades: el *rad* es la unidad de radiación *absorbida*, aproximadamente equivalente a un Roentgen, el *gray* corresponde a 100 rads, y el *sievert*, aplicable a varios tipos de radiación, es igual a 1 gray para radiación X. Para la especie humana, la dosis de rayos X estimada para duplicar la tasa de mutación *por generación* es de 1,69 sievert (= 169 rads)[23] en aplicación aguda, y la exposición habitual en países desarrollados es de 2 a 3 milisieverts en la población general. Las exposiciones a la radiación son *acumulativas* durante toda la vida, por lo cual la exposición crónica o sucesiva es importante, en especial para la inducción de *mutaciones somáticas* que pueden finalizar produciendo tumores.

A causa de esto, se recomienda bajar las exposiciones totales a la radiación, no sólo a la población general, sino especialmente a aquellas personas involucradas en actividades que requieren exposiciones reiteradas a la radiación en pequeñas dosis (radiólogos, dentistas, trabajadores de usinas nucleares y en medicina nuclear), para evitar el riesgo de desarrollo de leucemias u otros tumores.

El estudio de las poblaciones humanas sometidas a una irradiación aguda (los pobladores de Hiroshima y Nagasaki cercanos al foco de la explosión nuclear) han dado resultados en parte paradójicos. Por un lado, no se ha observado un incremento significativo de la tasa de

mutación aparente en la línea germinal, es decir que en los hijos de las personas irradiadas no se incrementó significativamente la aparición de mutaciones visibles en el fenotipo o detectables electroforéticamente.[23]

Por otro lado, la tasa de mutación somática se incrementó significativamente en las personas irradiadas, como lo demuestra el incremento en la incidencia de leucemias y otros tumores. Por consiguiente, la irradiación *aguda* parece afectar especialmente a las células troncales de los tejidos hematopoyéticos, de los epitelios de revestimiento y a otras con alto índice mitótico; en cambio, afecta menos a los espermatogonios troncales (tipo A oscuros), que poseen baja actividad mitótica, y prácticamente nada a las células germinales del ovario de la mujer adulta, que contiene sólo ovocitos sin actividad divisional. Es probable, además, que las células germinales afectadas más groseramente por la irradiación aguda (deleciones u otras aberraciones cromosómicas) degeneren antes de formar una gameta. Se considera que la especie humana, con un ciclo vital que es aproximadamente 20 veces más largo que el de roedores pequeños como el ratón, posee mecanismos de reparación del ADN más perfeccionados que estos organismos de ciclo vital corto (el ratón de 30 días ya posee espermatogénesis completa, por consiguiente, las células germinales del ratón no requieren, en condiciones ambientales normales, la eliminación de una gran cantidad de mutaciones acumuladas)

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción mutagénica de las radiaciones ionizantes es indirecto; es decir, la radiación induce cambios *premutacionales*, que si no llegan a ser reparados, al replicarse el ADN, pueden inducir a un error y provocar una mutación.

Las radiaciones producen fracturas de cadenas dobles y simples del ADN, tautomerización de bases e inactivación de enzimas por acción de radicales libres provocados por la radiación. Al actuar a través de radicales libres, la tasa de mutación inducida es influida por la presión parcial de oxígeno presente. La acción premutagénica de las radiaciones guarda semejanzas con la de sustancias químicas. La mayor parte (hasta un máximo del 90%) de las mutaciones inducidas por radiación son *deleciones*.[24] Se supone que el origen de estas deleciones se debe a incrementos de los errores de replicación, en especial "deslizamiento" de la polimerasa en regiones que contienen repeticiones en tándem, y recombinación no homóloga en repeticiones de la familia *Alu* o cerca de ellas. Por otra parte, las rupturas de cromosoma inducidas por radiación no ocurren al azar, sino que se concentran en una parte de las bandas reversas (bandas R), estas regiones son llamadas bandas T y son ricas en CG y secuencias repetidas *Alu*.[24]

Agentes mutagénicos químicos

Numerosas sustancias han sido probadas para determinar su potencialidad mutagénica, y un grupo de ellas se reconocen como potentes agentes premutagénicos, tales como sustancias alquilantes, que se combinan con el ADN, produciendo aductos, entre los cuales encontramos la dimetilnitrosamina, el metil metanosulfonato y otros. Muchos de estos compuestos son también poderosos inductores de cáncer en animales de experimentación (es decir que muchos agentes mutagénicos son también cancerígenos)

Ciertos agentes cancerígenos, cuando son administrados por boca a animales, no son de por sí mutagénicos; pero en varios casos se ha comprobado que los cambios químicos introducidos por enzimas del citoplasma del hepatocito, tales como la citocromo-oxidasa P-450, en el animal, transforman el compuesto inocuo en otro que es cancerígeno y mutagénico. Esta amplia superposición entre mutagénesis química y potencial carcinogenético se corrobora con la prueba ideada por el genetista B. Ames, que es simple y económica porque se basa en la posibilidad de que un agente mutágeno revierta la mutación de una bacteria (del género *Salmonella*) y permita su crecimiento en un medio sin histidina (que es requerida por el mutante) El medio de cultivo también tiene agregado extracto hepático para proveer las modificaciones enzimáticas que pueden convertir a una sustancia en

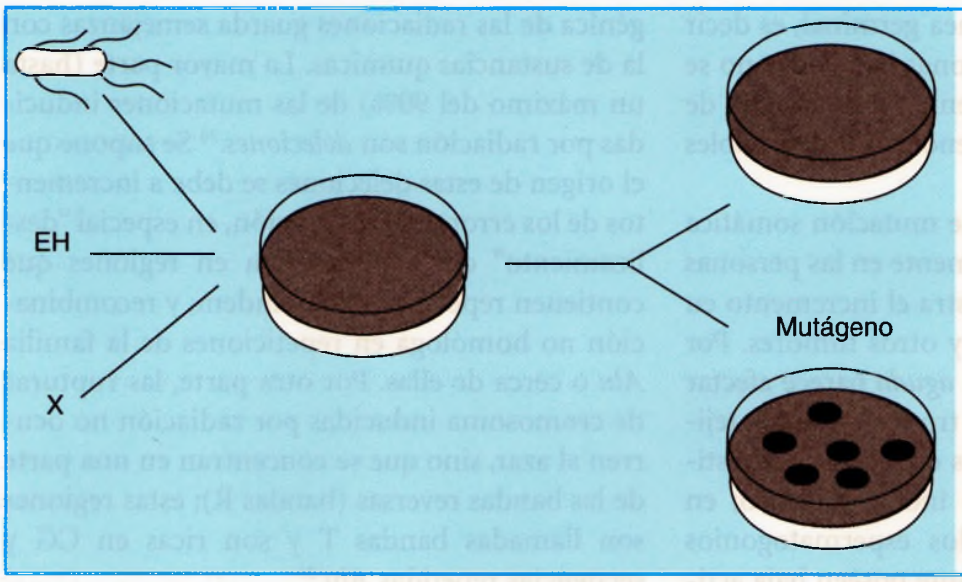


Fig. 8-9. Prueba de Ames para detectar agentes mutagénicos y carcinogénicos. El medio de cultivo contiene una cepa mutante de la bacteria *Salmonella* sp. que requiere histidina para proliferar, y se agregan extracto hepático (EH) y la sustancia para probar (X). Si la sustancia es mutagénica, algunas mutaciones revierten la bacteria para la normalidad y esto se expresa por un número de colonias (de bacterias que proliferan).

mutagénica (fig. 8-9) [25] Mediante este tipo de pruebas se ha demostrado el potencial mutagénico de un número considerable de contaminantes ambientales.

En la época actual, es elevada la cantidad de productos químicos diferentes que son introducidos en el ambiente cada año para diversas aplicaciones: agroquímicos (plaguicidas, fertilizantes), aditivos alimentarios (conservantes, aromatizantes, colorantes, modificadores de consistencia), medicamentos, cosméticos, productos usados en las industrias (para los procesos de fabricación, envasado o protección de sus productos), en minería, en transportes y en otras actividades humanas como la deforestación, el quemado de combustibles, o el consumo de narcóticos adictivos. Una estimación de la cantidad de estas sustancias nuevas que integran nuestro medio ambiente (aire, agua, suelo) daba una cifra de 10.000 por año. Muchos de estos compuestos son sometidos a estrictas pruebas para determinar su posible efecto mutagénico humano o para otros seres vivos. El "test" de Ames recién descrito es uno de los varios que suelen utilizarse, por ser relativamente simple, puesto que usa un material biológico muy sencillo, como es la bacteria. Otras pruebas, en material biológico progresivamente más complejo, son los que buscan hallar efectos mutagénicos en organismos eucariontes (levadura, insectos como *Drosophila*, mamíferos como el ratón, o en cultivos de tejidos como ovario de hámster chino [CHO] o de tejidos humanos) Se intenta comprobar, en estos organismos o células, si bajo la presencia o no de la sustancia de interés hubo un cambio en la frecuencia de alteraciones observables en el microscopio (aberraciones cromosómicas, micronúcleos, mitosis alteradas), en la capacidad reproductiva o en otras funciones o comportamientos. En la escala más compleja, en seres humanos, se estudian estas mismas evidencias de cambios, en las muestras (linfocitos, espermatozoides) obtenidas en las personas expuestas a los diversos agentes sospechados (en su actividad habitual, o accidentalmente)

Mutación dirigida por métodos de ingeniería genética

La técnica de RCP (PCR) ha proporcionado una poderosa herramienta para introducir cambios génicos que luego, por la técnica de reemplazo génico dirigido, pueden insertarse experimentalmente en el genoma de células. Mediante la primera técnica, es posible introducir cambios en un gen (pequeño) cuya secuencia es totalmente conocida. Al elegir un primero adecuado, que contenga una base sustituida en un triplete predeterminado, es posible *amplificar* el gen con ese cambio y, de esa manera obtener cantidades significativas de un gen mutado en un lugar previamente elegido. Mediante la segunda técnica, es posible por

recombinación homóloga introducir el gen mutado en reemplazo del gen original. Mediante estas metodologías también se espera provocar el efecto inverso, es decir, introducir el gen sano en células mutadas, así como inhabilitar experimentalmente (*knock-out*=noquear) a genes cuya función en el desarrollo embrionario se desea conocer.[26]

ESPECTROS DE MUTACIÓN DE GENES HUMANOS

Dada la complejidad de la estructura de los genes humanos, es lógico esperar que un determinado gen pueda ser afectado de numerosas maneras, es decir que pueda ser objeto de muchas y muy diversas mutaciones. Estas diferentes mutaciones que afectan al mismo gen pueden expresarse de modo muy variado: desde cambios "silenciosos" que a lo sumo generan un polimorfismo de ADN o de proteína, pasando por formas moderadas de afectación del fenotipo, hasta formas severas de una enfermedad.

Por consiguiente, al buscar el origen de una enfermedad hereditaria mendeliana (monogénica), muchas veces se encuentran diferentes mutaciones de un mismo gen que generan esta dolencia. Ésta es una de las fuentes importantes de la *heterogeneidad genética* de las enfermedades hereditarias (otras fuentes se verán en otros capítulos) El conjunto de mutaciones conocidas que afectan a un gen es conocido como el *espectro de mutación* de ese gen. Estos espectros de mutación son muy útiles para el diagnóstico y para investigar el origen de las mutaciones en poblaciones humanas, y sólo empezaron a estar disponibles a medida que se han ido clonando y secuenciando genes humanos. Algunos de los genes humanos para los que se posee esta información se encuentran en el cuadro 8-5.

En estos y otros genes conocidos es posible obtener un "espectro mutacional" que muestra, en general, que no todos los segmentos de un gen son afectados con igual frecuencia. Uno de los ejemplos más estudiados es el gen responsable de la fibrosis quística. Este gen codifica la proteína de un canal de ión cloro en la membrana celular de glándulas exocrinas, es de gran tamaño y consta de 27 exones. Hasta 2007 se habían comunicado 1.400 mutaciones de este gen,[27] que no están repartidas uniformemente sobre el gen, sino concentradas sobre los exones 10-12 y 19-22, que son los que codifican las regiones que se

Cuadro 8-5. Genes de interés médico y de estructura conocida

Gen mutacional	Tamaño	Nº de exones	Enfermedad
G6PD (glucosa 6-P deshidrogenasa)	18 kb	13	Anemia hemolítica
β-Globina	1,5 kb	3	β-talasemias, anemias
FAH (fenilalanina hiroxilasa)	90 kb	13	Fenilcetonuria (PKU)
Factor VIII de coagulación	186 kb	26	Hemofilia A
HPRT (hipoxantina P-ribosil transferasa)	44 kb	9	Síndrome de Lesch-Nyhan
HEX-A (hexosaminidasa A)	35 kb	14	Enfermedad de Tay-Sachs
CFTR (regulador transmembranoso de fibrosis quística)	250 kb	27	Fibrosis quística
Distrofina	2 Mb	75	Distrofia muscular (Duchenne-Becker)
COL1 A1 (colágeno I)	19 kb	50	Osteogénesis imperfecta
SRY (región determinante del sexo, cromosoma Y)	2,1 kb	1	Reversión sexual
LDLR (receptor de lipoproteína de baja densidad)	45 kb	18	Hipercolesterolemia familiar

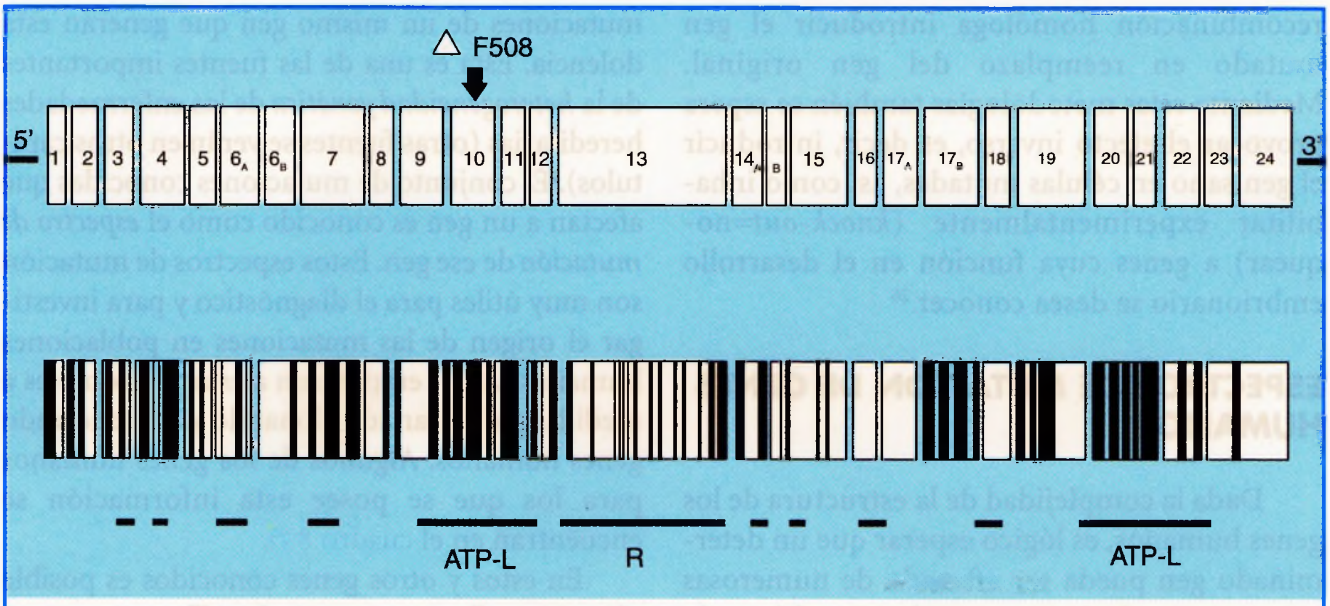


Fig. 8-10. Espectro de mutación del gen *CFTR* (fibrosis quística). Las líneas verticales denotan la localización de cada mutación. El gen está dibujado desde el extremo 5' hasta cerca del extremo 3' La mutación predominante (ΔF508) está señalada aparte, encima del exón 10. Hacia abajo se esquematizan los segmentos de la proteína codificada. ATP-L. dominio ligante de ATP· R: dominio regulador.

unen al ATP en la proteína reguladora producto de este gen (fig. 8-10). Estas regiones pueden ser críticas para la función de la proteína y por ello las mutaciones son más fácilmente observables. Sin embargo, una *sola mutación es responsable del 67% de los pacientes* (la Δ F508) (véase en el cap. respectivo)

La presente convergencia de estudios centrados en las rupturas del ADNdc

Las rupturas de las dos cadenas del ADN, como se dijo más arriba, son un frecuente efecto de la exposición a radiaciones ionizantes, aunque también pueden ser producidas por endonucleasas y por otros mecanismos. Por otra parte, como se verá al analizar la meiosis (cap. 12) un fenómeno fundamental en la meiosis es la producción (normal) de numerosas fracturas de ADN durante el lepto-cigotene, producidas por la endonucleasa SPO11, rupturas que dan lugar a la *recombinación meiótica* normal. Además, y desde otra área, son conocidas una serie de enfermedades y tumores en los cuales existe la llamada "inestabilidad cromosómica" por la frecuente aparición de fracturas de cromátidas, fusiones anormales y fracturas de cromosomas, y gran incremento de los "intercam bios de cromátidas hermanas", entre las cuales están la ya citada anemia de Fanconi y el síndrome de Bloom. Finalmente, el aislamiento de ciertos genes de predisposición al cáncer de mama, como los genes *BRCA1* y *BRCA2* , por su importancia médica, llevaron a analizar las funciones de sus productos (las grandes proteínas del mismo nombre, con sigla pronunciada BRACA1 y BRACA2) y se encontró que ambas proteínas estaban relacionadas con la reparación de fracturas de ADNdc y con la recombinación meiótica, además de la susceptibilidad al cáncer de mama, de ovario y otros órganos. Adicional mente, otras proteínas, como la quinasa ATM (del gen de *m*utación de *a*taxia y *t*elangiectasia), helicasas que destruercen las hélices del ADN y proteínas componentes de los sistemas de reparación REMA y REN, también están asociadas con la reparación de las fracturas de ADNdc. Es decir que esta lesión del ADN es central en un número creciente de áreas de la Genética humana normal (meiosis y evolución) y en Patología, especialmente de tumores.

Los genes *BRCA1* y *BRCA2*

Estos dos genes no tienen homólogos en vertebrados inferiores: se encuentran sólo en los mamíferos placentados. El gen *BRCA1* está localizado en el cromosoma 17q12 y el gen *BRCA2* en el cromosoma 13q12.3 Estos genes están relacionados con casos de cáncer mamario familiar (que es sólo el 10% del total de cáncer mamario) y no están alterados en el cáncer mamario esporádico y en algunos de los familiares (90% del total) Las mutaciones de estos genes son dominantes, es decir que los heterocigotas muestran la predisposición al tumor, y las células propias del tumor han sufrido alteración en los dos alelos (*pérdida de heterocigosidad*) Se considera que *BRCA1* y *BRCA2* son genes "supresores" de tumores a través del mecanismo de evitar la inestabilidad cromosómica, que en caso de estar mutados, se manifiesta por las aberraciones de cromátidas y de cromosomas, incluida la recombinación mitótica anormal que produce seudoquiasmas, trirradiales y tetrarradiales.

Los dos genes codifican proteínas muy grandes: BRACA1, de 1.863 aa y BRACA2 de 3.418 aa.[28] Estas dos proteínas se encuentran en los núcleos celulares, y en sus funciones se asocian específicamente con otras proteínas y con segmentos de ADN dañado, para dirigir el proceso de reparación de la ruptura del ADN en la dirección correcta, que es afín a la usada en la recombinación meiótica normal en las células germinales.[28]

La proteína BRCA1 presenta un dominio *en anillo* hacia su extremo N terminal, una región media de asociación con la proteína (endonucleasa) MRE11 y otras proteínas, y dos dominios en el extremo C-terminal, relacionados con la regulación del ciclo celular (fig. 8-11).

Las funciones de la BRCA1 están vinculadas con la señalización de sitios dañados del ADN y con modificaciones de la arquitectura de la cromatina en dichos sitios, es decir, coordina los mecanismos de detección del daño del ADN con las diversas respuestas adecuadas al caso.[28] Uno de los cambios más inmediatos a la producción de una ruptura de ADNdc es la aparición sobre la zona de la lesión, en minutos solamente, de la histona (variedad) H2A-X fosforilada, e inmediatamente se sigue la asociación de BRCA1 con esa zona. Por eso se supone que la fosforilación y acumulación de H2A-X fosforilada es un prerrequisito para el reclutamiento inmediato de BRCA1 y la coordinación de la respuesta a la lesión.

La proteína BRCA2, mucho mayor, tiene aparentemente un papel activo y central en el mecanismo de reparación de la lesión. La BRCA2 posee ocho "motivos" o repeticiones de unos 40 aa cada uno en su región central, que están relacionados con el reclutamiento y

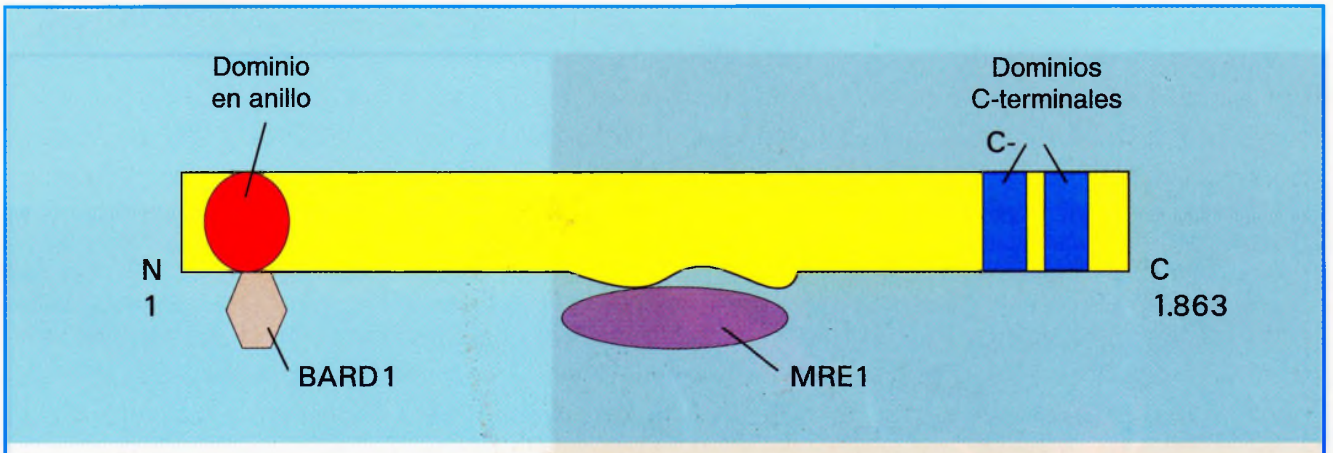


Fig. 8-11 Esquema de la proteína BRCA1 con su dominio en anillo que forma una asociación con la proteína BARD1 que funciona como ligasa de ubicuitina; un dominio medio que se asocia con la endonucleasa MRE11 y los 2 dominios reguladores del extremo C-terminal.

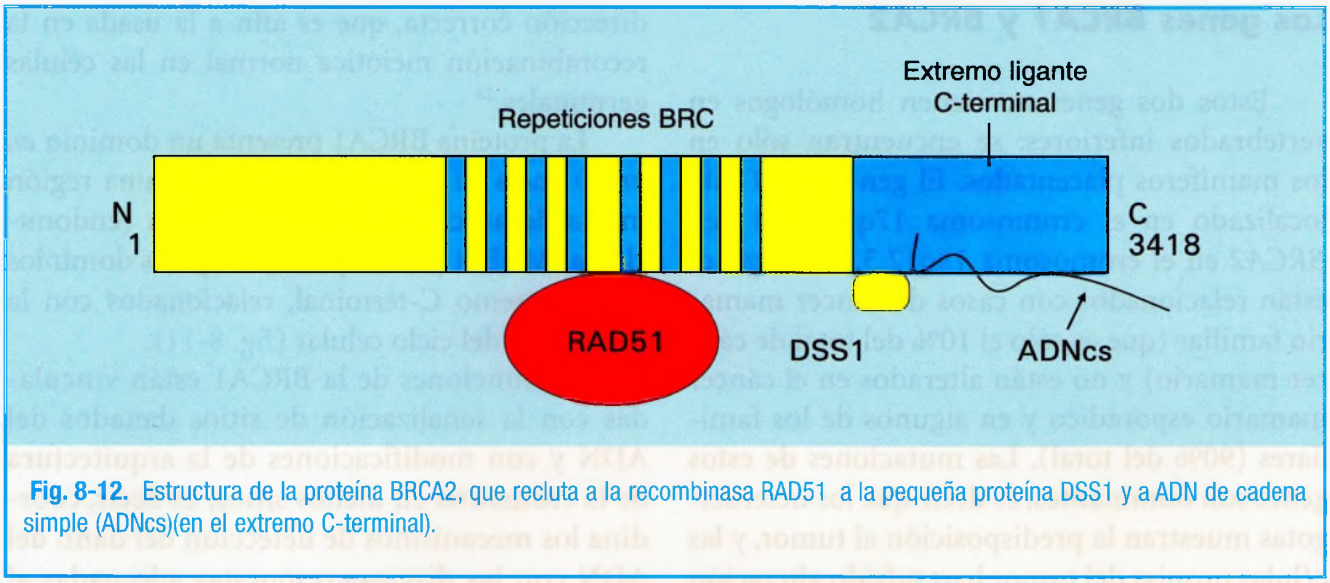


Fig. 8-12. Estructura de la proteína BRCA2, que recluta a la recombinasa RAD51 a la pequeña proteína DSS1 y a ADN de cadena simple (ADNcs)(en el extremo C-terminal).

asociación de la importante recombinasa RAD51 En su extremo carboxilo posee una región de 800 aa con cinco dominios, ligante por un lado a la proteína DSS1 y por otro a ADNcs.[29] (figs. 8-12 y 8 13)

La función de BRCA2 estriba en el recluta miento de la recombinasa RAD51 en una forma activa (fosforilada por una quinasa como la proteína ATM, véase más arriba) para que la recombinasa se acople al ADN de cadena sim ple abierto en los extremos de la ruptura, y en presencia de una molécula homóloga de ADNdc se inicie y prosiga el camino de la repa ración por recombinación (similar al de la meiosis) (fig. 8-14)

Otros genes involucrados en la reparación del daña al ADN

Además de los papeles centrales de las proteínas BRCA1, BRAC2 y la recombinasa RAD51, otros genes y sus proteínas están involucrados en la reparación de las fracturas de ADN (y en el bloqueo de la horquilla de replicación del ADN) Varios de estos genes accesorios, si están altera dos, dan por resultado los *síndromes de inestabilidad de los cromosomas*, que se caracterizan por alteraciones múltiples en los cromosomas. Uno de ellos, ya mencionado, es la anemia de Fanconi, en la cual recientemente se han confirmado varios productos génicos, seis de los cuales pue-

Fig. 8-13. "Motivos" o repeticiones BRC en la proteína BRCA2 por los cuales se asocia con la recombinasa RAD51

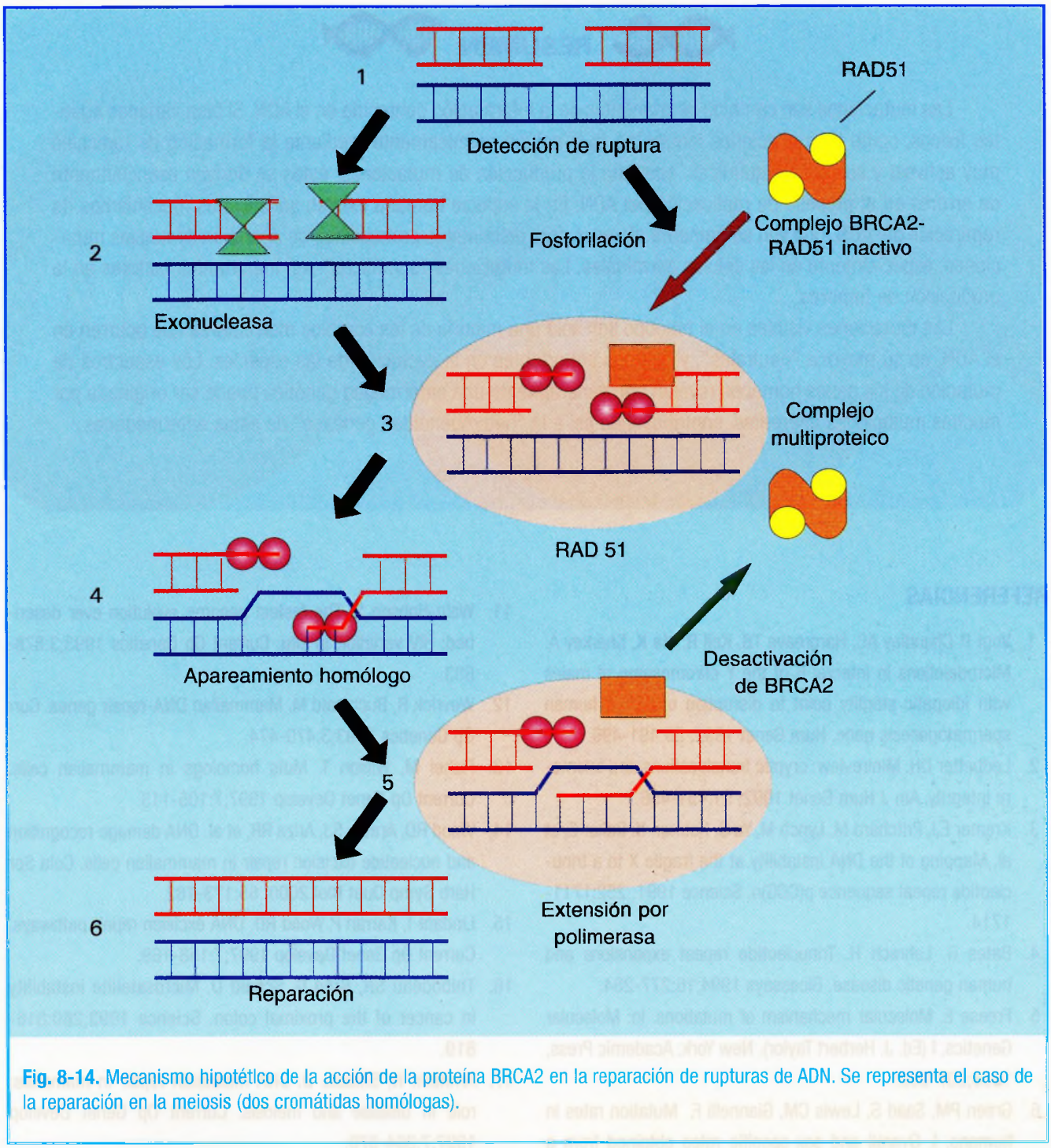


Fig. 8-14. Mecanismo hipotético de la acción de la proteína BRCA2 en la reparación de rupturas de ADN. Se representa el caso de la reparación en la meiosis (dos cromátidas homólogas).

den por mutación producir enfermedad.[30] Los productos de estos genes intervienen en la formación de complejos de múltiples proteínas que se localizan en el núcleo celular y que en asociación con la proteína BRCA1 se asocian con lugares del ADN dañados por agentes entrelazantes (*cross-linking*) del tipo de la mitomicina C o los diepoxibutanos, que unen covalentemente las dos hélices del ADN e impiden el paso de la horquilla de replicación (véase panel 8-4)

RESUMEN

Las mutaciones son cambios permanentes de la información contenida en el ADN. Si bien variados agentes físicos, como las radiaciones ionizantes (que actúan químicamente mediante la formación de radicales muy activos) y sustancias químicas, aceleran la producción de mutaciones, éstas se derivan esencialmente de errores en el proceso de replicación del ADN. En la especie humana existen sofisticados mecanismos de reparación del ADN, que son sumamente eficaces para disminuir la probabilidad de aparición de nuevas mutaciones, especialmente en las células germinales. Las mutaciones "somáticas" son importantes factores en la producción de tumores.

Las mutaciones visibles en el fenotipo son sólo una minoría de los cambios moleculares que ocurren en el ADN, en su mayoría "neutrales", y que son importantes en la evolución de las especies. Los espectros de mutación de los genes humanos revelan que generalmente una enfermedad genética puede ser originada por muchas mutaciones diferentes, contribuyendo así a la "heterogeneidad genética" de estas enfermedades.

REFERENCIAS

1 Vogt P Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopatic sterility point to disruption of AZF a human spermatogenesis gene. Hum Genet 1992; 89:491-496.

2. Ledbetter DH. Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. Am J Hum Genet 1992; 51:451-456.
3. Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, et al. Mapping of the DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. Science 1991 252:1711 1714.
4. Bates G, Lehrach H. Trinucleotide repeat expansions and human genetic disease. Bioessays 1994;16:277-284.

5 Freese E. Molecular mechanism of mutations. In: Molecular Genetics, I (Ed. J. Herbert Taylor). New York: Academic Press, 1963;207-269.

6. Green PM, Saad S, Lewis CM, Giannelli F Mutation rates in humans. I. Overall and sex-specific rates obtained from a population study of hemophlia B. Am J Hum Genet 1999; 65:1572-1579.

7 Hurst LD, Ellegren H. Sex biases in the mutation rate. TIG 1998;14: 446-452.

8. Slagboom PE, Vijg J. Genetic instability and aging: theories, facts and future perspectives. Genome 1989;31:373-385.
9. Radman M, Wagner R. The high fidelity of DNA duplication. Sci American 1988;259:24-30.
10. Kunkel TA, Bebenek K, Roberts JD, Fitzgeral MP Thomas DC. Analysis of fidelity mechanisms with eukaryotic DNA replication and repair proteins. Genome 1989;31·100-103.
11 Wain-Hobson S. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. Current Op Genetics 1993;3:878-883.
12. Wevrick R, Buchwald M. Mammalian DNA-repair genes. Curr Op Genetics 1993;3:470-474.
13. Fishel M, Wilson T Muts homologs in mammalian cells. Current Op Genet Develop 1997·7·105-113.
14. Wood RD, Araujo SJ, Ariza RR, et al. DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells. Coid Spr Harb Symp Quat Biol 2000; 65:173-182.
15. Lindahl T, Karran P Wood RD. DNA excision repair pathways. Current Op Genet Develop 1997·7·158-169.
16. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 1993;260:816-819.

17 Arnheim N, Shibata D. DNA mismatch repair in mammals: role in disease and meiosis. Current Op Genet Develop 1997;7:364-370.

18. Bathia PK, Wang Z, Friedberg EC. DNA repair and transcription. Current Op Genet Develop 1996;6:146-150.
19. Hoeijmakers JH, Egly JM. Vermeulen W. TFIIH: a key component in multiple DNA transactions. Current Op Genet Develop 1996;6:26-33.
20. Ellis NA, German J. Molecular genetics of Bloom's syndrome. Human Mol Genet 1996;5:1457 1463.

21 Epstein CJ, Motulsky AG. Werner syndrome: entering the helicase era. BioEssays 1996;18:1025-1027

22. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists. Genome 1989;31:24-31

23. Neel JV, Schull JW, Awa A, Satoh C, Otake M, Kato H, et al. Implications of the Hiroshima-Nagasaki genetic studies for the estimation of the human "doubling dose" of radiation. Genome 1989;31:853-859.
24. Sankaranarayanan K. Ionizing radiation, genetic risk estimation and molecular biology: impact and inferences. Trends in genetics 1993;9:79-84.
25. Ames B, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Natl Acad Sci USA 1973;70:2281-2285.
26. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. Science 1989;244:1288-1292.
27 Alibakhshi R, Kianishirazi R, Cassiman JJ, et al. Analysis of he CFTR gene in Iranian cystic fibrosis patients: Identification of eight novel mutations. J Cyst Fibros 2008;7·102-109.
28. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell 2002;108:171 182.
29. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. Science 2002;297·1837 1848.
30. Joenje H, Pate KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. Nature Rev Genet 2001;2:446-457

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

De la Torre C, Pincheira J, López-Saez JF Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks. Histol Histopathol 2003;18:225-243.

Ellegren H. Characteristics, causes and evolutionary consequences of male-biased mutation. Proc Biol Sci 2007;274: 1 10.

Green AM, Kupfer GM. Fanconi anemia. Hematol Oncol Clin N Am 2009;23:193-214. Gatchel JR, Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principies. Nat Rev Genet 2005;6:743-755.

Hickson ID (ed.). Base Excision Repair of DNA Damage. Georgetown: RG Landes Co., 1997·184.

Macé G, Briot D, Guervilly J-H, Roselli F L'anémie de Fanconi: aspects cellulaires et moléculaires. Pathologie Biologie 2007;55:19-28.

Sancar A, Sancar GB. DNA repair enzymes. Ann Rev Biochem 1988; 57:29-67

Sugasawa K. Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. Carcinogenesis 2008;29:455-465.

21. Meel JV, Schull JV, Awa A, Satoh C, Otake M, Kato H, et al. Implications of the Hiroshima-Nagasaki genetic studies for the estimation of the human "doubling dose" of radiation. Genome 1989;31:853-859.

24. Sankaranarayanan K. Ionizing radiation, genetic risk estimation and molecular biology: impact and inferences. Trends in genetics 1992;8:70-84.

25. Ames B, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Natl Acad Sci USA 1973;70:2281-2285.

26. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. Science 1989;244:1288-1292.

27. Alibardhani R, Kleinerman R, Chakrabarti JJ, et al. Analysis of the CFTR gene in Iranian cystic fibrosis patients: identification of eight novel mutations. J Cyst Fibros 2008;7:102-109.

28. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell 2002;108:171-182.

29. Yang H, Pellegrini PD, Miller J, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. Science 2002;297:1837-1848.

30. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. Nature Rev Genet 2001;2:446-457.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

De la Torre C, Pinchera J, López-Saez JF. Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks. Histol Histopathol 2003;18:225-243.

Ehlayen H. Characteristics, causes and evolutionary consequences of male-biased mutation. Proc Biol Sci 2007;274:1-10.

Green AM, Kupfer GM. Fanconi anemia. Hematol Oncol Clin N Am 2009;23:193-214. Gatchel JR, Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. Nat Rev Genet 2005;6:743-755.

Hickson ID (ed.). Base Excision Repair of DNA Damage. Georgetown: RG Landes Co., 1997;184.

Maoz G, Bhot D, Guelfguy J-H, Rosell F, L'anémie de Fanconi: aspects cellulaires et moléculaires. Pathologie Biologie 2007;55:19-28.

Sancar A, Sancar GB. DNA repair enzymes. Ann Rev Biochem 1988; 57:29-67.

Sugasawa K. Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. Carcinogenesis 2008;29:455-465.

Capítulo 9

Patrones de herencia humana

Tipos de herencia patológica. Dominancia y recesividad. Mecanismos moleculares en las enfermedades mendelianas. Patogenia de las enfermedades mendelianas. Poliquistosis renal. Acondroplasia. Enfermedades por expansión de tripletes. Enfermedad de Huntington. Neurofibromatosis. Fibrosis quística. Albinismo. Retinitis pigmentaria. Interacción alélica, epistasis y expresión variable. Ejemplos

Introducción: tipos de herencia en Medicina

La forma en que se transmiten de una generación a la siguiente los fenotipos resultantes de la interacción del genotipo con el ambiente se denominan "patrones hereditarios"

A medida que se sumaron las observaciones sobre los patrones de herencia de las enfermedades hereditarias, se los reunió en una clasificación de las enfermedades genéticas según su tipo de herencia (cuadro 9-1)

1 Enfermedades monogénicas o mendelianas, que siguen en términos generales las reglas o "leyes" establecidas por G Mendel (véase a continuación en este capítulo)
2. Enfermedades con herencia multifactorial, determinadas por varios genes de efecto simultáneo (enfermedades poligénicas), y que frecuentemente tienen un componente ambiental significativo (véase cap. 13)
3 Enfermedades de origen cromosómico o cromosomopatías, determinadas por variantes en el número correcto o por variaciones en la estructura de los cromosomas, y que habitualmente pueden ser diagnosticadas por medio de microscopia óptica (véase cap. 17)
4. Enfermedades con un tipo de herencia especial, tales como las enfermedades genéticas de las mitocondrias y las enfermedades por alteraciones de la impronta genómica (véanse caps. 13 y 12, respectivamente)

En el cuadro 9-1 se especifican los grupos de enfermedades genéticas que son de mayor relevancia en Medicina.

A la presente clasificación de las enfermedades genéticas se le hacen algunas salvedades que no modifican su utilidad didáctica y abarcadora; por ejemplo, ciertas alteraciones cromosómicas, como las microdeleciones y los *síndromes de genes contiguos* (véase cap. 18), pueden ser ubicadas ya sea entre las cromosomopatías o ya sea en las mendelianas, y pueden ser abordadas desde ambos puntos de vista. En cambio, las sugestiones de incorporar ciertas enfermedades genéticas como "desórdenes de la arquitectura genética"[1] no tienen consenso ni son abarcadoras como la presente clasificación de las enfermedades genéticas.

Cuadro 9-1. Tipos de enfermedades genéticas

Tipo	Herencia	Diagnóstico	Incidencia promedio	Ejemplos
Monogénicas	Mendeliana	Clínico; sondas de ADN	1·10.000 nacidos (muy variable)	Hemofilia, talasemia, acondroplasia
Multifactoriales (véase cap. 13)	> Incidencia familiar	Estadístico; marcadores	Muy frecuente	Paladar hendido, diabetes, hipertensión esencial
Cromosomopatías (véase cap. 17)	Ausente o irregular	Microscópico	1·1.000 nacidos	Síndrome de Klinefelter, otras trisomías
De herencia especial	No mendeliana	Clínico; sondas de ADN	1:31.000; 1·15.000 nacidos	Neuropatía óptica de Leber· síndrome de Prader-Willi

Los dos primeros tipos de enfermedades son de origen génico propiamente dicho, puesto que el factor genético está representado por un gen en las monogénicas o por uno o varios genes en la herencia multifactorial. En cambio, el tercer tipo, es decir, las cromosomopatías, si bien finalmente representan un desequilibrio funcional de genes, se originan por la alteración, visible al microscopio de luz, de todo un cromosoma o de algunas de sus partes, y no por la mala función de uno o de algunos genes. Es decir que las cromosomopatías son claramente separables de los primeros dos grupos por varias de sus características: 1) las cromosomopatías se estudian y se detectan con el microscopio de luz y forman parte del contenido de la citogenética humana, 2) las cromosomopatías se originan frecuentemente durante la meiosis de uno de los progenitores (aunque algunas se originan en divisiones mitóticas); 3) al estar involucrados cromosomas enteros o partes visibles de ellos, comprenden enormes bloques de genes y producen generalmente un cuadro formado por numerosos y graves síntomas (muchos son letales, tan precoces que sólo se detectan como abortos), y finalmente, 4) no son regularmente heredables, o no se heredan, salvo algunos de sus tipos, ya que la mayoría de las cromosomopatías se originan esencialmente por azar y la capacidad reproductiva del afectado se halla seriamente comprometida. Actualmente la técnica molecular de MLPA (véase cap. 3) también es útil en el análisis de las cromosomopatías.

Si bien las enfermedades humanas monogénicas y las alteraciones cromosómicas (cromosomopatías) han sido ampliamente reconocidas en medicina por razones históricas, las de mayor impacto sobre la salud de la población son las de herencia multifactorial. Por esta razón se estudiarán por separado (véase cap. 13) Lo que hace menos reconocido a este tipo de herencia es la falta de un patrón claro y regular de herencia que sea fácilmente identificable, así como la dificultad de evaluar el papel del factor ambiental en estas enfermedades. Las enfermedades de herencia multifactorial se detectan por la *tendencia* a una mayor incidencia dentro de una familia, comparada con el resto de la población. Sólo mencionaremos aquí que ellas incluyen enfermedades muy frecuentes, como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial esencial, numerosas malformaciones congénitas y varias enfermedades mentales. En su análisis se utilizan técnicas moleculares del tipo de los microarreglos (véase cap. 6) y métodos estadísticos del tipo poblacional y epidemiológico.

Finalmente, las enfermedades genéticas de origen mitocondrial se heredan exclusivamente por vía materna, no en forma mendeliana. Las enfermedades por alteración de la impronta genómica presentan diversos tipos de herencia, ya sea como microdeleciones, o como la *disomía uniparental* (véase cap. 12) Sin embargo, la prevalencia de estas enfermedades de herencia especial es significativamente menor que las de otras categorías.

Un grupo importante de enfermedades de herencia monogénica, las enfermedades originadas por la expansión de tripletes repetidos, presenta características especiales, de tal forma que serán estudiadas en una sección particular de este capítulo.

Las cromosomopatías se estudian junto con la descripción del cariotipo humano (véase cap. 17) y en parte con el estudio de la meiosis (cap. 12), por eso aquí se continuará sólo con los rasgos y enfermedades monogénicas o mendelianas.

Enfermedades monogénicas. Herencia mendeliana

Cada individuo ha recibido un conjunto de cromosomas de su padre y otro conjunto de su madre; cada conjunto se denomina *haploide* (de *haplos*: mitad) y en la especie humana está constituido por 23 cromosomas. Los 23 cromosomas provenientes de un progenitor son 22 *autosomas* y un cromosoma sexual; al ser los autosomas provenientes de un progenitor muy parecidos a los que provienen del otro (aunque no de contenido génico idéntico) son "cromosomas homólogos" que forman parejas con idéntica morfología. Por ejemplo, el cromosoma Nº 1 paterno y el materno normalmente son de idéntica forma y patrón de bandas (véase cap. 17) Los genes, en el individuo *diploide* (que tiene dos conjuntos cromosómicos), también se encuentran por parejas, cada uno ocupando un lugar o locus equivalente en cada par de cromosomas homólogos. Si el gen que ocupa un locus en un cromosoma es idéntico al que ocupa ese locus en el cromosoma homólogo, el individuo es llamado *homocigota* para ese gen, en caso contrario es *heterocigota* para ese gen.

Los individuos homocigotas para un gen, lo expresan de una sola manera, en cambio, los individuos heterocigotas para un gen pueden expresar una de las dos formas del gen, o las dos, o una forma intermedia o mezclada (las variantes de un gen se denominan *alelos*) Cuando un heterocigota expresa un solo alelo, ese alelo se llama *dominante* sobre el otro; cuando un alelo necesita estar en estado homocigota para expresarse, se llama *recesivo*. Cuando ambos alelos se expresan en el fenotipo, se llaman *codominantes* o *de herencia intermedia*. Estos tipos de herencia fueron definidos por los rasgos del fenotipo a partir de Mendel y fueron aplicados a la Genética Médica.

La definición de dominancia implica que no hay diferencia fenotípica entre el heterocigota para un rasgo dominante y el homocigota para ese mismo alelo. Esto es así en la herencia del grupo sanguíneo humano, del sistema AB0: un individuo agrupado como A (*fenotipo*) puede tener el *genotipo* A0 o bien AA, sin que por el método habitual sea posible distinguir entre ambos. Sin embargo, esto es excepcional, y se debe que el gen *AB0* con sus tres alelos codifica dos tipos de glicosil transferasas (para A y para B) o su ausencia (para 0) Como resultado, los individuos AA y los A0 tienen un fenotipo idéntico [2] Esto no ocurre así en la mayoría de las enfermedades hereditarias monogénicas humanas: casi sin excepción, los homocigotas para un alelo dominante mutado manifiestan un fenotipo notablemente distinto de los heterocigotas puesto que lo expresan en forma más intensa y severa. Una de las pocas excepciones a esta regla es la enfermedad de Huntington, como se verá más adelante. Por ello en este libro se denomina dominante a un alelo que se expresa en el heterocigota, sin importar cuál es el otro alelo.

El ejemplo típico de herencia del tipo codominante es el rasgo humano normal (no patológico) del sistema del grupo sanguíneo AB0; el heterocigota que posee ambos alelos (el A y el B) expresa los dos (tiene el grupo sanguíneo AB) En cambio el 0 es recesivo frente al A y al B (el heterocigota A0 expresa sólo el A) Sin embargo, en muchas ocasiones, el patrón de herencia no es absolutamente rígido ni coincidente con las reglas mendelianas; ello se debe al largo trecho que separa los rasgos del fenotipo de las variantes moleculares del gen, ya que la expresión de un gen involucra numerosos procesos bioquímicos a distintos niveles. Así, en el núcleo celular se producen la transcripción y el procesamiento del ARN (véase cap. 4), en el citoplasma, la traducción y el procesamiento postraduccional, y luego, a nivel de los tejidos, de los órganos y

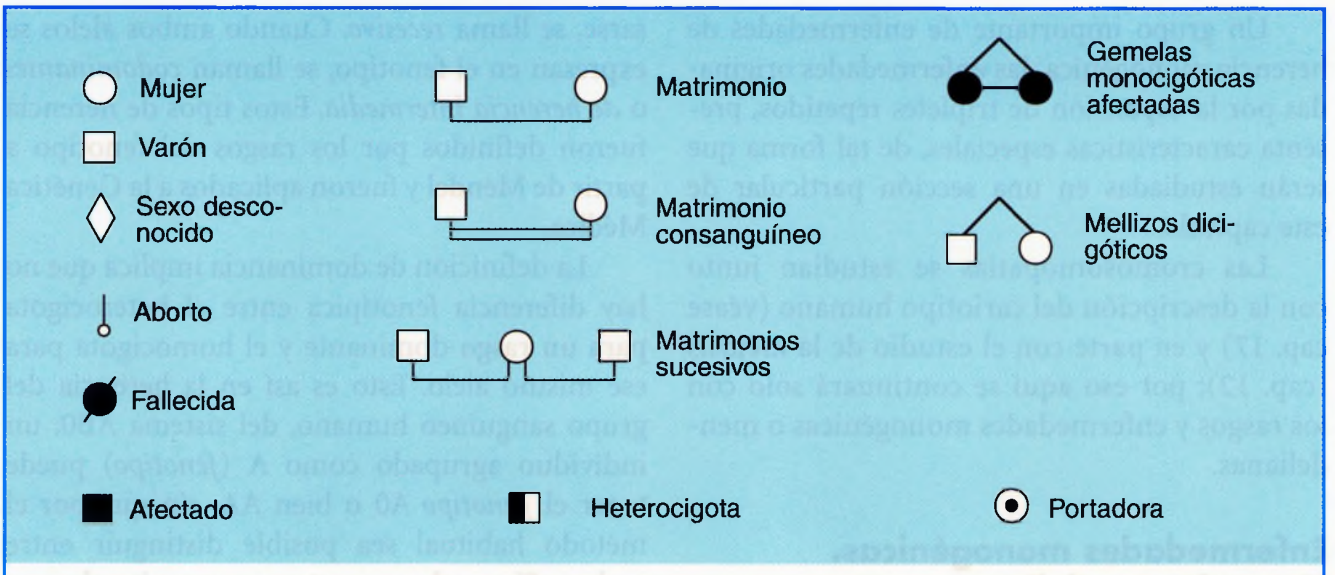


Fig. 9-1 Símbolos usados en genealogías. "Mellizos" = gemelos dicigóticos.

finalmente en el organismo completo se puede ir haciendo menos clara la expresión de un gen por la interacción con otros procesos. Aun así, un número de enfermedades y rasgos normales pueden asignarse a las categorías mendelianas, aceptando ciertas limitaciones a estas reglas. Una de las limitaciones se refiere al grado de expresión (o manifestación fenotípica) que puede producir un gen (*penetrancia*) Penetrancia es el grado (en porcentaje del efecto máximo) en que un gen dominante en un heterocigota, o un gen recesivo en un homocigota, expresa un efecto detectable en el fenotipo. Por consiguiente, la penetrancia de un gen determinado puede ser variable entre 0 y 100%. La penetrancia baja de un gen tiende a ocultar sus efectos, pero a medida que se desciende de los rasgos fenotípicos a los exámenes de laboratorio, hasta las características de las proteínas producidas o a las del ADN, la "baja" penetrancia desaparece y frecuentemente es posible observar los efectos del gen en su producto primario (polipéptido) Cuando un gen recesivo tiene su locus en el cromosoma X, su patrón de herencia es característico, puesto que se expresa siempre en los varones (que poseen un solo X) y raramente en la mujer (excepto que ella sea homocigota), este patrón se denomina de ligamiento al X o ligamiento al sexo y es descrito en detalle en el capítulo 11

Genealogías (árboles genealógicos)

El estudio genético se basa inicialmente en la consulta de una persona afectada o de un paciente y sus familiares, pero debe extenderse a todos los miembros posibles de esa familia que posean lazos de consanguinidad con el paciente. El paciente inicial se denomina *propósito* (*propositus*) y en las genealogías se señala con una flecha. El interrogatorio o anamnesis debe ser muy cuidadoso y tener en cuenta las posibilidades de confusión u ocultamiento de lazos de consanguinidad o de paternidad ilegítima. En una genealogía, las diferentes generaciones se numeran con números romanos desde arriba hacia abajo, y dentro de cada generación se numeran con números ordinales todos los individuos (incluyendo abortos), de izquierda a derecha. Los símbolos usuales en una genealogía son descritos en la figura 9-1

Enfermedades de herencia autosómica dominante

En genética humana, se denomina dominante a un alelo que se expresa en el heterocigota, es decir que no importa cuál es el otro alelo. Los genes dominantes tienen un patrón característico de herencia. en las genealogías cada enfermo tiene un progenitor afectado por

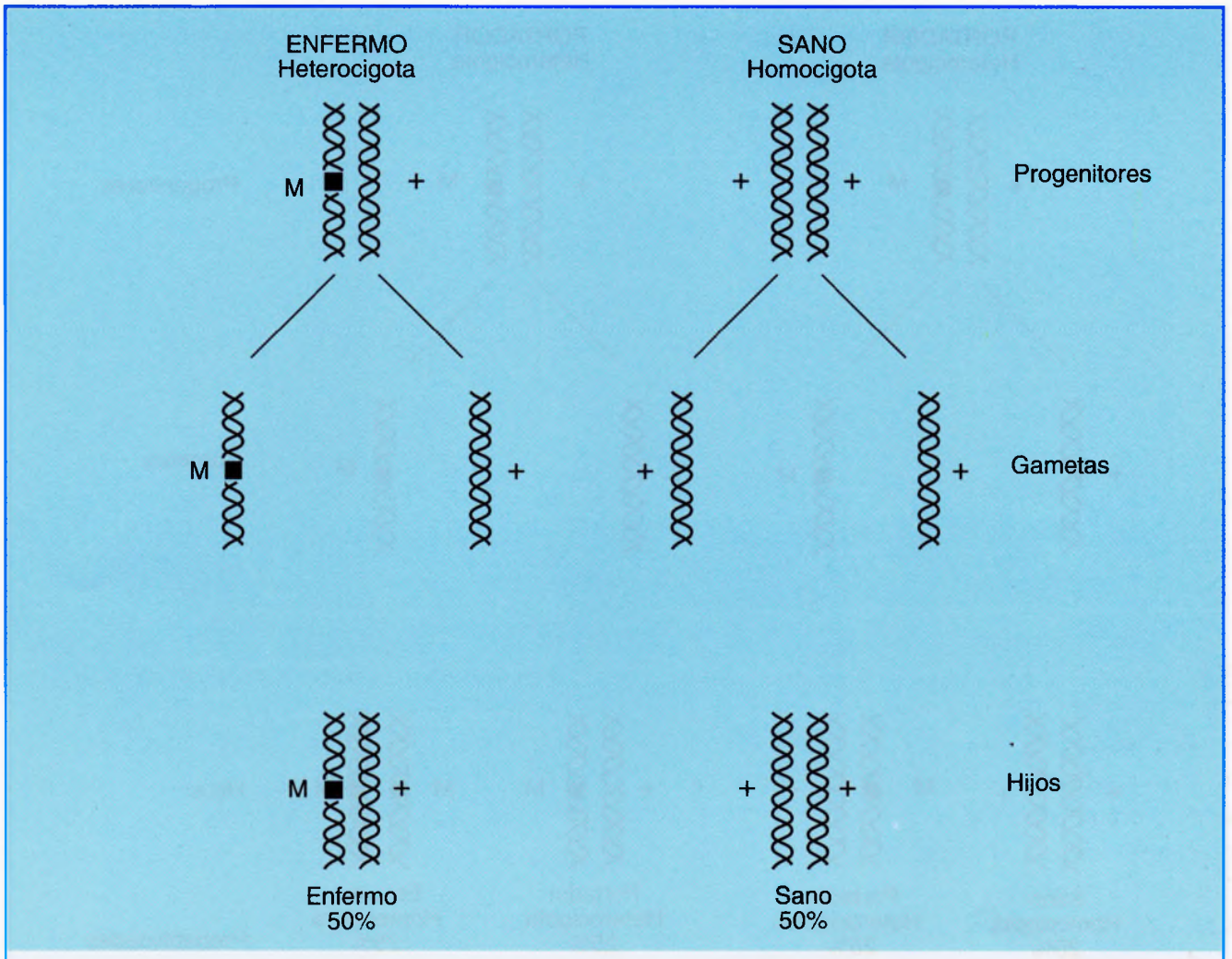


Fig. 9-2. Esquema del tipo de herencia dominante con 100% de penetrancia. Se esquematiza una molécula de ADN por cada cromosoma homólogo. El signo + corresponde al gen normal y el M al mutante (en este caso, productor de enfermedad).

la enfermedad (salvo que sea una mutación "de novo", o sea recién aparecida) y el número de afectados en una genealogía grande tiende a ser del 50%. Aunque el *número* de enfermedades por genes dominantes es grande, el número de enfermos no es proporcionalmente grande porque a menudo están severamente limitados por la selección natural contra los heterocigotas, particularmente si el fenotipo determina algún grado de discapacidad. En un matrimonio lo más probable es que el portador de un gen dominante se case con un cónyuge que lleva el gen normal. En tal caso, el riesgo de recurrencia en el hijo de un paciente es del 50%, y el riesgo de recurrencia en hermanos del paciente es también del 50% (si la penetrancia es alta (fig. 9-2)

En genética humana, la corea de Huntington, la distrofia miotónica de Steinert y algunas epidermólisis ampollares son excepciones, en las cuales los homocigotas afectados no difieren mucho fenotípicamente de los heterocigotas En los demás casos estudiados hay diferencias fenotípicas llamativas entre los homocigotas y heterocigotas, aun cuando la penetrancia del gen sea alta (como ejemplos mencionaremos la acondroplasia, varias braquidactilias y la discondrosteosis de Léri Weill) El catálogo *Mendelian Inheritance in Man* (MIM) y su versión accesible en Internet (OMIM. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM) contiene más de 17.000 registros de genes, de los cuales más de 11.000 tienen secuencia molecular conocida (unos 10.500 autosómicos, 500 ligados al X, 50 ligados al Y y 40 mitocondriales) De los

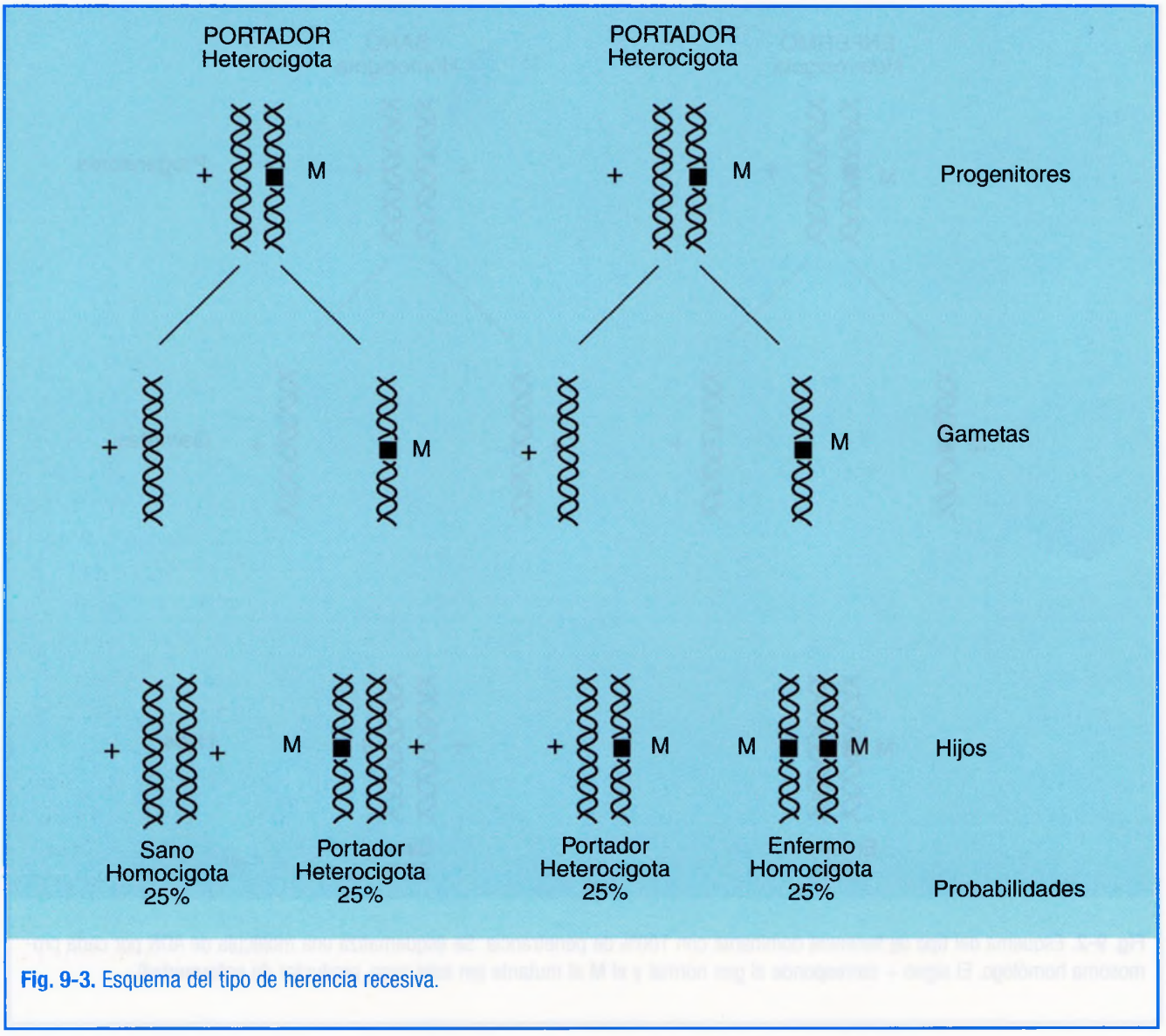


Fig. 9-3. Esquema del tipo de herencia recesiva.

cerca de 2.000 autosómicos con descripción fenotípica precisa, aproximadamente la mitad están catalogados como de herencia dominante.

Las genealogías de un gen dominante muy raramente muestran un "salteado" u omisión de pacientes en una generación intermedia como muestra de penetrancia incompleta. Al ser de localización autosómica, ambos sexos suelen estar afectados por igual.

Enfermedades de herencia autosómica recesiva

Un gen recesivo necesita estar en estado homocigótico para expresarse, de tal manera que un paciente debe recibir un gen anormal de cada progenitor. Las enfermedades debidas a genes recesivos, a pesar de ser relativamente raras en la población general, cuentan con un reservorio génico significativo: los heterocigotas portadores que no expresan el gen y que son mucho más frecuentes que los enfermos. Generalmente un enfermo es hijo de dos progenitores portadores del gen anormal (fig. 9-3) y excepcionalmente sus progenitores son un enfermo y un portador. En el primer caso, la aparición de la enfermedad es inesperada, porque ambos padres son sanos (fenotípicamente) Por ello, en las genealogías de genes recesivos es frecuente ver el "salteado" de generaciones, en las cuales no aparecen afectados y sin embargo se está transmitiendo el gen, la proporción total de afectados respecto de los no afectados en una genealogía grande es menor del 50% y tiende a ser 25% o menos. El riesgo de

recurrencia en hermanos del paciente es del 25%, y el riesgo de transmitir el gen, para una pareja formada por un heterocigota y un normal homocigota, es del 50%. El riesgo de que un enfermo (esto es, homocigota para la mutación), casado con un cónyuge homocigota sano, transmita la enfermedad es 0, y el riesgo de que transmita el gen es del 100% (todos sus hijos serán heterocigotas no afectados)

Las enfermedades provocadas por genes recesivos son de gran importancia dado que poseen un reservorio genético mucho mayor que las originadas en mutaciones dominantes y, por consiguiente, son objeto de especial consi deración en Medicina. Las enfermedades por genes recesivos simulan ser esporádicas, dado que casi nunca hay progenitores o parientes colaterales que expresen la enfermedad, y es necesario un examen genealógico de un número considerable de parientes para demostrar el tipo de herencia. A su vez, esto se halla relacionado con la posible consanguinidad de los progenitores, puesto que un portador de fenotipo sano, si contrae matrimonio con un pariente, ve aumentadas significativamente las probabilidades de tener un hijo homocigota para el gen, es decir, un enfermo. Esto se refleja en la investigación de los pacientes: los enfermos tienen una mayor probabilidad de ser hijos de progenitores con sanguíneos.

Enfermedades con herencia dominante: 1. Enfermedad poliquística renal daminante

La poliquistosis renal autosómica dominante es una enfermedad relativamente frecuente en la población. se estima que una de cada 700 a 1.000 personas que nacen llevan una mutación causante de esta alteración.[3,4] Las mutaciones en dos genes diferentes son responsables de la poli quistosis renal dominante; el 85-90% llevan alterado el gen *PKD1* (localizado en el cromosoma 16p13.3) y el resto, un 10-15%, tienen mutado el *PKD2* (localizado en el cromosoma 4q21) Las genealogías de familias afectadas de esta enfermedad muestran el clásico patrón dominante, con penetrancia del 100%. La proporción de hijos e hijas afectados a partir de progenitores enfermos es del 50% en promedio (fig. 9-4) Aunque la patología y la fisiología de los pacientes afectados por mutaciones de cualquiera de los dos genes es similar, hay algunas diferencias en la evolución de la enfermedad según cuál de ambos genes es el afectado. Los pacientes que poseen afectado el gen *PKD2* tienen una expectativa de

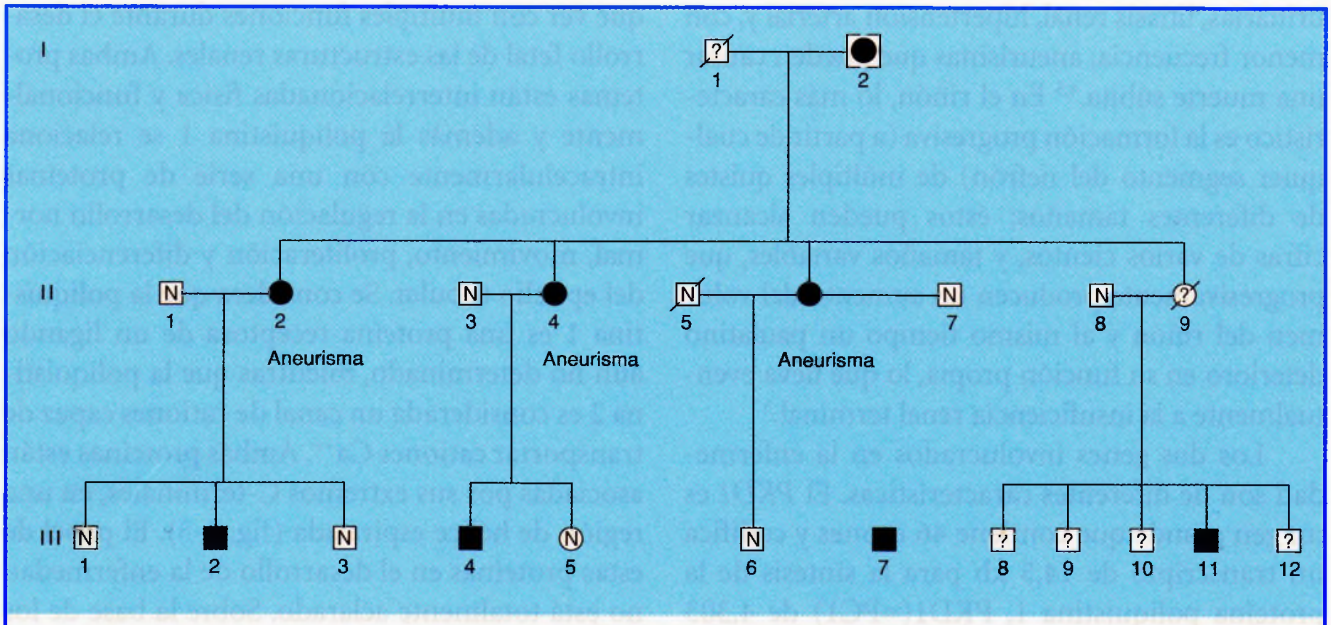


Fig. 9-4. Una genealogía dominante típica, en la cual varios miembros han presentado aneurismas cerebrales. (McConnell RS y cois. Autosomal dominant polycystic disease unlinked to the PKD1 and PKD2 loci presenting as familial cerebral aneurysm. J Med Genet 2001;38:238-40).

vida más larga (69,1 años) que los que poseen el gen *PKD1* afectado (53 años);[3] además, la aparición de los síntomas es más retrasada en las mutaciones del gen *PKD2*. Esto da lugar a que se puedan considerar dos tipos de poliquistosis renal dominante (I y II), que se distinguen finalmente por su origen en diferenes genes. El diagnóstico habitual es mediante ecografías y puede efectuarse tempranamente, a menudo al nacimiento (y aun a veces en el período prenatal) A edades de 15 años y posteriores (antes del desarrollo de síntomas renales) se suele confirmar un 50-75% de los casos mediante ecografías y a los 30 años estos métodos revelan hasta un 97% de los enfermos.[4] Mediante tomografía computarizada con contraste y también por resonancia magnética nuclear se detectan quistes de hasta 3 mm de diámetro.[5]

Los enfermos son heterocigotas para uno de los dos genes, *PKD1* o *PKD2*, y según el gen afectado dan lugar al tipo I o II de la enfermedad. También se han observado heterocigotas que han sido llamados "transheterocigotas" porque poseen un *PKD1* mutado y también un *PKD2* alterado; en estos casos la evolución de la enfermedad es peor que cuando hay un solo gen afectado.[4]

Los enfermos presentan síntomas que gradualmente se incrementan con la edad. hematuria sangre en la orina), dolor lumbar, infecciones urinarias, litiasis renal, hipertensión arterial y, con menor frecuencia, aneurismas que pueden causar una muerte súbita.[4,5] En el riñón, lo más característico es la formación progresiva (a partir de cualquier segmento del nefrón) de múltiples quistes de diferentes tamaños; éstos pueden alcanzar cifras de varios cientos, y tamaños variables, que progresivamente producen un aumento del volumen del riñón y al mismo tiempo un paulatino deterioro en su función propia, lo que lleva eventualmente a la insuficiencia renal terminal.[5]

Los dos genes involucrados en la enfermedad son de diferentes características. El *PKD1* es un gen grande que contiene 46 exones y codifica un transcripto de 14,5 kb para la síntesis de la proteína poliquistina 1, PKD1(=PC1) de 4.303 aa y 463 kDa. En cambio, el gen *PKD2*, de 15 exones, codifica un transcripto de 5,6 kb, para sintetizar la proteína PKD2 (=PC2) de 968 aa y 110 kDa de tamaño molecular.[6] Existen secuencias homólogas a las del gran gen *PKD1* más arriba (en sentido 5 de éste) que complican la secuenciación de rutina de la región del *PKD1*.[3] Ésa es una razón por la cual la secuenciación del *PKD2* es más útil en los casos en que se desea un diagnóstico molecular precoz.[7]

Las mutaciones estudiadas en los genes *PKD1* y *PKD2* son numerosas: en 2009 se habían catalogado 869 variantes para el *PKD1*, aunque varias de ellas son polimorfismos silenciosos. La mayoría de las mutaciones del gen *PKD1* asociadas a la enfermedad son para truncamiento de la proteína (333 en 417 familias).[8] También una mayoría de las mutaciones del gen *PKD2* son de truncamiento de la proteína.[8] Estas observaciones y otras hechas en animales modelo sugieren fuertemente que la dominancia en esta enfermedad se debe a la insuficiencia del producto de un único gen normal,[8] es decir, a lo que se denomina "dominancia por insuficiencia haploide" Sin embargo, la explicación parece ser más compleja, puesto que también se observa un efecto de dosis o de equilibrio de varios productos génicos.[8]

Las proteínas producidas normalmente por los genes *PKD1* y *PKD2* se llaman poliquistinas 1 y 2, respectivamente. Estas proteínas se hallan insertadas en la membrana celular del túbulo renal a lo largo de casi toda su extensión y tienen que ver con múltiples funciones durante el desarrollo fetal de las estructuras renales. Ambas proteínas están interrelacionadas física y funcionalmente y además la poliquistina 1 se relaciona intracelularmente con una serie de proteínas involucradas en la regulación del desarrollo normal, movimiento, proliferación y diferenciación del epitelio tubular. Se considera que la poliquistina 1 es una proteína receptora de un ligando aún no determinado, mientras que la poliquistina 2 es considerada un canal de cationes capaz de transportar cationes Ca^{++} Ambas proteínas están asociadas por sus extremos C-terminales, en una región de hélice espiralada (fig. 9-5) El papel de estas proteínas en el desarrollo de la enfermedad no está totalmente aclarado. Sobre la base de los conocimientos actuales se considera que una disminución del nivel de producción de cualquiera de las dos poliquistinas debajo de un umbral crí

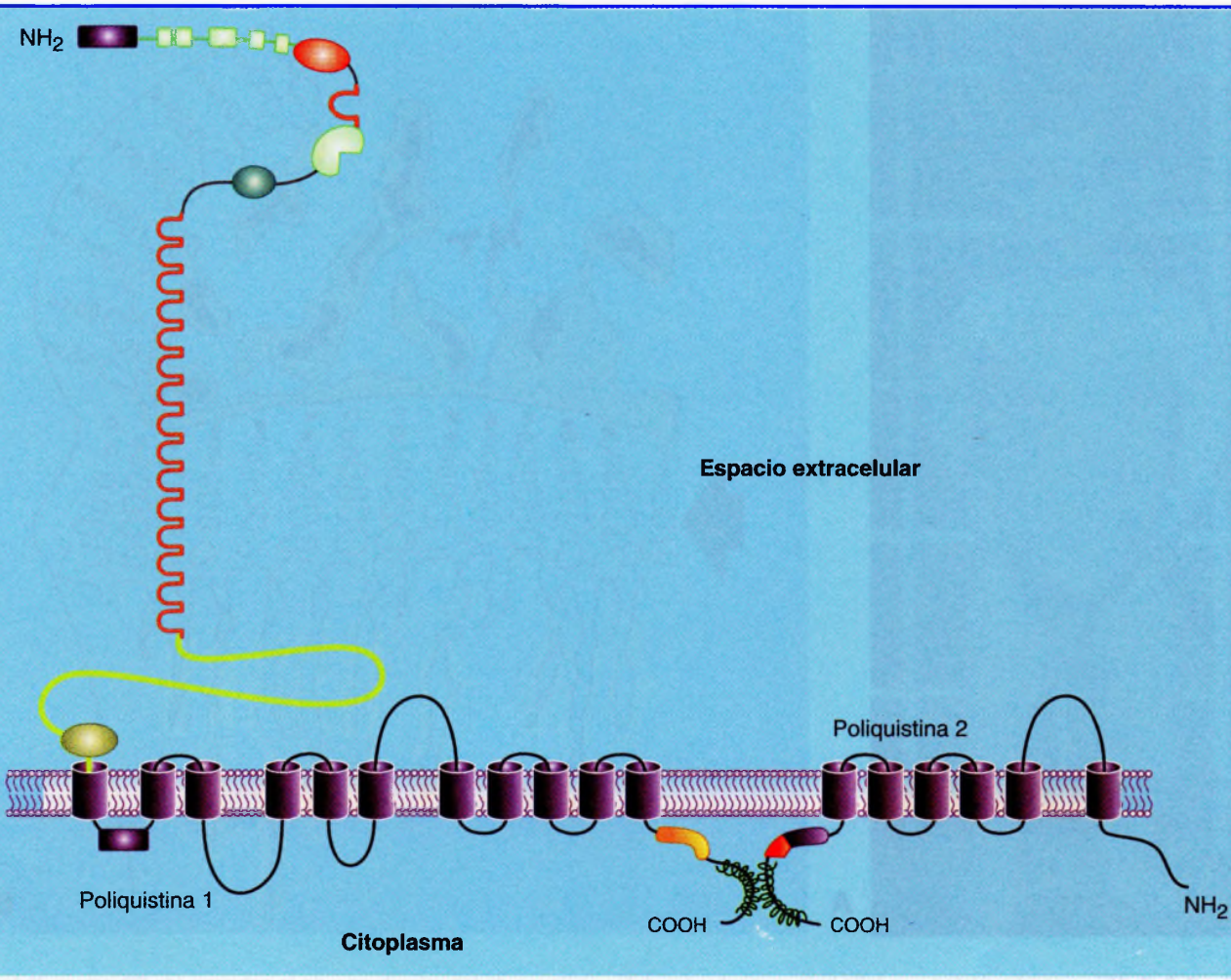


Fig 9-5. Esquema de la estructura de las poliquistinas 1 y 2 (de Torres VE, Harris PC, 2009). Los símbolos corresponden a los diversos dominios de las proteínas. Ambas poliquistinas se relacionan por sus extremos C-terminales (verde). Las regiones intramembranosas figuran como cilindros celestes.

tico desencadena una serie de defectos, entre los cuales se encuentran la incapacidad de mantener la polaridad normal de las células, un incremento simultáneo de la proliferación celular y de la tasa de apoptosis y una modificación de la matriz extracelular.[8]

Ambas poliquistinas se encuentran localizadas en la membrana de las cilias primarias de muchos tejidos, por lo cual se las ha vinculado con la fisiología y la patología de las cilias primarias.[9] Este aspecto se trata en el capítulo 16.

Entre otras enfermedades renales poliquísticas menos frecuentes está la poliquistosis autosómica recesiva, por mutación del gen *PKHD1* (fibroquistina). Esta enfermedad es mucho menos frecuente que las originadas por mutaciones *PKD1* y *PKD2* y es recesiva.

Se han propuesto algunas medidas terapéuticas basadas en los conocimientos de los mecanismos patogénicos conocidos. El criterio aceptado para valorar la eficacia de las intervenciones es la medición del tamaño de los riñones.[4] El volumen normal de cada riñón (120 a 160 mL medido por ecografía, tomografía computarizada o resonancia magnética) es un dato fiable para evaluar la evolución de la enfermedad. La función renal comienza a declinar recién cuando el volumen renal alcanza al quíntuple del normal. Las medidas terapéuticas ensayadas fueron enfocadas sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona, con inhibidores de la ECA (enzima convertidora de la angiotensina), con bloqueantes del receptor de la angiotensina y de canales de calcio. También se han iniciado pruebas que se encuen

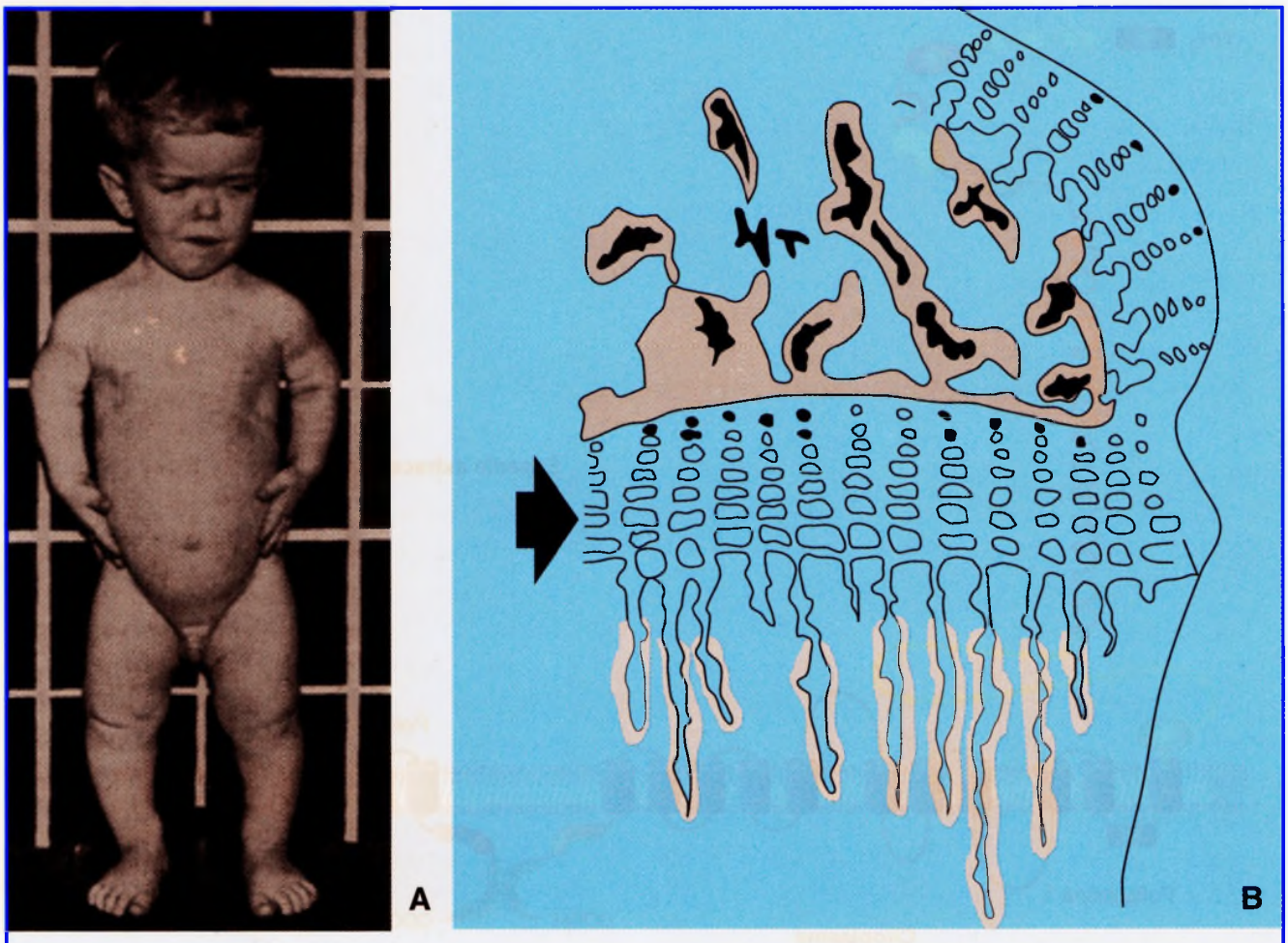


Fig. 9-6. A. Niño acondroplásico con talla baja y acentuadas deformaciones de los miembros y de la columna (de Silverman-Kuhn, Essentials of Caffey's Pediatric X-ray Diagnosis. Year Book Medical Publishers, Inc., 1990). **B.** Cartílago de conjunción (flecha), tejido en el cual el gen *R3FCF* es activo y su producto anormal acelera la conversión del cartílago en hueso.

tran en un estadio preclínico, con antagonistas del receptor de la vasopresina y con somatostatina, y hay estudios preclínicos con rapamicina como bloqueante de una proteinquinasa, reguladora primaria de síntesis proteica y del crecimiento celular.[8]

Enfermedades con herencia dominante: 2. Acondroplasia. Receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (R3FCF)

La acondroplasia es una de las principales causantes de déficit estatural genético. Además, constituye una enfermedad hereditaria dominante clásica, que ha servido como modelo de la transmisión hereditaria de genes anormales. Los niños afectados son identificables al nacer, y aun antes si se cuenta con información ecográfica fiable, pero el diagnóstico preciso es con frecuencia equívoco, puesto que se confunde fácilmente con otras displasias esqueléticas similares pero con modos de herencia y pronóstico muy diferentes.[10] La talla ya está reducida a un promedio de 46 cm en el nacimiento, con el puente nasal deprimido, cráneo relativamente grande y el segmento proximal de los miembros (especialmente el húmero) más acortado que los demás. A medida que tienen mayor edad, se completa el cuadro de baja estatura por acortamiento de los huesos largos de los miembros, con ciertas anormalidades óseas características, como los dedos en trídente por separación entre los dedos 2-3 y 4-5, estrechamiento del foramen magnum y desviaciones compensadoras de la columna causadas por una inclinación hacia adelante de la pelvis (fig. 9-6)

Los acondroplásicos en los cuales se pueden evitar las complicaciones respiratorias (provocadas por las deformaciones de la caja torácica) y neurológicas, tienen un promedio de vida normal y fertilidad conservada, en la adultez alcanzan una altura promedio de 1,30 m (varones) o 1,23 m (mujeres) La patogenia de la acondroplasia muestra que en la enfermedad está alterado el crecimiento óseo a partir de molde cartilaginoso, aunque está conservada la osteogénesis endocon juntiva; los cartílagos metafisarios que se osifican precozmente son los principales responsables del crecimiento disminuido en los miembros. La prevalencia de la acondroplasia oscila alrededor de $2{,}5 \times 10^{-5}$ [11] Las cifras mayores publicadas se atri buyen a los frecuentes errores diagnósticos.

En el 80% de los casos se trata de mutaciones nuevas, originadas en uno de los padres. La gran mayoría de las mutaciones espontáneas son transmitidas por el padre (mutación germinal) El aumento de la edad paterna está relacionado con un aumento de la probabilidad de tener un hijo con esta malformación.[12] La acondroplasia es un rasgo dominante con penetrancia completa, es decir que la presencia del gen mutante siempre da un cuadro patológico y se manifiesta relativamente con pocas variantes. Con cierta frecuencia, dos acondroplásicos contraen matrimonio entre sí, en estos casos, los hijos tienen una probabilidad del 25% de ser normales, un 50% de ser acondroplásicos heterocigotas como los padres y, finalmente, hay un 25% de probabilidad de que sean *homocigotas* para el gen mutante. Los homocigotas para la acondroplasia raramente sobreviven a la época perinatal;[13] presentan acentuación de los defectos óseos, con graves efectos neurológicos. En 1994 se ha localizado el gen afectado en la acondroplasia en el extremo del cromosoma 4 humano (4p16.3) [14] El gen normal codifica el receptor 3 para el factor de crecimiento fibroblástico (FCF) (a su vez, este factor de crecimiento tiene más de 20-23 variantes en 2010; véase OMIM) Este descubrimiento tiene derivaciones en varios campos: se ha profundizado el estudio de los factores de crecimiento fibroblástico y sus receptores; se investiga su papel en el desarrollo temprano y tardío, y también se esclarecen ciertos mecanismos mutacionales.[15] El gen de este receptor, denominado *R3FCF* (– *FGFR3* en inglés), codifica la proteína receptora, que es una glucoproteína de membrana constituida por cinco dominios (fig. 9-7): un dominio citoplasmático con actividad de quinasa de tirosinas, donde se transduce la señal; un dominio transmembranoso que atraviesa la membrana, y tres dominios extracelulares, cada uno de los cuales es parecido a las cadenas de inmunoglobulinas y que se denominan IgI, IgII e IgIII. En estos últimos se recibe el ligando (factor de crecimiento fibroblástico, FCF)

En un estudio realizado sobre 154 casos de acondroplasia, 150 poseyeron una única y específica mutación en el nucleótido 1 138 del ADNc del gen *R3FCF*; esta mutación consiste en la transición de una guanina a una adenina (G>A) y modifica el codón 380 para cambiar una glicina a una arginina (G>R) [15] Sólo tres casos poseían una mutación diferente en el mismo nucleótido, consistente en una transversión de la guanina a citosina, que

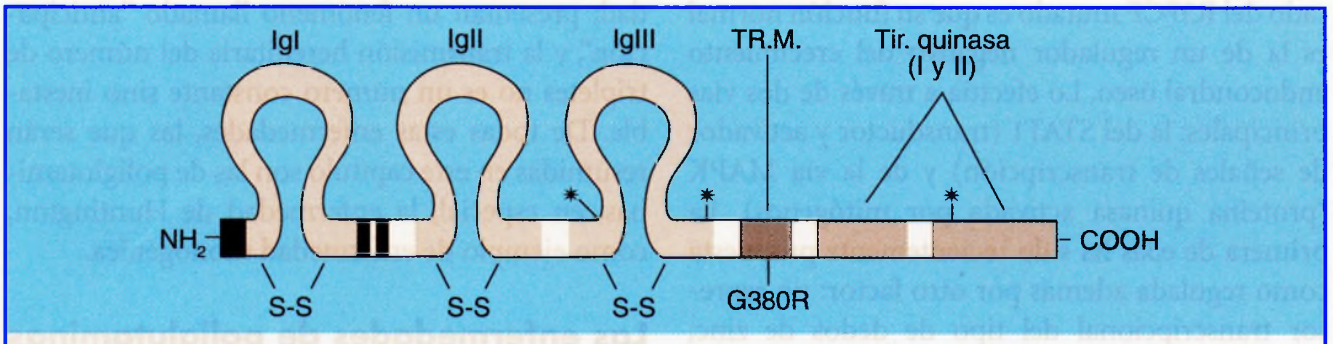


Fig. 9-7 Proteína receptora 3 del factor de crecimiento fibroblástico. Se señalan los cinco dominios de la proteína (los de tipo inmunoglobulina, IgI-IgIII; el transmembranoso TR.M. el citoplasmático tirosina quinasa), y el sitio de la mutación más frecuente en la acondroplasia (G380R, que cambia una glicina a una arginina). Asteriscos: zonas cuya mutación está asociada con la displasia tanatofórica (malformación letal).

modifica el mismo codón, y un único caso atípico no poseía esa mutación. Por consiguiente, es probable que esta mutación sea casi la única responsable de la acondroplasia, con lo cual esta afección, junto a la anemia falciforme (véase cap. 12), sería una de las pocas enfermedades monogénicas por una única mutación específica; esto concuerda con la homogeneidad del cuadro clínico en la acondroplasia.[16] El nucleótido responsable (1 138) forma parte de un dinucleótido CpG, que tiende a mutar; sin embargo, la frecuencia de mutación de este nucleótido en el gen *R3FCF* es mucho mayor que la esperada (de 100 a 760 veces más). El gen *R3FCF* es activo en la zona de cartílago en reposo del cartílago metafisario de crecimiento de los huesos largos, y esto explicaría la patogenia de la enfermedad, puesto que al ser el único receptor activo en ese tejido, la mutación lo alteraría en su función de receptor de la señal del FCF. En tejidos embrionarios (tubo neural, esbozos cartilaginosos) también está activo, pero dada la presencia de otros receptores (hay cuatro genes de receptores de este factor de crecimiento: *R1FCF* *R4FCF*) y variantes de ellos producidas por empalme alternativo, es posible que la función de este gen en el embrión sea diferente y específica para cada estadio.

Por otra parte, hay evidencias de que estos factores de crecimiento y sus receptores son importantes en otras enfermedades y malformaciones, tales como los síndromes de Pfeiffer y de Apert y la enfermedad de Crouzon.[15,16] Estas afecciones, al igual que la acondroplasia, muestran un patrón de herencia dominante, y esto sugiere una *ganancia de función* por parte de la proteína mutante.

La interpretación actual del mecanismo alterado del R3FCF mutado es que su función normal es la de un regulador negativo del crecimiento endocondral óseo. Lo efectúa a través de dos vías principales: la del STAT1 (transductor y activador de señales de transcripción) y de la vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) La primera de ellas ha sido recientemente propuesta como regulada además por otro factor· un represor transcripcional del tipo de dedos de zinc, denominado Snail.[17] El resultado de la ganancia de función del R3FCF es inhibir en mayor grado, a través de esas vías, la diferenciación y la proliferación de los condrocitos encargados del crecimiento endocondral óseo. Se ha propuesto la posibilidad de que inhibiendo esas vías de transducción de señales se pueda liberar esta represión del crecimiento y diferenciación esquelética.[11]

Enfermedades por expansión de tripletes repetidos

Las secuencias repetidas en el ADN están signficativamente representadas en el genoma humano, como se vio en el capítulo 4. Las repeti ciones de trinucleótidos (tripletes) tienen especial interés para la Medicina, puesto que la amplificación del número de esos tripletes repetidos es común a un número de aproximadamente 40 enfermedades neurodegenerativas.[18] Es de subrayar que mientras en el ADN intergénico las repeticiones de dinucleótidos y de tetranucleótidos son las más abundantes, en los exones, las que prevalecen son los tripletes repetidos.[18] Además se ha comprobado una tendencia evolutiva al creci miento de estos tripletes repetidos, desde los monos hasta la especie humana.[18] En Medicina, los tripletes repetidos más relevantes son los CAG (citosina-adenina-guanina) que están expandidos en las enfermedades neurológicas denominadas "de poliglutaminas", incluida la corea de Huntington, los tripletes repetidos CGG que están expandidos en el síndrome de X frágil (véase cap. 18), los tripletes CTG expandidos en la distrofia miotónica, y los tripletes GCA, que codifican polialanma. Todas las enfermedades de estos tipos tienen algunas características comunes, por ejemplo deben sobrepasar un "umbral" del número de repeticiones para que se desencadene la enfermedad; presentan un fenómeno llamado "anticipación", y la transmisión hereditaria del número de tripletes no es un número constante sino inestable. De todas estas enfermedades, las que serán resumidas en este capítulo son las de poliglutami nas, en especial, la enfermedad de Huntington, como ejemplo de enfermedad monogénica.

Las enfermedades de poliglutaminas y la enfermedad de Huntington

El triplete CAG codifica el aminoácido glutamina ("Q", en el código de una letra para amino-

ácidos, véase Apéndice 3 Por consiguiente, una repetición de tripletes CAG en un exón codificará varias glutaminas seguidas, es decir, una "poliglutamina", o poli-Q. Justamente eso se observa en un número de enfermedades neurológicas humanas, en las cuales esas repeticiones CAG se han expandido más allá de un número que se considera "umbral", y que es variable entre 20 y 40 tripletes CAG (codificantes de 20 a 40 glutaminas) Estas enfermedades se denominan de poliglutammas o de poli-Q (también poliglutaminopatías) y son por lo menos nueve, contando entre ellas la importante enfermedad de Huntington, seis tipos de ataxias espinocerebelosas y otras dos neuropatías.[19] Las dos poliglutamopatías más frecuentes son la enfermedad de Huntington y la ataxia espi nocerebelosa 3, pero su incidencia varía según el tipo de poblaciones.[19] También el *umbral* es variable para estas poliglutaminopatías. Sin embargo, tienen puntos en común. en todas ellas no se han observado mutaciones puntuales comunes (cambio de una base, etc.) y tampoco deleciones, sino simplemente la expansión de los tripletes CAG. Esto sugiere que en todos los casos, se trata de la ganancia de una función tóxica, y no de la pérdida de la función de un gen.[19]

En todas estas enfermedades de poliglutaminas el enfermo, cuando es heterocigota, produce la proteína normal y además una proteína mutada, por ejemplo, en la enfermedad de Huntington, se producen tanto la huntingtina (HTT) normal como la mutada.[19]

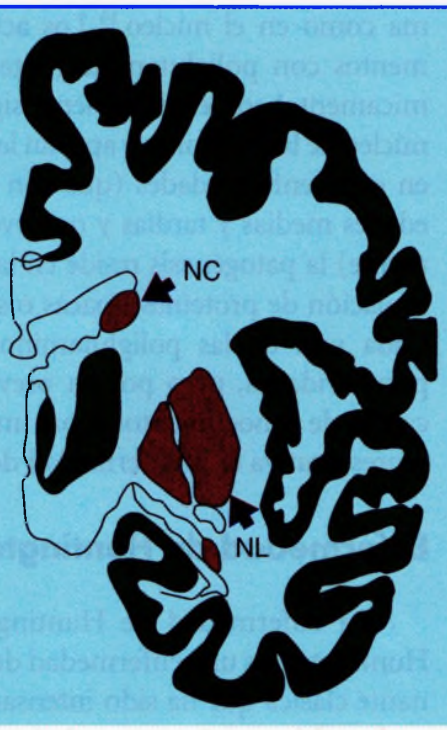
Individuos homocigotas para estas mutaciones son extraordinariamente raros. Sin embargo, un estudio colaborativo consiguió estudiar 8 homocigotas y 75 heterocigotas para la enfermedad de Huntington y este estudio comprobó que los homocigotas tienen peor pronóstico de la enfermedad, es decir que no es una "dominancia perfecta" como equivocadamente se creía.[20] En los homocigotas, si bien la edad de aparición de los síntomas no está significativamente modificada, la severidad de éstos sí lo está, en especial la rigidez, la demencia y el grado de daño cerebral evaluado por tomografías.[20]

Otra característica común en las poliglutaminopatías es la acumulación de agregados y de fragmentos de la proteína mutada, tanto en el citoplasma como en el núcleo.[19] Los acúmulos de fragmentos con poliglutamina (detectados histoquímicamente) son especialmente significativos en el núcleo de las neuronas y apoyan la hipótesis de que en estas enfermedades (que son de aparición en edades medias y tardías y que evolucionan lentamente) la patogénesis reside en la progresiva acumulación de proteínas tóxicas o sus fragmentos.[19] Cada una de las poliglutaminopatías tiene sus peculiaridades, pero por su prevalencia y por el caudal de conocimientos sobre una de ellas, la más representativa es la enfermedad de Huntington.

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington o corea de Huntington es una enfermedad de herencia dominante clásica que ha sido intensamente estudiada en los últimos años y continúa aportando datos muy importantes para la genética humana. Se trata de una enfermedad degenerativa de los núcleos basales del encéfalo (especialmente el caudado y el putamen), que se hace manifiesta usualmente entre los 35 y los 50 años de edad y que avanza inexorablemente hacia la demencia y la muerte del paciente, la cual ocurre entre 5 y 20 años luego de la aparición de los primeros síntomas. Dada la aparición tardía de la enfermedad, cuando ésta se manifiesta, el paciente generalmente ha formado una familia y tiene hijos, a los cuales inadvertidamente puede haber transmitido el gen, de tal manera que cada paciente de esta enfermedad está generalmente rodeado de parientes perturbados por la posibilidad de llevar el gen anormal y desarrollar la enfermedad.

Los síntomas iniciales son perturbaciones emocionales, irritabilidad, cambios en la personalidad, depresión y a veces síntomas psicóticos.[21] Luego se suman movimientos involuntarios de los miembros y el rostro (corea), signos de agitación y rigidez muscular. El deterioro mental del paciente comienza insidiosamente y no se detiene hasta la demencia total. Desde el punto de vista anatomopatológico, existe muerte celular de un tipo especial de neuronas medianas (neuronas espinosas medias), con conservación de las neuronas grandes. Las lesiones se observan especialmente en el cuerpo estriado (núcleo len



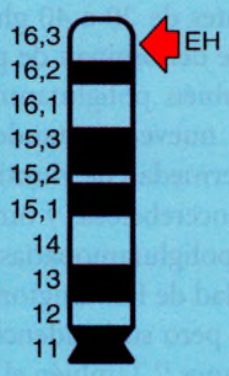


Fig. 9-8. Localización de las lesiones en la enfermedad de Huntington (izquierda) y esquema del brazo corto del cromosoma 4, donde se localiza el gen *HD = EH* (derecha). NC: núcleo caudado; NL. núcleo lenticular.

ticular + núcleo caudado), mientras la corteza cerebral está más conservada hasta avanzada la enfermedad; la corteza cerebelosa no sufre daño morfológico. Dado que las lesiones se focalizan en el sistema extrapiramidal, los movimientos involuntarios reflejan esa lesión.

Durante una década se intentó localizar el gen de esta enfermedad y finalmente, en 1993, fue aislado el gen *HD – EH* (*Huntington Disease* = Enfermedad de Huntington) por un conjunto de seis grupos de investigación, entre los que se destacó el de James Gusella.[22] Este gen se encuentra en una zona difícil de investigar, muy cerca del telómero del brazo corto del cromosoma 4 (el contenido génico de este cromosoma está registrado en Map viewer (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview) con 6.307 transcriptos, de los cuales 1.361 se corresponden con genes, y de éstos más de 20 han sido rotulados como causantes de enfermedades o rasgos específicos (fig. 9-8)

El aislamiento (clonado) del gen *HD = EH* significó sorpresivamente una conexión con otras enfermedades hereditarias, todas ellas con un mecanismo mutacional común. la expansión de repeticiones de trinucleótidos fig. 9-9; véase también cap. 8) Los ejemplos que se encuentran en la figura 9-9 son de varios tipos de expansión de tripletes.[23]

Este aumento patológico en el número de tripletes repetidos uno tras otro, en una posición específica dentro del gen, es lo que diferencia al gen mutado en la enfermedad de Huntington del gen normal, que produce una proteína denominada huntingtina (HTT) y cuya función normal todavía es poco conocida, aunque hay evidencias de que interviene en el transporte intracelular de vesículas y está relacionada con el transporte efectuado por microtúbulos en el citoplasma.[24] El gen normal de la huntingtina posee, muy cerca de su extremo inicial (5'), una serie de tripletes repetidos CAG en número variable (es un polimorfismo) en distintas personas, entre 8 y 35 como máximo. Estos tripletes están en el primer exón y codifican el aminoácido glutamina, se ha comprobado que la proteína normal es polimórfica para este grupo repetido de glutaminas, es decir, un grupo de poliglutamina (fig. 9-10) [25]

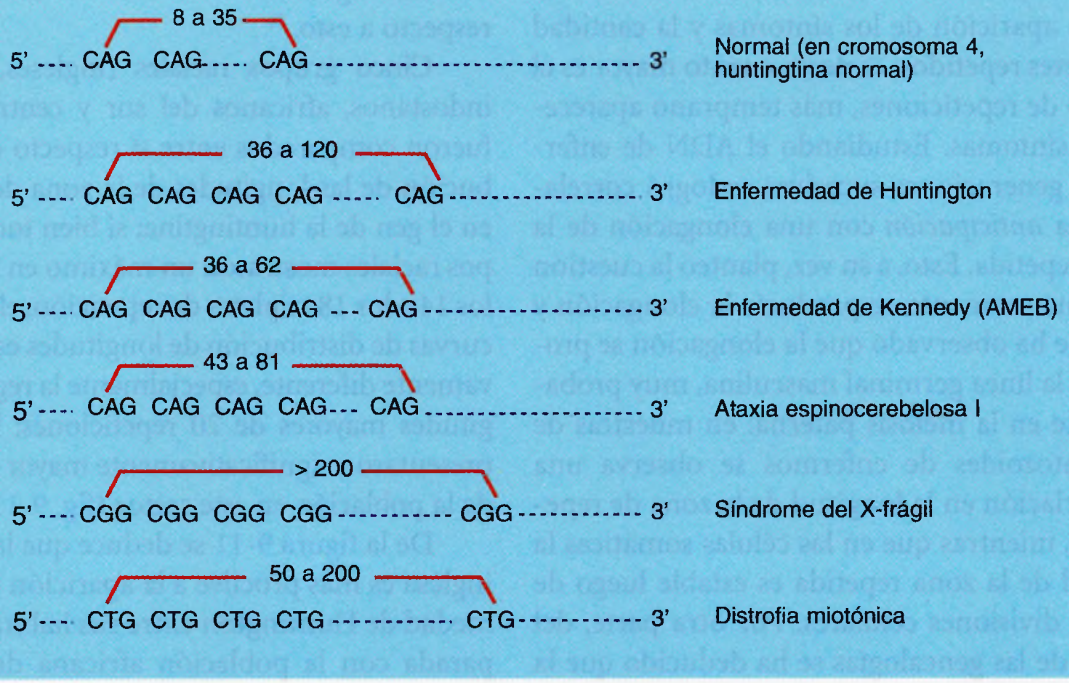


Fig. 9-9. Expansión de repeticiones de trinucleótidos en enfermedades hereditarias. Las expansiones ocurren en distintos lugares del genoma y tienen en común su origen a partir de repeticiones cortas halladas en individuos normales. AMEB: atrofia muscular espinobulbar.

Fenómeno de la "anticipación" en la corea de Huntington

El curioso fenómeno de la "anticipación", observado hace tiempo en las genealogías de la enfermedad de Huntington, consiste en que en una misma genealogía de esta enfermedad se observa una progresiva agravación de la afección con el paso de las generaciones; el agravamiento consiste en que la enfermedad va apareciendo a edades cada vez más tempranas, es decir, la aparición de síntomas se va *anticipando* en las sucesivas generaciones; si en el abuelo la enfermedad comenzó a los 50 años, en el padre fue a los 45 y en el hijo a los 38. Este fenómeno de la anticipación ha podido demostrarse a nivel molecular.[26]

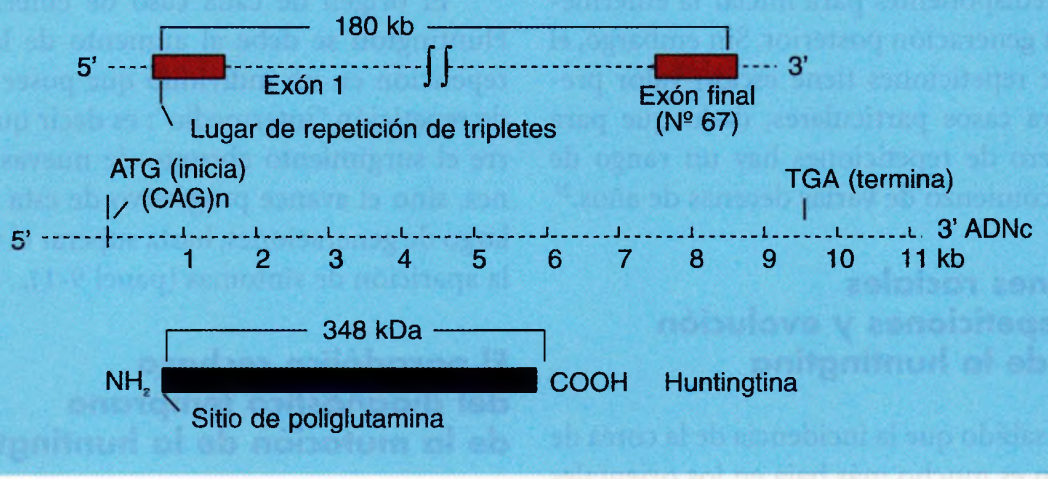


Fig. 9-10. Esquema de la relación entre el gen *HD* = *EH* de la huntingtina, su ADN complementario y la proteína (huntingtina).

Se ha observado una relación inversa entre la edad de aparición de los síntomas y la cantidad de tripletes repetidos; es decir, cuanto mayor es el número de repeticiones, más temprano aparecerán los síntomas. Estudiando el ADN de enfermos de generaciones sucesivas se logró correlacionar la *anticipación* con una elongación de la región repetida. Esto, a su vez, planteó la cuestión de en qué momento se producía la elongación y cómo. Se ha observado que la elongación se produce en la línea germinal masculina, muy probablemente en la meiosis paterna. en muestras de espermatozoides de enfermos se observa una gran variación en la longitud de la zona de repeticiones, mientras que en las células somáticas la longitud de la zona repetida es estable luego de muchas divisiones celulares. Por otra parte, del estudio de las genealogías se ha deducido que la expansión de un grado intermedio de repetición a uno expandido y sintomático ocurre preferentemente por vía paterna. Por otro lado, en la meiosis femenina también existe inestabilidad de la zona repetida, pero no hay una tendencia al incremento de la longitud de la zona, como en la masculina. Por consiguiente, la inestabilidad del gen ocurre asociada al proceso meiótico, pero su tendencia al crecimiento es propia de la meiosis masculina. El desencadenamiento de la enfermedad ocurre cuando la longitud de la zona de repeticiones pasa un determinado *umbral*: 35 tripletes. A partir de ese umbral, la zona de repetición se expresa en enfermedad, y previo al umbral estarían las repeticiones "intermedias" que son predisponentes para iniciar la enfermedad en una generación posterior. Sin embargo, el número de repeticiones tiene escaso valor predictivo para casos particulares, dado que para cada número de repeticiones hay un rango de edades de comienzo de varias decenas de años.[25]

Variaciones raciales de las repeticiones y evolución del gen de la huntingtina

Ya era sabido que la incidencia de la corea de Huntington es mucho más baja en los orientales (0,5 en 100.000)[27] comparada con los europeos (5-7 en 100.000);[27] en un estudio se ha demostrado una significativa diferencia molecular con respecto a esto.[28]

Cinco grupos raciales (ingleses, japoneses, indostanos, africanos del sur y centroafricanos) fueron comparados entre sí respecto de la distribución de las longitudes de la zona de repetición en el gen de la huntingtina; si bien todos los grupos raciales mostraron un máximo en la región de los 14 a los 18 tripletes de repetición, el resto de las curvas de distribución de longitudes es significativamente diferente, especialmente la región de longitudes mayores de 20 repeticiones: los ingleses presentaron significativamente mayor proporción de la población en este sector (fig. 9-11)

De la figura 9-11 se deduce que la población inglesa es más proclive a la aparición de la enfermedad de Huntington entre sus habitantes, comparada con la población africana del sur (que muestra más *dispersión* en la distribución) y sobre todo con la población japonesa, que casi no presenta repeticiones en la zona previa al umbral de desarrollo de la enfermedad de Huntington (35 repeticiones)

Además, estos estudios permitieron comprobar que en el chimpancé el gen ancestral de la huntingtina sólo posee ocho repeticiones del triplete CAG, a partir de lo cual se ha propuesto que existe una tendencia, en el curso de la evolución biológica, a que el gen de la huntingtina agrande la zona de repetición;[28] de ser así, la raza blanca estaría expuesta a un agrandamiento progresivo en la incidencia de la corea de Huntington, que parece inevitable con los conocimientos actuales.

El origen de cada caso de enfermedad de Huntington se debe al aumento de la zona de repetición en un individuo que posee un grado de repetición "intermedio", es decir que no ocurre el surgimiento abrupto de nuevas mutaciones, sino el avance progresivo de esta zona, a lo largo de generaciones, hasta superar el umbral de la aparición de síntomas (panel 9-1)

El paradójico rechazo del diagnóstico temprano de la mutación de la huntingtina

Actualmente, con el gen clonado y métodos rápidos para la comprobación del número de tri

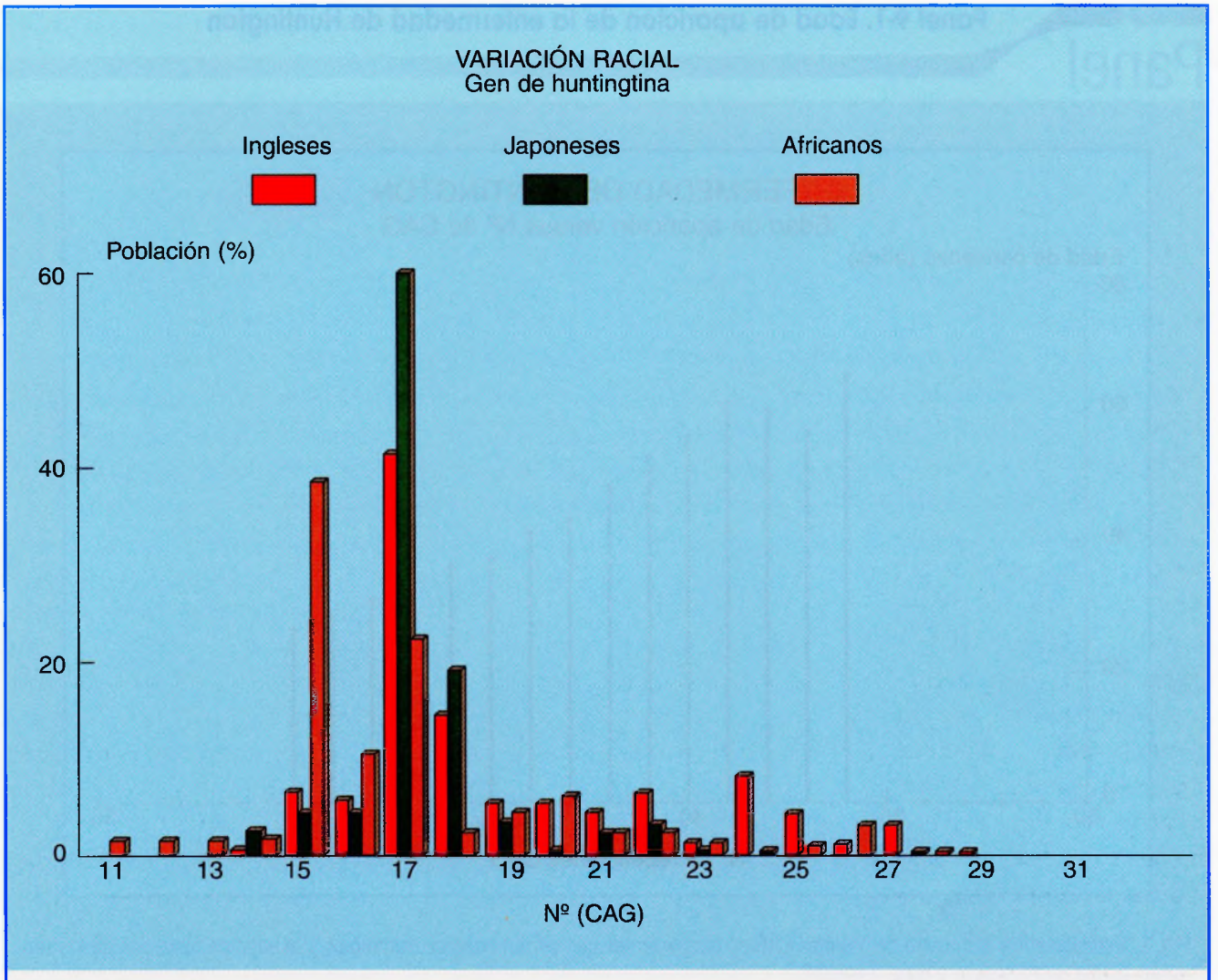


Fig. 9-11 Distribución de los números de tripletes repetidos (CAG) en la población inglesa comparada con la japonesa y la africana del sur.[28]

pletes repetidos (con la RCP), es posible, por primera vez en medicina, detectar el futuro paciente de la corea de Huntington antes de que la enfermedad se declare y, mucho más importante, detectar el riesgo en los familiares (y en la población general) Sin embargo, y dado que aún no existe una terapia para la enfermedad (aunque la velocidad de avance del conocimiento permite ser optimista), el descubrimiento de que una persona lleva el gen con un grado de repeticiones CAG más allá del umbral de 35, significa darle a conocer una sentencia de demencia y muerte en unas décadas, y esto ha dado un resultado paradójico: más del 50% de los familiares de enfermos de Huntington se han negado a conocer su estado del gen de la huntingtina, *y menos del 5% de los individuos en riesgo han solicitado un análisis de este tipo.*[27] Nuevamente, esto muestra que el aspecto humano de estos avances científicos a veces plantea problemas imprevistos y difíciles de resolver para el médico genetista.

Mecanismo de la daminancia en la enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington muestra un patrón de herencia mendeliana y dominante de tipo clásico; incluso, se han observado ocasionales casos de homocigotas para el gen mutado, cuyo cuadro de enfermedad parecía idéntico (y no más grave) al de los heterocigotas. Sin embargo, como se ha dicho más arriba, un estu

Panel

Panel 9-1 Edad de aparición de la enfermedad de Huntington

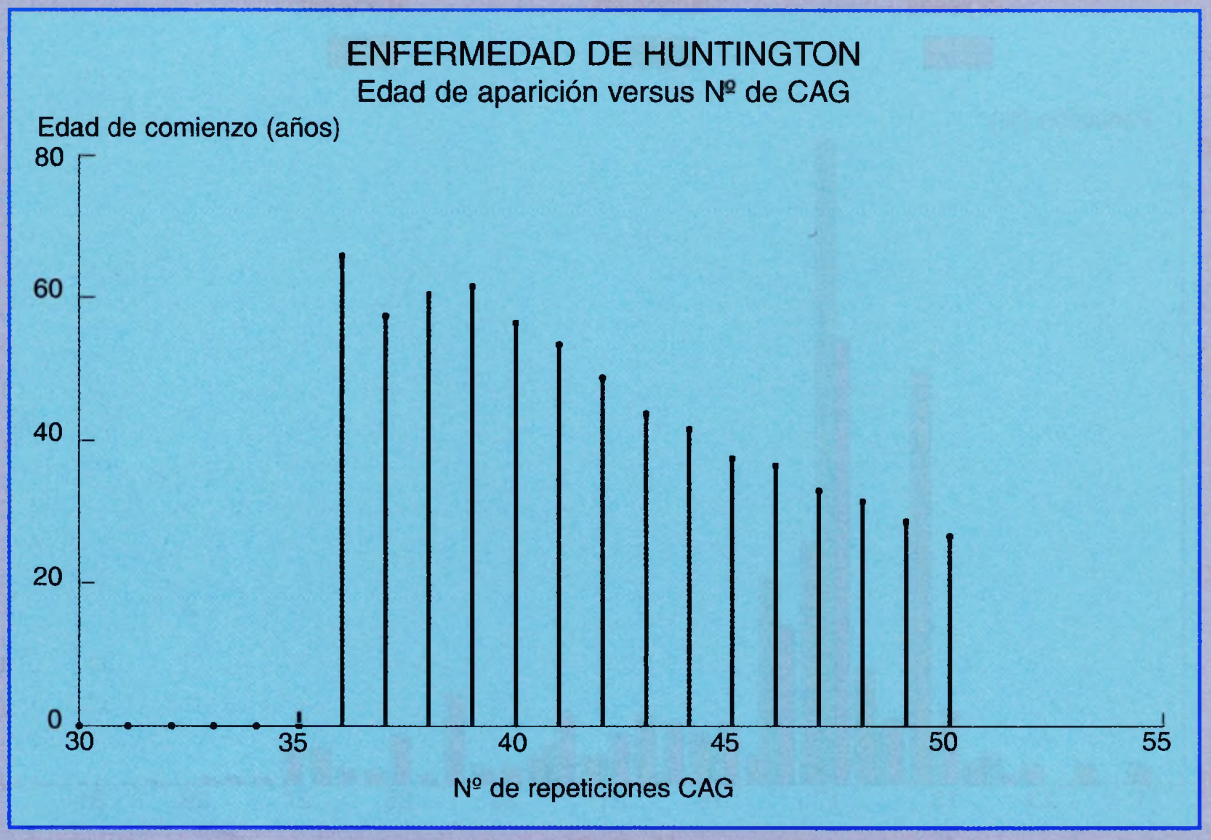


Fig. 1. Relación entre el número de tripletes CAG en los pacientes con enfermedad de Huntington y la edad de aparición de los síntomas (datos de Brinkman y cols., 1996).[29]

El fenómeno de la anticipación muestra que en las genealogías de estos pacientes se advierte un comienzo más temprano de la enfermedad a medida que pasan las generaciones. Este fenómeno se ha cuantificado en un estudio de 728 pacientes con enfermedad de Huntington.[29] En el gráfico adjunto (fig. 1) se advierte una relación evidente entre el número de repeticiones CAG en el gen de la huntingtina y la edad de comienzo de los síntomas. Solamente en el sector que va de 36 repeticiones hasta 41 hay alguna imprecisión, pero luego de esta "zona intermedia" el descenso de edad es muy seguro. Con menos de 36 repeticiones (entre 30 y 35) la enfermedad no aparece, pero existe el riesgo de que un padre transmita el gen con un número aumentado a más de 35, desencadenando la enfermedad en un hijo. El aumento de repeticiones se produce porque en la zona con CAG repetidos, la hélice del ADN que los tiene puede adoptar una forma de horquilla al momento de abrirse la doble hélice para la replicación, provocando un "deslizamiento" de la ADN polimerasa y una adición (o pérdida) de varios nucleótidos en la cadena hija.[30]

dio de mayor amplitud ha mostrado que los homocigotas tienen un curso más severo de la enfermedad.[20]

El mecanismo de la *dominancia* de esta mutación es la *ganancia* de una nueva *función* cuando la huntingtina tiene una zona grande de poliglutamina; pero hay que subrayar que éste es sólo uno de los mecanismos de dominancia, que son de variada naturaleza (véase más adelante)

El gen de la huntingtina se transcribe en numerosos tejidos: músculo, linfocitos, gónadas y otros; pero es particularmente transcripto y

expresado como huntingtina normal en el cerebro, sin que sea especialmente grande la expresión en el cuerpo estriado, sino sólo moderada. La presencia de huntingtina es demostrable por inmunohistoquímica, mediante anticuerpos monoclonales; de esta manera, se ha detectado la huntingtina exclusivamente en el citoplasma neuronal, en el pericarion, en fibras nerviosas y en terminales sinápticas. Aunque la función de la huntingtina normal no está bien explicada, su localización citoplasmática muestra que no es un regulador transcripcional, sino una proteína funcionante en el citoplasma y en las terminaciones nerviosas, probablemente vinculada al transporte intracelular de vesículas. La localización neuronal se observa en los enfermos de Huntington, en quienes se ha demostrado que las células producen *las dos huntingtinas*: la normal y la mutada, en proporciones similares, y que ambas aparecen en las células, tanto por métodos microscópicos como por los moleculares. De esta manera, el efecto patológico de la mutación no es la pérdida de la función normal de la huntingtina, lo cual está de acuerdo con la falta de una severidad muy grande (letalidad embrionaria) en los homocigotas. Lo que aparentemente produce la enfermedad es la *adquisición* de una nueva propiedad por parte del producto mutado; esta "ganancia de función", como se denomina en Genética, es un mecanismo por el cual una mutación puede tener carácter dominante. Se desconoce todavía cuál es la propiedad adquirida por la huntingtina mutada, pero puede decirse que su resultado final es la muerte de las neuronas espinosas medianas, primero en el cuerpo estriado y luego más generalizadamente en otras zonas del encéfalo. El mecanismo de la ganancia de una función tóxica ha sido investigado activamente (panel 9-2)

La neurofibromatosis: otra enfermedad de herencia mendeliana dominante

La neurofibromatosis 1 (hay un segundo tipo, neurofibromatosis 2, debida a otro gen) es una de las enfermedades mendelianas más comunes en la especie humana. su incidencia es de 1 cada 3.000 nacidos vivos.[35] La neurofibromatosis 1 (NF-1) es producida por una mutación del gen NF1 localizado en el cromosoma 17 (17q11.2), mientras que la neurofibromatosis-2 (NF-2) o NF bilateral del acústico es producida por la mutación del gen NF2 localizado en el cromosoma 22q11.2. La neurofibromatosis 1 (también llamada enfermedad de von Recklinghausen) se caracteriza por el desarrollo de numerosos y pequeños tumores benignos a lo largo de las vainas de los nervios periféricos, que generalmente se palpan bajo la piel o que protruyen en ella, e infinidad de manchas o pigmentaciones epidérmicas, en especial las llamadas manchas "café con leche" Estas manchas pueden estar desde el nacimiento, mientras que los tumores se desarrollan progresivamente con la edad (fig. 9-12) También hay pequeños nódulos pigmentados ("de Lisch") en el iris visibles con la lámpara de hendidura.

La progresividad de la NF-1 puede llegar a ser desfigurante; pero si no hay complicaciones, es relativamente benigna. Hay muchos otros rasgos que son de aparición variable, tales como el desarrollo de glioma del nervio óptico, baja estatura, trastornos del aprendizaje, hipertensión arterial, seudoartrosis y escoliosis, los cuales hacen que el cuadro clínico de la NF-1 pueda ser complejo, y por consiguiente podrían implicar otros factores en el desarrollo de la enfermedad, aunque se considera que son fortuitos.[36] Los signos más útiles son las manchas "café con leche", un número superior a siete en un niño sugiere el diagnóstico de NF-1 El criterio clásico son seis manchas de al menos 1,5 cm de diámetro en adultos, o al menos 0,5 cm en niños.[36] La presencia de pequeñas máculas o "pecas" en las axilas e ingles es otro signo clásico.[36]

El gen de la NF-1 fue localizado en el cromosoma 17 mediante el análisis de ligamiento (véase cap. 11) Fue clonado en 1990 mediante el enfoque de "genética inversa" (que va del gen a la proteína sin conocer ésta primero), también llamado de análisis posicional (porque se basa en los estudios de ligamiento para determinar la posición de un gen, estudiando transcriptos de una región determinada) y ha sido intensamente estudiado desde entonces.[37]

Panel 9-2. Avances en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington

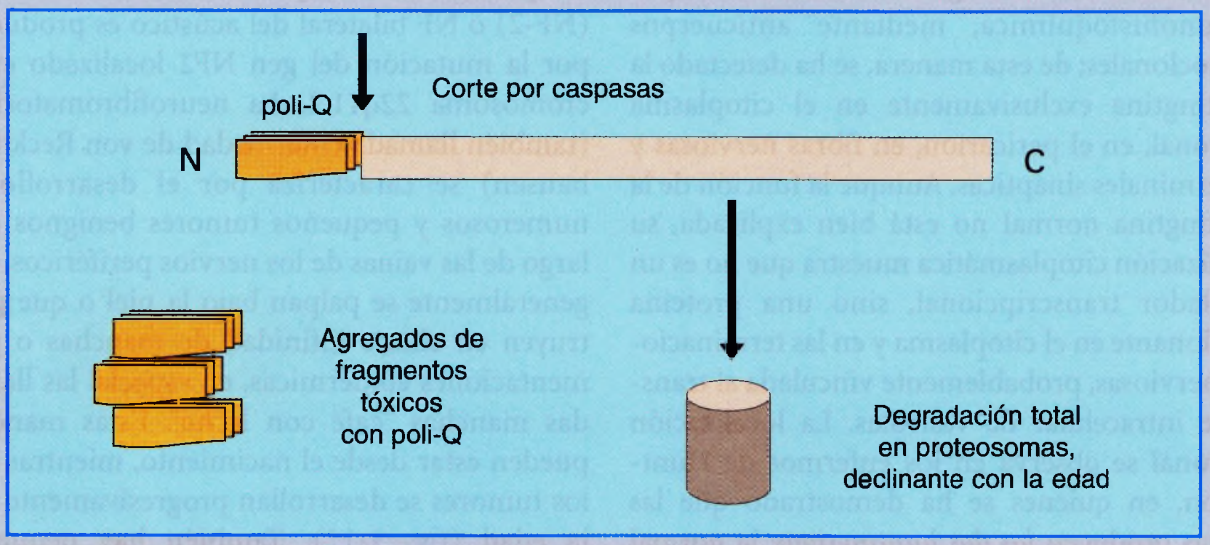


Fig. 1. Los dos caminos posibles de fragmentación de la huntingtina mutada. Si la degradación total en proteasomas declina con la edad, se acumulan los fragmentos tóxicos producidos por caspasas.

Las evidencias experimentales acumuladas en los trabajos recientes muestran que la huntingtina mutada, o más especialmente, su extremo amino-terminal con poliglutamina (poli-Q) es reconocida como una conformación de plegamiento proteínico anormal y atacada por ciertas enzimas tales como caspasas específicas, capaces de cortar el extremo N-terminal con poli-Q y conducir a la agregación de estos fragmentos entre sí; pero además, la proteína mutada, o los mismos fragmentos, pueden ser llevados al camino de degradación total a través del sistema de ubicuitina y proteosomas.[31] A pesar de las hipótesis alternativas para explicar esta patogenia por la alteración de funciones de factores de transcripción como el CREB y el REST [32] y la alteración de funciones mitocondriales[33] solamente la producción de fragmentos de huntingtina por las caspasas está sólidamente aceptada y sigue siendo el eje de las investigaciones sobre los mecanismos patogénicos en la enfermedad de Huntington. Un refuerzo de esta hipótesis, que explicaría la relación de la enfermedad con la edad, son las experiencias que muestran que las neuronas van decreciendo en su actividad de degradación proteica con los proteosomas a medida que aumenta la edad, y al no poder eliminar con una velocidad eficaz a la huntingtina mutada, se van acumulando fragmentos con poli-Q en función directa a la edad.[34] De esta forma, la mutación de expansión de tripletes va produciendo efectos acumulativos con la edad del paciente, por la "ganancia" de función tóxica de sus extremos poli-Q y la decreciente eficiencia en la eliminación de la proteína anormal (fig. 1).

El producto normal del gen, la proteína llamada *neurofibromina*, forma parte de un grupo de proteínas activadoras de la actividad enzimática de guanosina-trifosfatasa (GTPasa), estas proteínas son llamadas en general *proteínas activadoras de GTPasa* o PAG, incluida la GTPasa producto del oncogén *ras*.

El gen de la neurofibromina (*NF-1*) es muy grande: abarca 350 kb y tiene la tasa de mutación más elevada de enfermedades mendelianas humanas, casi 1×10^{-4}. El gen contiene 60 exones e intrones muy variables en longitud, desde 60 pares de bases hasta el intrón gigante Nº 27. Este intrón muy especial contiene en su interior tres genes pequeños, cuya transcripción se hace en sentido contrario al del gen contenedor, *NF-1*, es decir, en la cadena opuesta, dos de estos genes corresponden a secuencias de tipo endoviral (*EV12A* y *EV12B*), pero el tercero codifica una glucoproteína componente de la mielma y pre-

sente en oligodendrocitos (OMGP) El gen *NF-1* codifica un ARNm de sólo 13 kb, casi 30 veces menor que el gen. La proteína (*neurofibromina*) tiene 2.818 aminoácidos, con un peso molecular de 327 kDa, y contiene un dominio relacionado con las *proteínas PAG* (activadoras de GTPasa, GAP en inglés), de 424 aa (entre los residuos 1 175 y 1.524), codificado por los exones 20 al 27 (fig. 9-13)

Mutaciones de la neurofibromina

Se han detectado varios cientos de mutaciones del gen de la neurofibromina, de las cuales aproximadamente la mitad son cambios pequeños (puntuales) y también un considerable número de deleciones grandes; la mayoría de las mutaciones implica el truncamiento de la proteína luego del dominio PAG Alrededor del 5% de los pacientes tienen una deleción total o casi total del gen *NF1* [38] Las presentes evidencias sugieren que se transcriben ambos alelos, el normal y el mutado, cuando está presente, en los enfermos heterocigotas. No se ha estudiado un enfermo homocigota, pero en líneas celulares cultivadas in vitro se ha observado que la pérdida del alelo normal –queda sólo el mutante– se acompaña de cambios celulares típicos del crecimiento celular en tumores malignos. Al contrario de lo que sucede en la enfermedad de Huntington, muchas mutaciones son "de novo", es decir, que (en pacientes no consanguíneos), el 50% de las mutaciones son nuevas. Este hecho contrasta con la falta de observación de un centro mutacional o "punto caliente" en el gen, es decir, hasta ahora no se ha observado una región del gen que tenga características de hipermutabilidad.

Explicación de la dominancia en la neurafibromatosis

Aunque es muy probable que la neurofibromina tenga funciones adicionales, su única función comprobada es la de suprimir el crecimiento celular anormal. Esta función supresora del crecimiento tumoral se ha observado en cultivos de tejidos; en los tumores malignos (neurofibrosarcomas) que a veces desarrollan los enfermos de neurofibromatosis, se ha visto una disminución o ausencia de neurofibromina acompañada de un alto nivel del producto (oncogénico) $p21^{ras}$ en forma activada, con GTP, en vez de la forma inactiva, con GDP Se cree que la neurofibromina regula las proteínas *Ras* (que transmiten señales desde receptores tirosina-quinasa de membrana, hasta el núcleo), convirtiendo su forma activa con GTP a la inactiva con GDP La neurofibromina, por su localización citoplasmática, no interviene en los fenómenos de regulación intranucleares. Las neurofibrominas normal y mutante se

Fig. 9-12. Neurofibromatosis. Neurofibromas superficiales de distinto tamaño; dos moluscos péndulos grandes. No se observan manchas "café con leche" (Tomada de Cordero A. y col.., Manifestaciones cutáneas de las enfermedades sistémicas. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1997).

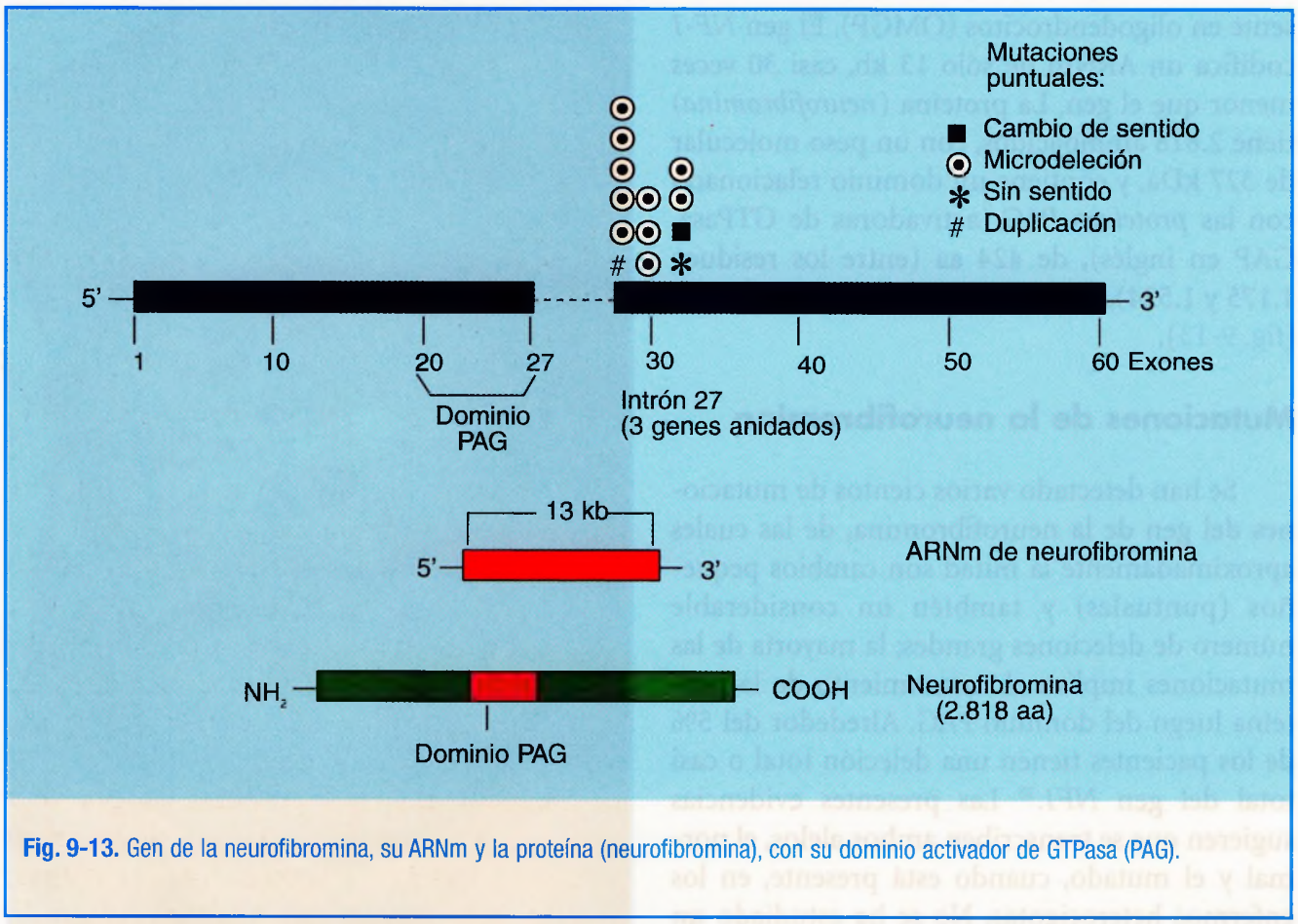


Fig. 9-13. Gen de la neurofibromina, su ARNm y la proteína (neurofibromina), con su dominio activador de GTPasa (PAG).

encuentran ambas en cultivos de melanocitos de pacientes y en neurofibromas; pero las neurofibrominas mutantes tienen, en casi todos los casos, abolida o disminuida 200 a 400 veces su capacidad de activación de GTPasa (función PAG). De ahí que el mecanismo de la dominancia en esta enfermedad es la *insuficiencia funcional del producto haploide* (insuficiencia haploide), es decir, el alelo normal es insuficiente para controlar los factores de crecimiento relacionados con las proteínas de membrana de tipo G (proteínas ligadoras de nucleótidos de guanina). La mayoría de las mutaciones son deleciones (grandes o pequeñas), codones de terminación o mutaciones que cambian el marco de lectura, convirtiendo a la proteína mutante en una proteína que es producida y puede ligarse a otras macromoléculas, pero no es funcional como supresora de crecimiento anormal. El alelo normal no es suficiente para regular este crecimiento que, como la mayoría de los síntomas, se incrementa con la edad. Otros aspectos muy interesantes de la neurofibromina, como su capacidad de unirse a los microtúbulos, aún están siendo investigados.

Enfermedades de herencia recesiva: la enfermedad fibroquística

La enfermedad fibroquística (enfermedad fibroquística del páncreas, mucoviscidosis, fibrosis quística, FQ) es una importante enfermedad hereditaria de tipo recesivo, que afecta a 1 de cada 2.000 recién nacidos en las poblaciones de raza blanca, su incidencia es menor en las poblaciones africanas y asiáticas. Es una enfermedad generalizada que afecta las glándulas exocrinas y las glándulas sudoríparas de todo el cuerpo, a causa de un defecto del transporte del anión cloro (Cl^-) en las membranas celulares de los epitelios glandulares. El pronóstico es desfavorable por el desarrollo de complicaciones pulmonares y cardíacas; pero gracias la atención médica cuidadosa desde la edad temprana, el actual promedio de sobrevida llega a más de 30 años.[39,40] Los

niños afectados tienen poco aumento de peso, malabsorción de los alimentos (por insuficiencia del páncreas exocrino) e infecciones respiratorias recurrentes; la prueba de análisis del sudor da un diagnóstico temprano, con niveles de sodio y cloro elevados en un 100% (más de 60 mEq/L) Las enzimas pancreáticas (tripsina, amilasa y lipasa) están disminuidas, lo cual lleva a la desnutrición y anemia por malabsorción. La secreción mucosa del epitelio respiratorio es anormalmente viscosa y esto dificulta la función ventilatoria normal y lleva a infecciones repetidas que alteran aún más la ventilación pulmonar, desembocando en una *enfermedad pulmonar obstructiva crónica* (EPOC) y ésta, en insuficiencia cardíaca. Hay además un verdadero abanico de variabilidad en algunos de los síntomas, porque son variadas las mutaciones del gen correspondiente, y además intervienen factores ambientales en el desarrollo de algunos de los síntomas; por ello la enfermedad fibroquística es muy demostrativa en el estudio de las características de las enfermedades hereditarias (fig. 9-14) [18]

El gen de la enfermedad fibroquística fue localizado en el cromosoma Nº 7 (7q21) por estudios de ligamiento y genética inversa, y fue clonado en 1989 [41] El gen es muy grande, pues abarca 230 kb, y posee 27 exones, que codifican un ARNm de 6,129 kb, el cual a su vez codifica la proteína de 1.480 aa que ha recibido el nombre de *regulador transmembranoso (de la conductancia) de la fibrosis quística* (RTFQ – CFTR en inglés) En realidad, esta proteína es un "canal de cloro" de la membrana citoplasmática (hay otros canales para cloro además del de la fibrosis quística Su estructura es compleja y su espectro mutacional es variado (fig. 9-15; véase también cap. 8)

El producto del gen de la enfermedad fibroquística, es decir la proteína RTFQ, es una proteína compleja que por sí misma forma un canal para el pasaje del ión cloro dentro de la membrana citoplasmática, pero que también es capaz de regular el pasaje del ión, cuando se asocia con dos moléculas de ATP una en cada dominio ligador de nucleótido ATP) Además, necesita asociarse con una proteinquinasa (PK), otra proteína relacionada con la membrana (que a su vez recibe un estímulo a partir del adenosín-monofosfato cíclico, AMPc); es decir que el canal de cloro (producto del gen), para ser funcional, debe recibir *dos señales reguladoras*: la primera, la fosforilación de su dominio R (regulador) por una proteinquinasa (PK), la segunda, la asociación de dos moléculas de ATP Esta doble regulación del canal de cloro de la FQ se refleja en la estructura de la proteína: sus dos dominios llamados "ligadores de nucleótido" son los que se pueden asociar con ATP, mientras que el dominio llamado "regulador" (R) es el que se asocia con la proteinquinasa y es fosforilado por ella. Por otro lado, los dos dominios llamados "transmembranosos" son los que realmente forman las paredes del canal insertado en la membrana, estos dominios transmembranosos son fuertemente hidrofóbicos y se alojan en la doble capa lipídica de la membrana, dejando un espacio central para el pasaje iónico (cuadro 9-2)

El hecho de que el producto del gen de la enfermedad fibroquística sea conocido en detalle permite correlacionar las mutaciones en diversas regiones del gen con cambios funcionales del canal de cloro.[39] El gen de este canal de cloro (*RTFQ*) presenta numerosas posibilidades de mutación por su gran tamaño (230 kb); en realidad, hasta 2009 se habían descrito más de 1.500 mutaciones diferentes del gen *RTFQ*;[39] y este hecho complica el diagnóstico molecular de pacientes y de portadores heterocigotas. Sin embargo, hay una concentración muy grande de mutaciones en los exones 10 y 11, que codifican el primer dominio ligante de ATP en la proteína, y una de estas mutaciones, la denominada *delta-F-508*, está presente aproximadamente en el 70% de los pacientes de enfermedad fibroquística, aunque variando de manera significativa de una población a otra. La mutación ΔF508 es una deleción de tres bases en el exón 10, que no cambia el marco de lectura y que ocasiona la pérdida de un solo aminoácido en la proteína total. la fenilalanina correspondiente al codón 508. Este simple cambio en una proteína que tiene casi 1.500 aminoácidos es suficiente para provocar la enfermedad en toda su intensidad; la proteína se produce pero no se termina de glucosilar, no abandona el retículo endoplasmático y, por con

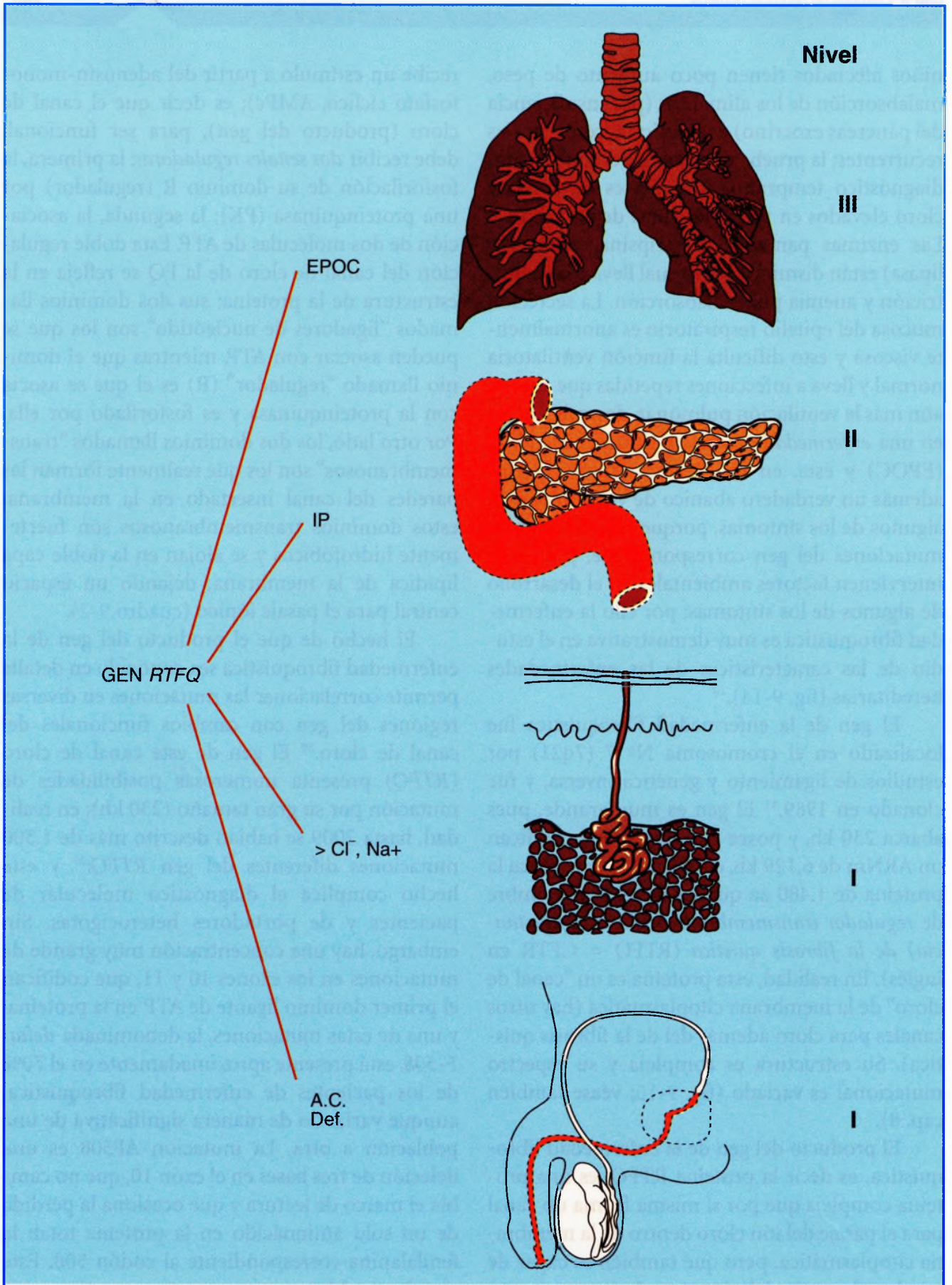


Fig. 9-14. Variabilidad de los principales síntomas en el fenotipo de la enfermedad fibroquística. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; IP· insuficiencia pancreática; > Cl-, Na+: aumento de electrolitos en sudor· A.C. Def.. aplasia del conducto eferente. Niveles de variabilidad: III, muy variable; II, variable de acuerdo con la mutación; I, poco variable (se encuentran casi constantemente en la enfermedad).

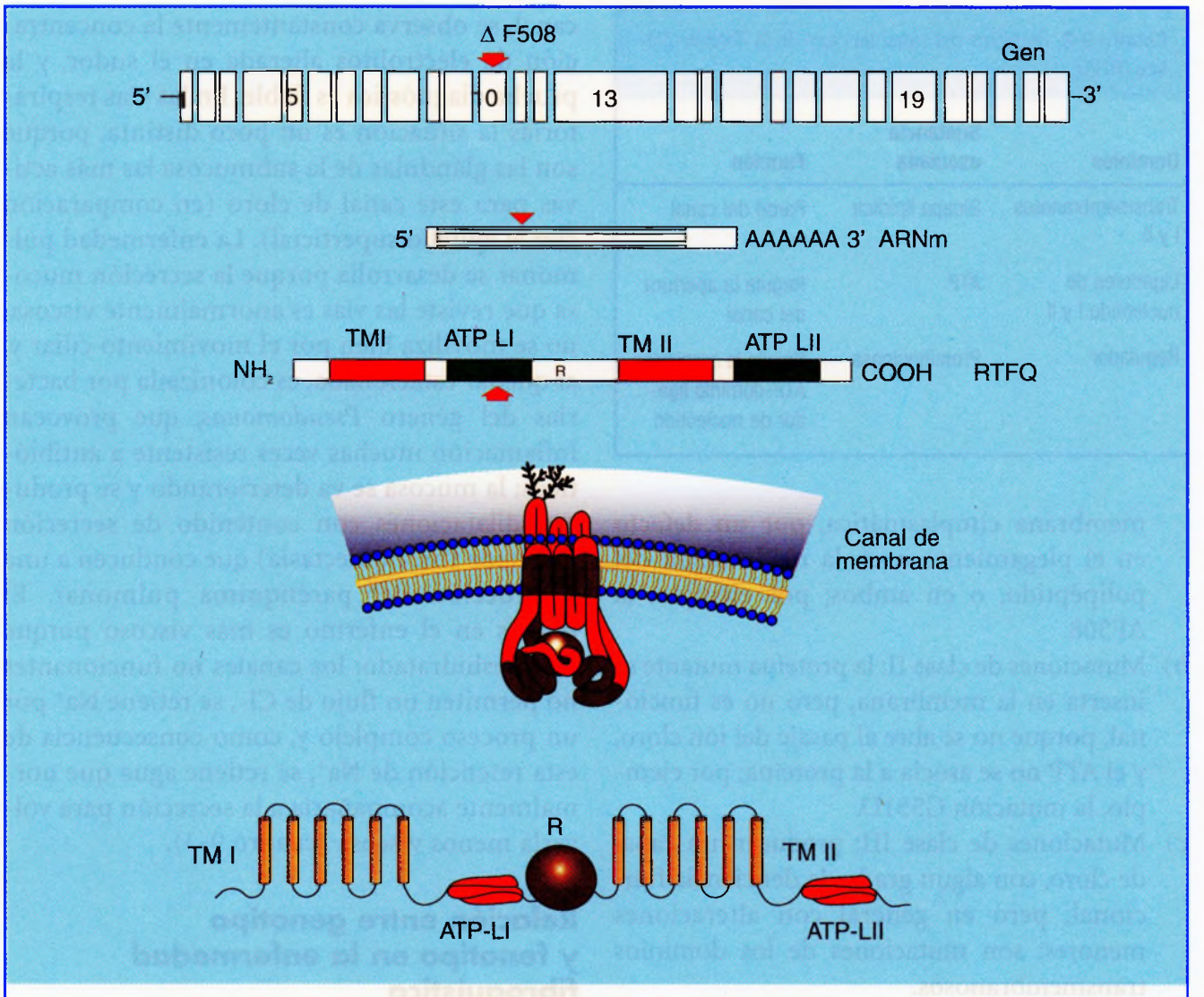


Fig. 9-15. Gen del canal de cloro (*RTFQ*), con sus 27 exones, ARN mensajero correspondiente y esquema de la proteína con sus dominios transmembranosos I y II (TM I; TM II), los ligadores de nucleótido ATP (ATP-LI; ATP-LII) y el regulador (R). Los exones 6A 6B, 14A-14B y 17A-17B se cuentan separadamente.

siguiente, no llega a ubicarse en la membrana citoplasmática, es decir que la célula se queda sin este canal de cloro cuando se encuentran los dos alelos del gen con la mutación ΔF508. Se ha comprobado que bajando la temperatura a 27 °C en cultivos celulares, la proteína mutada de ΔF508 es capaz de migrar hasta la membrana celular y restaurar un canal de cloro; por consiguiente, la ΔF508 es una mutación "condicional", sensible a la temperatura.[42]

De las otras 1.500 mutaciones, la mayoría son muy raras y se han encontrado en pocos individuos, pero una veintena son bastante comunes en las poblaciones de raza blanca. Estas mutaciones pueden ser de varios tipos: cambios de sentido (aminoácido cambiado, muchas), sin sentido o de terminación (pocas), cambio del marco de lectura (cantidad moderada), defectos de corte y empalme (pocas), y su ubicación preferencial es en el dominio ligador de ATP I (máximo) y en el ligador de ATP II. Las diferentes mutaciones del gen del canal de cloro *RTFQ* se pueden clasificar en tres categorías funcionales:[39]

a) Mutaciones de clase I. comprenden una mayoría de mutaciones, en las cuales el polipéptido mutante no se puede insertar en la

Cuadro 9-2. Dominios del canal de cloro de la fibrosis quística (RTFQ)

Dominios	Sustancia asociada	Función
Transmembranosos I y II	Bicapa lipídica	Pared del canal
Ligadores de nucleótido I y II	ATP	Regula la apertura del canal
Regulador	Proteinquinasa	Regula la asociación ATP-dominio ligador de nucleótido

membrana citoplasmática, por un defecto en el plegamiento o en la maduración del polipéptido, o en ambos; por ejemplo, la ΔF508.

b) Mutaciones de clase II. la proteína mutante se inserta en la membrana, pero no es funcional, porque no se abre al pasaje del ión cloro, y el ATP no se asocia a la proteína, por ejemplo, la mutación G551D.

c) Mutaciones de clase III. producen un canal de cloro, con algún grado de deficiencia funcional, pero en general con alteraciones menores; son mutaciones de los dominios transmembranosos.

Patogenia de la enfermedad fibroquística

Para explicar la forma en la cual la mutación del gen del canal de cloro *RTFQ* lleva al desarrollo de esta enfermedad es conveniente subrayar que las manifestaciones graves de la fibrosis quística son básicamente las pulmonares y por ello la mayor parte de los estudios se realizan sobre estas manifestaciones; la afectación del páncreas y otras glándulas contribuye poco a la mortalidad y morbilidad. Hay que recalcar que no todos los epitelios glandulares ponen en actividad este canal de cloro, ni lo hacen con la misma intensidad, por ejemplo, los conductos excretores de las glándulas sudoríparas normales tienen este canal muy activo permanentemente para la resorción de iones; por ello, en la enfermedad, al no funcionar el canal, se observa constantemente la concentración de electrolitos alterada en el sudor, y la prueba diagnóstica es fiable. En las vías respiratorias la situación es un poco distinta, porque son las glándulas de la submucosa las más activas para este canal de cloro (en comparación con el epitelio superficial) La enfermedad pulmonar se desarrolla porque la secreción mucosa que reviste las vías es anormalmente viscosa, no se moviliza bien por el movimiento ciliar y, al quedar estacionada, es colonizada por bacterias del género *Pseudomonas*, que provocan inflamación muchas veces resistente a antibióticos; la mucosa se va deteriorando y se producen dilataciones con contenido de secreción infectada (bronquiectasia) que conducen a una destrucción del parénquima pulmonar El mucus en el enfermo es más viscoso porque está deshidratado: los canales no funcionantes no permiten un flujo de Cl-, se retiene Na^+ por un proceso complejo y, como consecuencia de esta retención de Na^+, se retiene agua que normalmente acompañaría a la secreción para volverla menos viscosa (cuadro 9-3)

Relación entre genotipo y fenotipo en la enfermedad fibroquística

Esta enfermedad brinda una ocasión de verificar las variadas relaciones entre genotipo y fenotipo. En primer lugar, el concepto de acción *pleiotrópica* de los genes: es la capacidad de provocar manifestaciones en varios tejidos y órganos, que aparentan estar desvinculadas entre sí. Las manifestaciones pulmonares, las digestivas, las anomalías del sudor y la ausencia casi constante del conducto deferente en los varones afectados, aparecen, a primera vista, desvinculadas entre sí; sin embargo, son todas manifestaciones de la mutación de un único gen.

Es interesante señalar que aun las variantes más benignas de la FQ presentan aplasia del conducto deferente y consiguiente esterilidad.[43] Esta aplasia se atribuye a una secreción anormal del conducto de Wolff, que produce su oclusión alrededor de la semana 18 del desarrollo embrionario.

Cuadro 9-3. Patogenia de la enfermedad pulmonar en la fibrosis quística

Fenómeno	Características
Mutación del gen *RTFQ*	Tipos I y II
↓	
Proteína RTFQ anormal	Falla en dominios L I-II o plegamiento
↓	
Retención de iones y agua	Canal de Ci- no funcional
↓	
Secreción mucosa anormal	Poco hidratada
↓	
Acumulación de secreción	No movilizada por movi- miento ciliar
↓	
Hipoventilación pulmonar	Disminución de la luz en conductos
↓	
Inflamación mucosa	Infección por *Pseudomonas*
↓	
Enfermedad pulmonar crónica	Bronquiectasias, enfisema

Las manifestaciones digestivas, principal mente pancreáticas, están más visiblemente vin culadas con anormalidades de la secreción. la secreción poco hidratada de los acinos no es adecuadamente vehiculizada por los conductos, se estanca y los dilata, llevando a la producción de cavidades ("quistes") con secreción, que por compresión van provocando la atrofia del tejido secretor.

Por otro lado, la enfermedad fibroquística muestra la variedad de origen. hay más de 1.500 mutaciones diferentes del mismo gen, muchas de las cuales dan un cuadro patológico igual, por ejemplo las que afectan el dominio ligador de ATP; éste es un caso de *heterogeneidad genética*, que se define como el fenómeno por el cual el mismo cuadro clínico puede ser el producto de más de un genotipo. Cuando, como en este caso, se trata de diferentes mutaciones de un solo gen, se denomina heterogeneidad alélica (o intraalélica) Muchas más complicaciones diagnósticas trae la heterogeneidad genética no alélica (o interalélica), que se produce cuando las mutaciones de *diferentes genes* provocan igual cuadro clínico, como en el caso de las retinitis pigmentarias, braquidactilias y otras enfermedades hereditarias. En estos casos habitualmen te se trata de mutaciones en genes que forman parte de una misma vía metabólica o de señali zación intracelular.

Mecanismo de la recesividad en la fibrosis quística

La enfermedad fibroquística es claramente recesiva. los heterocigotas para una de las mutaciones graves, como la ΔF508, son completamente normales, aunque puede detectarse la proteína anormal en sus células; es decir que basta con el alelo normal para el canal de cloro para que no haya manifestaciones patológicas. En cultivos de tejidos, se ha observado que basta con que al menos un 6% del total de células tengan un canal funcional para que la secreción sea normal, posiblemente porque las uniones de tipo nexo entre células epiteliales permiten la difusión de un equilibrio iónico desde las células normales hacia las vecinas anormales. Estas observaciones han conducido a que la enfermedad fibroquística sea considerada un modelo propicio para lograr una tera pia génica, consistente en la introducción del gen normal en una parte de las células del epi telio respiratorio. Como ocurre típicamente en las enfermedades mendelianas recesivas, la presencia del producto anormal no interfiere con la función del normal (véase panel 9-3)

Enfermedad de transmisión autosómica recesiva. Albinismos y expresión génica variable

Hay más de una docena de tipos hereditarios de albinismos, que se agrupan en dos clases: a) albinismos oculocutáneos (AOC) y b albinismos oculares (AO) El AOC-1A es el tipo más común de albinismo en las poblaciones de origen europeo

Panel 9-3. Disfunción del canal de cloro y terapia génica en la enfermedad fibroquística

Panel

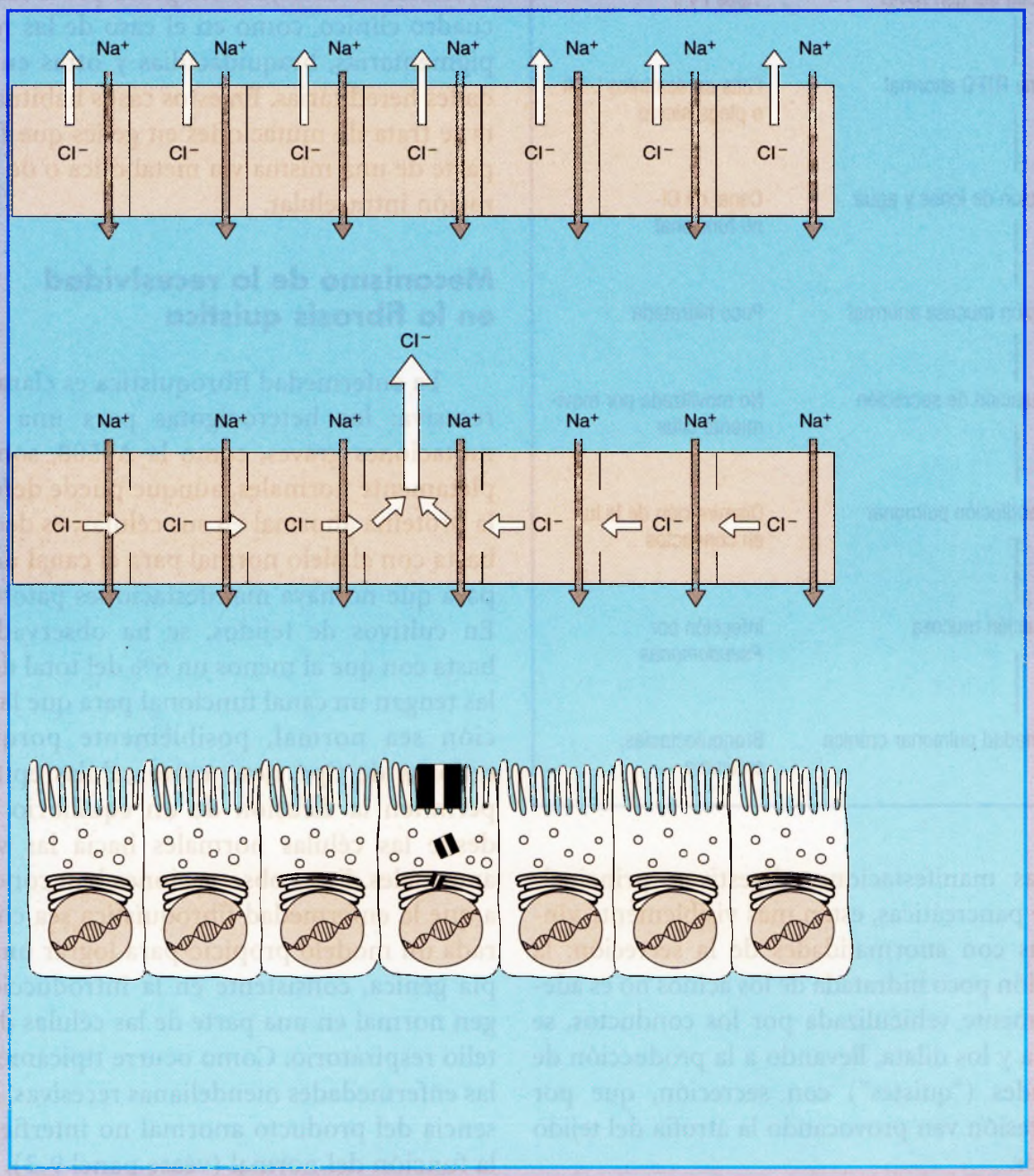


Fig. 1. Esquema del epitelio respiratorio normal (arriba) y el de un epitelio con el canal de cloro anulado, excepto en la célula central, que permite evacuar anión cloro y reabsorber catión sodio aproximándose al estado normal.

La enorme cantidad de mutaciones diferentes que pueden ocasionar la FQ plantea un primer problema: diagnosticar cuál es la o las mutaciones presentes en un caso determinado. La incidencia de cada tipo de mutación varía según la región y el grupo humano: así, para la Argentina, las frecuencias de cada mutación son similares a las de Europa Occidental, pero diferentes de las de otros países de Latinoamérica[44]. Las mutaciones pueden clasificarse en varias clases (véase el texto principal) y, afortunadamente para el diagnóstico, las más graves, que interfieren en la síntesis o el procesamiento del canal y que tienen gran incidencia, son pocas. Por otra parte, los

requerimientos para una eficaz terapia génica de la FQ indican que sólo un 6 a 10% de las células de la mucosa respiratoria deben ser corregidas para restaurar la función normal del epitelio, en virtud de que las comunicaciones interepiteliales (uniones nexo) que dejan pasar iones son abundantes y permiten que varias células anormales vehiculicen sus iones a través de una célula con canal normal [45,46] (fig. 1). Los ensayos clínicos de terapia génica se vienen haciendo en los Estados Unidos desde 1994; los que utilizan los adenovirus como vectores son los que alcanzan mayor eficacia para transducir el gen normal; sin embargo, estos vectores provocan una reacción inflamatoria, de raíz inmunológica, a los 7-10 días de la administración, lo cual constituye la mayor barrera para esta terapia. Otros ensayos de terapia génica y de drogas correctoras del transporte intracelular deficiente de la proteína mutada están en marcha.[46]

y el AOC-2 Y AOC-3 en poblaciones africanas.[47] Los signos y síntomas oculares son decisivos en el diagnóstico de los albinismos y por ello figuran primordialmente en su clasificación. En realidad, las anomalías de la pigmentación de la piel, faneras y retina dependen de un complejo número de fenómenos. El tipo más conocido de albinismo, llamado oculocutáneo de tipo 1A, es producto de mutaciones del gen para la tirosinasa IA (ubicado en el cromosoma 11q14), mientras que el albinismo ocular más frecuente, el AO-1, se debe a un gen ligado al cromosoma X.[48] En los albinismos hay constantemente reducción de la agudeza visual, reducción de la pigmentación del epitelio retiniano y del iris y transposición anormal de fibras nerviosas a nivel del quiasma óptico, responsables de un estrabismo temprano. La pigmentación de la piel es variable, de acuerdo con los tipos de albinismo. El iris generalmente es rosado o de color claro.

La formación de pigmento de la piel (melanina) es parte del camino metabólico que se inicia en la fenilalanina, sigue con la tirosina, la DOPA, la DOPA-quinona y allí se bifurca para formar, por un lado las eumelaninas y, por el otro, las melaninas con azufre o feomelaninas (fig. 9-16)

La enzima mejor conocida de este camino metabólico es la *tirosinasa* IA, o tirosinasa melanogénica, que hidroxila la tirosina convirtiéndola en 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), y luego convierte la DOPA en DOPA-quinona. Debe advertirse que hay por lo menos otra tirosinasa, la hepática, producto de otro gen. El gen de la tirosinasa IA parece ser activado específicamente en los *melanocitos* (derivados embriológicos de la cresta neural), cuyas células antecesoras deben migrar hasta la piel, la coroides y las faneras. A su vez, la síntesis del pigmento (melaninas) no se hace directamente en la matriz citoplasmática, sino dentro de estructu-

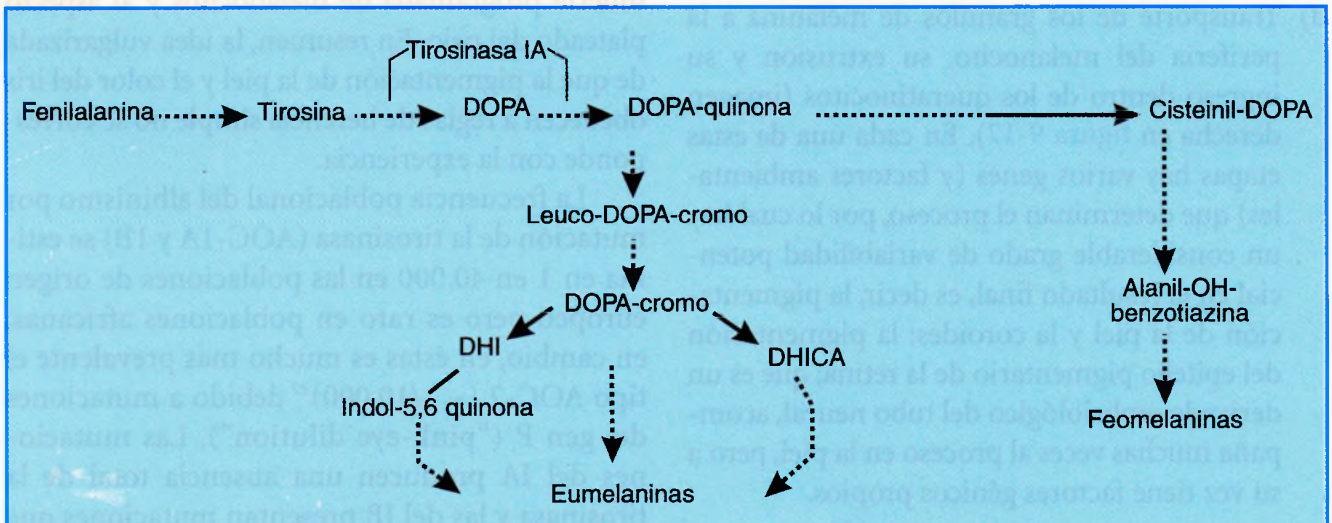


Fig. 9-16. Camino metabólico de la melanina (simplificado).

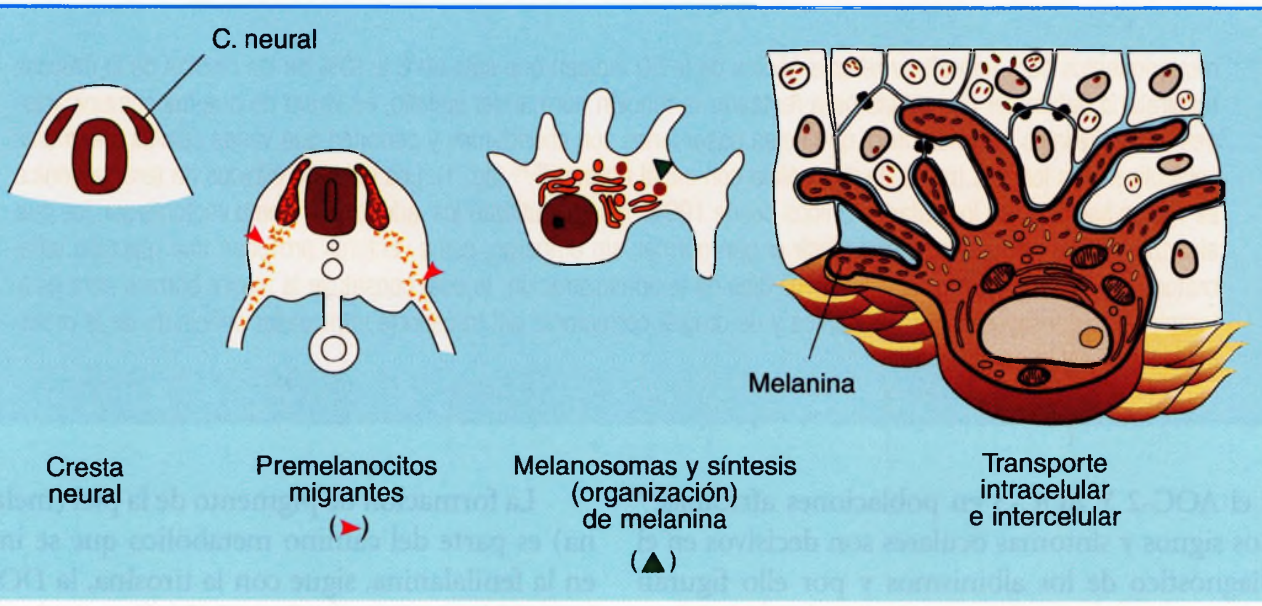


Fig. 9-17 Etapas del desarrollo de la pigmentación melanínica. Diagrama arriba, y esquema de las células, abajo.

ras membranosas especiales, los *melanosomas*. Los melanosomas se diferencian hasta madurar en gránulos de melanina; estos gránulos son distribuidos a las ramificaciones periféricas del melanocito, liberados al espacio intercelular y captados por los queratinocitos de las capas medias y basales de la epidermis. Por consiguiente, el desarrollo del pigmento en su localización normal depende al menos de cuatro procesos diferentes (fig. 9-17):

a) Migración de los premelanocitos a sus órganos blanco
b) Organización de los melanosomas
c) Síntesis de eumelaninas y feomelaninas
d) Transporte de los gránulos de melanina a la periferia del melanocito, su extrusión y su ingreso dentro de los queratinocitos (imagen derecha en figura 9-17) En cada una de estas etapas hay varios genes (y factores ambientales) que determinan el proceso, por lo cual hay un considerable grado de variabilidad potencial en el resultado final, es decir, la pigmentación de la piel y la coroides; la pigmentación del epitelio pigmentario de la retina, que es un derivado embriológico del tubo neural, acompaña muchas veces al proceso en la piel, pero a su vez tiene factores génicos propios.

La migración de los melanocitos está alterada en ciertas hipopigmentaciones circunscritas, tales como el mechón blanco de pelo o manchas hipopigmentadas ("piebald" en inglés) La formación de los melanosomas está alterada en ciertos albinismos oculocutáneos que son tirosinasa-positivos. Se presume que la distribución intracelular de los melanosomas depende de componentes del citoesqueleto y está regulada por la hormona melanocitoestimulante (MSH), cuyo receptor celular puede estar alterado. La melanogénesis en sí misma requiere la presencia de una tirosinasa normal y, además, la presencia de otras enzimas como la DOPA-cromotautomerasa; también hay, por lo menos, un producto génico que lleva a la muerte programada de melanocitos y al aspecto plateado del pelo. En resumen, la idea vulgarizada de que la pigmentación de la piel y el color del iris obedecen a reglas de herencia simple no se corresponde con la experiencia.

La frecuencia poblacional del albinismo por mutación de la tirosinasa (AOC-1A y 1B) se estima en 1 en 40.000 en las poblaciones de origen europeo pero es raro en poblaciones africanas; en cambio, en éstas es mucho más prevalente el tipo AOC-2 (~ 1/10.000)[47] debido a mutaciones del gen P ("pink-eye dilution") Las mutaciones del IA producen una ausencia total de la tirosinasa y las del IB presentan mutaciones que admiten variables grados de actividad limitada de la enzima.

Las variaciones normales en la pigmentación del iris humano y su modo de transmisión hereditaria habían sido consideradas erróneamente como ejemplos característicos de herencia del tipo mendeliano simple. Sin embargo, sus determinantes son complejos y no pueden ser analizados detalladamente en esta obra. Un análisis detallado del tema se encuentra en el trabajo de Sturm y Larsson (2009) [49]

Las retinitis pigmentarias recesivas y dominantes: heterogeneidad genética

Como ejemplo de las dificultades diagnósticas que ocurren cuando se usa sólo el fenotipo para analizar el tipo de herencia, es particularmente demostrativo el caso de la retinitis pigmentaria: se trata de un cuadro clínico que puede ser causado, al menos por 53 genes totalmente diferentes. Hay muchas otras enfermedades hereditarias en las cuales ocurre algo similar. Como se explicó anteriormente, la *heterogeneidad genética* es una traba para el diagnóstico y siempre debe ser sospechada cuando el modo de herencia parece contradictorio.

Las retinitis pigmentarias se caracterizan por un cuadro de disminución progresiva de la visión nocturna y disminución del campo visual, con un fondo de ojo característico, con degeneración de bastones y conos, y aparición del pigmento de la capa pigmentaria en las demás capas de la retina, el cual forma gránulos o espículas de contornos irregulares. Hay tres tipos de herencia. el tipo menos raro, autosómico recesivo; el autosómico dominante, y el más grave, el ligado al X.

La prevalencia de este grupo de enfermedades es de 1:3.000 a 1·7.000.[50] La forma más benigna es la autosómica dominante, que puede preservar la visión nítida hasta los 60-70 años, y en la cual se ha identificado un número de mutaciones del gen de la rodopsina, aunque los estudios de ligamiento asignan al menos nueve posiciones o loci diferentes para estas formas dominantes. Hay además dos loci en el cromosoma X y treinta y dos, al menos, para las formas recesivas, de los cuales uno corresponde al gen de la fosfodiesterasa de los bastones retinianos. Para completar el cuadro, existen al menos 30 síndromes hereditarios que presentan la retinitis pigmentaria como uno de los rasgos.[50] En síntesis, las proporciones en la población de los distintos tipos de alteraciones genéticas que presentan retinitis pigmenaria son las siguientes:[50] no sindrómicas, 65%; integrantes de síndromes, 25% (síndrome de Usher; Bardet-Biedl y otros), otras no diagnosticadas o desconocidas, 10%.

Con respecto a las proporciones en los tipos de herencia, los genes que producen la enfermedad con un patrón de herencia autosómico dominante son un 30-40% de los casos; los que muestran herencia autosómica recesiva son 50-60%, y los que muestran ligamiento al X son 5-15%.[50] Entre las formas dominantes (que suelen tener un curso más benigno), un 26% de los casos se atribuye a mutaciones del gen de la rodopsina (*RHO*) que es un receptor de fotones acoplado a la proteína G; otros 13 genes causan un 30% adicional del grupo hereditario dominante, y un 45% aún no tiene un gen determinado. Las formas recesivas diferentes son muchas más, puesto que se han identificado más de 30 genes distintos que pueden explicar un 70% de los casos recesivos, y 5 genes en el cromosoma X. Una proporción considerable de los casos de herencia recesiva lo constituyen síndromes con manifestaciones extraoculares, como el síndrome de Bardet-Biedl (con 14 subtipos) caracterizado por obesidad, diabetes mellitus, polidactilia e hipogenitalismo, y el de Usher (con sordera) En síntesis, más de 53 genes mutados pueden producir alteraciones visuales compatibles con el diagnóstico de retinopatía pigmentaria. Éste es un ejemplo extremo de heterogeneidad genética, que enfatiza la dificultad que se le presenta al profesional que trata de establecer un diagnóstico de un paciente determinado, y también su pronóstico, su posible orientación terapéutica y su asesoramiento en cuanto a su futuro reproductivo.

Comentarios sobre los mecanismos de dominancia y recesividad

Dominancia y recesividad son conceptos derivados del estudio del fenotipo y, dada la cadena muy larga de fenómenos que media entre el

genotipo y el fenotipo, no es de extrañar que en muchos casos sea difícil la asignación del tipo de herencia, salvo que se estudie un número considerable de pacientes con genealogías numerosas y/o extensas, en cuyo caso el análisis estadístico generalmente clarifica el tipo de herencia. Si se profundiza el estudio, desde el fenotipo más tosco a pruebas funcionales y análisis de laboratorio, aparecen datos más precisos en individuos aislados: esto es especialmente válido cuando se llega al nivel del producto génico (polipéptidos) y al nivel génico (ADN) Así, en la mayoría de las enfermedades de herencia recesiva, es posible diferenciar al homocigota normal, al portador sano heterocigota y al enfermo homocigota recesivo mediante el análisis de las proteínas correspondientes al producto génico: en el caso de la enfermedad fibroquística, el homocigota sano tiene el canal de cloro normal; el portador tiene dos canales de cloro, el normal y uno afuncional; y el homocigota enfermo tiene sólo un canal afuncional o directamente no tiene ese canal de cloro. En muchas enfermedades de herencia recesiva (pero no en todas, como lo muestra la FQ), el producto del gen normal es una *enzima* y los productos del gen mutado son *enzimas no funcionales*, de tal manera que existe una clara definición de los tres fenotipos a nivel de la enzima.

a) los individuos sanos tienen una actividad enzimática normal (100%),
b) los heterocigotas portadores (inaparentes) tienen una actividad enzimática reducida en un cierto grado (p. ej., 20-80%),
c) los enfermos (homocigotas para el gen mutado) tienen una actividad enzimática nula o muy disminuida (0-10%)

En estos casos, es visible que se cumplen las condiciones de la herencia recesiva: la presencia del producto del gen mutado *no interfiere* con el producto del gen normal, y es suficiente una cantidad del 50% (o menos) del producto normal para preservar la normalidad del fenotipo. Es decir, en las enfermedades de herencia recesiva es posible una "curación" mediante una producción relativamente pequeña del producto normal, y esto es justamente lo que ocurre en la hemofilia y otros casos, en los cuales se piensa que son accesibles a la terapia génica, o directamente se la intenta.

Distinto es el caso de las enfermedades de herencia dominante, porque las causas de la "dominancia" son más variadas: a) efecto tóxico

Cuadro 9-4. Enfermedades de herencia autosómica dominante

Enfermedad	Prevalencia	Características
Acondroplasia	1:40.000	Enanismo. Miembros cortos (rizomelia), lordosis, posible compresión medular
Déficit de α-1-antitripsina	1:1.400	Cirrosis hepática, colestasis y enfermedad pulmonar obstructiva
Braquidactilias	(Diversas)	Acortamiento digital en manos y pies. Hay al menos 11 tipos
Disostosis cleidocraneana	Baja	Aplasia clavicular, retraso de soldadura de huesos craneanos y erupción dentaria
Epidermólisis ampollar (bullosa)	(Diversas)	Ampollas, erosiones por traumas mínimos; hay varios tipos; los benignos son dominantes
Epiloia (esclerosis tuberosa)	1:25.000	Adenomas sebáceos, manchas epidérmicas, giiomas y angiomas encefálicos, convulsiones
Osteogénesis imperfecta	1:10.000	Esclerótica azul, otosclerosis, fragilidad ósea, fracturas espontáneas. Gen en 7q21.3; otro gen en 17q21.3
Síndrome de Marfan	1:60.000	Talla elevada, miembros delgados, aracnodactilia, malformaciones oculares y cardíacas
Enfermedad poliquística renal PK1 y PK2	1:1.000	Quistes renales, hepáticos y en otros órganos. Aneurisma cerebral (5%)

del producto del gen mutado (véase corea de Huntington), b)insuficiencia del alelo normal (véase neurofibromatosis), c) interacción con el producto normal o con el "blanco" del producto normal ("dominancia negativa") Además, muchas enfermedades dominantes afectan *proteínas estructurales*, como el colágeno en la osteogénesis imperfecta (véase cap. 14), de tal manera que el producto anormal entra en las estructuras celulares compitiendo con el normal. Las enfermedades dominantes son, por consiguiente, menos accesibles a una terapia radical, salvo excepciones. Finalmente, a nivel del ADN, todos los genotipos son identificables, al menos en teoría; cuando las mutaciones diferentes de un gen son numerosas, la identificación del tipo específico de alelo mutante puede ser dificultosa.

Fenómenos que complican la expresión fenotípico: interacción alélica y epistasis

Además de la ya mencionada penetrancia variable de los genes, otros fenómenos interfieren en una directa vinculación entre el genotipo y el fenotipo. Uno de estos fenómenos es la "interacción alélica"· la modificación de la funcionalidad de un producto génico por la presencia del producto del otro alelo o de un gen diferente. Las interacciones alélicas son significativas en la variabilidad de la expresión génica de las enfermedades de herencia dominante.

Otro fenómeno similar es la *epistasis*: se denomina así al "ocultamiento" de la expresión de un gen por la actividad de otro gen que participa en la misma cadena de reacciones ("camino metabólico"), pero que está localizado en una posición previa a la del gen que queda oculto (el llamado gen hipostático) Ambos tipos de fenómenos son mejor explicados al exponer los errores congénitos del metabolismo.

Relevancia de las enfermedades mendelianas

Aunque cada alteración patológica mendeliana es rara individualmente en la población, su número global es considerable y siguen descubriéndose nuevas mutaciones, por lo cual la presencia de alguna de ellas en un grupo humano no es improbable.

Los cuadros 9-4 y 9-5 resumen unos pocos ejemplos de enfermedades mendelianas típicas. En 2007, el catálogo de enfermedades mendelianas de McKusick (MIM) registró unos 4.400 fenotipos con alteraciones moleculares comprobadas y otros 2.100 con herencia monogénita sospechada.[51]

Cuadro 9-5. Enfermedades de herencia autosómica recesiva (ejemplos)

Enfermedad	Prevalencia	Características
Hiperpiasia adrenal congénita	1:50 a 5.000 según grupo	Comprende el 90% de los síndromes adrenogenitales. Defecto de la 21-hidroxilasa. Virilización. Pérdida de sal
Albinismo oculocutáneo	1·10.000 a 35.000 según grupo	Iris rosado, piel y cabello blancos. Tirosinasa negativa
Fenilcetonuria	1:5000 a 50.000 según grupo	Déficit de fenilalanina-hidroxilasa. Retardo mental
Anemia falciforme	1·1.800 (raza negra)	Hemoglobina S. Anemia, crisis vasculares
Talasemias	Muy variable	Variadas hemoglobinas anormales. Hepatoesplenomegalia, ictericia, anemia
Galactosemia	1:47.000	Déficit de Gal-1P-uridil transferasa (GALT). Vómitos, desnutrición
Tesaurosis (varias)	Variables	Acumulación tisular de sustancias: glucógeno, lípidos
Enfermedad de Tay-Sachs	1:5.000 (judíos)	Gangliosidosis de tipo I. Retardo mental

RESUMEN

Las enfermedades originadas en el material genético (enfermedades genéticas) se clasifican en tres grupos principales: *enfermedades monogénicas mendelianas*, con herencia mendeliana típica; *enfermedades de herencia multifactorial*, que poseen una incidencia familiar más alta que lo usual en la población y en las cuales intervienen factores desencadenantes adicionales del ambiente, y las *cromosomopatías* o alteraciones cromosómicas, generalmente no heredables y en las cuales los cromosomas o partes visibles de ellos están alterados. Un cuarto grupo accesorio de enfermedades genéticas está formado por las enfermedades genéticas mitocondriales y las derivadas de una alteración de la impronta genómica. En el primer grupo se distinguen las de herencia autosómica *dominante*, en las que el *heterocigota* expresa la mutación sin importar el *alelo* restante, y las de herencia *recesiva*, que para expresarse precisan la ausencia del alelo normal. La variable *penetrancia* (0 a 100%) de los genes contribuye a complicar la interpretación de los patrones de herencia, cuando se analizan sólo los rasgos exteriores.

Un ejemplo típico de herencia autosómica dominante es el de la enfermedad poliquística renal dominante, ocasionada por las mutaciones de los genes de las poliquistinas 1 y 2. Otros ejemplos son la acondroplasia y la neurofibromatosis 1. Un grupo particular de enfermedades monogénicas son las originadas en la expansión de trinucleótidos repetidos, o mutaciones dinámicas. Entre estas enfermedades por mutaciones dinámicas sobresalen las enfermedades neurodegenerativas originadas por expansiones de tripletes CAG, que también se denominan enfermedades de poliglutamina. De estas últimas la enfermedad o corea de Huntington tiene especial relevancia. Además de la dominancia, esta enfermedad exhibe la *anticipación* en generaciones sucesivas (aparición cada vez más temprana de la enfermedad con el paso de generaciones). La enfermedad de Huntington afecta especialmente el cuerpo estriado y da síntomas extrapiramidales (corea); se debe a un aumento, por encima de un umbral (35 tripletes CAG), de las repeticiones CAG codificantes de glutamina en el primer exón del gen. Es factible detectar la mutación por examen del ADN, y los exámenes poblacionales muestran que la raza blanca es la más afectada. La dominancia de la huntingtina anormal se debe a la *ganancia de una función*, que es de efecto tóxico para las neuronas espinosas medias. La *neurofibromatosis 1* también muestra dominancia, pero por un mecanismo diferente: la célula normal necesita dos alelos para producir la *neurofibromina* supresora de crecimiento anormal. El gen de la neurofibromina (*NF-1*) está en el cromosoma 17, es de gran tamaño (60 exones) y posee una de las más elevadas tasas de mutación. La neurofibromina pertenece al grupo de proteínas activadoras de GTPasa y su mutación provoca *insuficiencia haploide*.

Las mutaciones recesivas son ejemplificadas por la *enfermedad fibroquística*, debida a mutaciones del canal de cloro específico (regulador transmembranoso de la fibrosis quística, *RTFQ*). Con sólo un 6% del canal normal las células no se alteran, de ahí su recesividad, porque con un alelo normal sobra para desempeñar la función de manera correcta. Esta enfermedad muestra *pleiotropía* (variedad de órganos afectados) así como la *variabilidad de expresión* dada por las numerosas mutaciones diferentes, aunque la *delta-F-508* abarca casi el 70% de pacientes; la patogenia de la enfermedad ilustra sobre el complejo camino de determinación del fenotipo. Los albinismos son trastornos genéticos de la pigmentación que muestran un tipo de herencia recesiva. Se clasifican en albinismo oculocutáneo (AOC) y albinismo ocular (AO). En el albinismo más común (*oculocutáneo IA*), generalmente debido a mutaciones de la tirosinasa, este gen puede interactuar con la función de otros genes para llegar finalmente a determinar un tipo de hipopigmentación. La *retinitis pigmentaria* es un ejemplo de heterogeneidad genética notable puesto que puede ser causada por lo menos por 53 genes de muy diversas características. Las enfermedades monogénicas mendelianas, individualmente raras, son muy numerosas (más de 4.400 catalogadas) y son las más características de las enfermedades hereditarias.

REFERENCIAS

1 Kumar D. Disorders of the genome architecture: a review. Genomic Med 2008;2:69-76.

2. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. J Med Investigation 2008;55:174-182.

3. Wilson, PD. Polycystic kidney disease. New Eng J Med 2004;350:151 164.

4. Chapman AB. Autosomal dominant polycystic kidney disease: Time for a change? J Am Soc Nephrol 2007·18:1399-1407

5. Grantham JJ. Autosomal dominant polycystic kidney disease. New Eng J Med 2008;359:1477 1485.

6. Wilson PD. Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis. J Biochem Cell Biol 2004;36:1868-1873.

7 Fraile Gómez P Corral Moro E, García-Cosmes P y cols. Análisis genético (PKD2) de la poliquistosis renal autosómica dominante. Nefrología 2009;29:562-568.

8. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last three years. Kidney Int 2009;76:149-168.

9. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. Lancet 2007;363:1287 1361

10. Jones KL. Smith's recognizable patterns of human malformation. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1997 p.4.

11 Martínez-Frías ML, de Frutos CA, Bermejo E, ECEMC Working Group, Nieto MA. Review of the recently defined molecular mechanisms underiying thanatophoric dysplasia and their potential therapeutic implications for achondroplasia. Am J Med Genet Part A 2010;152A:245–255.

12. Orioli IM, Castilla EE, Scarano G, Mastroiacovo P Effect of paternal age in achondroplasia, thanatophoric dysplasia, and osteogenesis imperfecta. Am J Med Genet 1995 Nov 6;59(2):209-17

13. Pauli RM, et al. Homozygous achondroplasia with survival beyond infancy. Am J Med Genet 1983;16:459-73.

14 Velinov M, Slaugenhaupt SA, Stoilov I, Scott CI, Gusella JF Tsipouras P The gene for achondroplasia maps to the telomeric region of chromosome 4p. Nature Genet 1994; 6:312-317

15. Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI, Hecht JT Horton WA, Machado M, et al. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. Amer J Hum Genet 1995; 56:368-373.

16. Wilkie AOM, Morris-Kay GM, Jones EY, Heath JK. Functions of fibroblast growth factors and their receptors. Current Biol 1995; 5:500-507

17 De Frutos CA, Vega S, Manzanares M, Flores JM, et al. Snail1 is a transcriptional effector of FGFR3 signaling during chondrogenesis and achondroplasia. Dev Cell 2007·13:872-883.

18. Kovtun IV, McCurray CT. Features of trinucleotide repeat instability in vivo.Cell Res 2008;18:198-213.

19. Bauer PO, Nukina N. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. J Neurochem 2009;110:1737 1765.

20. Squitieri F Gellera C, Cannella M, et al. Homozygsity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. Brain 2003;126:946-955.

21 Weigell-Weber M, Schmid W, Spiegel R. Psychiatric symptoms and CAG expansion in Huntington´s Disease. Am J Med Genet 1996;67:53-57

22. The Huntington Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington disease chromosomes. Cell 1993;72:971-983.

23. Cummings CJ, Zoghbi HY. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. Ann Rev Genomics Hum Genet 2000;1:281-328.

24. Caviston JP Holzbaur ELF Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. Trends Cell Biol 2009; 19:147 155.

25. Myers RH. Huntington´s disease genetics. Neuro Rx 2004;1:255-262.

26. Ranen NG, Stine OC, Abbott, MH. et al. Anticipation and instability of IT 5 (CAG)n repeats in parent-offspring pairs with Huntington´s disease. Am J Hum Genet 1995;57:593-602.

27 Walker FO. Huntington's disease. Lancet 2007;369:218-228.

28. Rubinztein DC, et al. Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. Nature Genet 1994;7:525-530.

29. Brinkman RR, Mezei MM, Theilmann J, Almqvist E, Hayden MR. The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. Am J Hum Genet 1997· 60:1202-1210.

30. Perutz MF Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. Current Op Structural Biol 1996; 6:848-858.

31 Paulson HL. Human Genetics'99: Trinucleotide repeats. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis) fold. Am J Hum Genet 1999;64: 339-345.

32. Bithell A, Johnson R, Buckley NJ. Transcriptional dysregulation of coding and non-coding genes in cellular models of Huntington´s disease. Biochem Soc Trans 2009;37·1270-1275.

33. Greenmyre JT. Huntington´s disease- Making connections. New Eng J Med 2007;356:518-520.
34. Zhou H, Cao F Wang Z, et al. Huntingtin forms toxic NH2-terminal fragment complexes that are promoted by the age –dependent decrease in proteasome activity. J Cell Biol 2003;163:109-118.
35. Riccardi VM. Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis, 2nd edition, Baltimore: John Hopkins University Press; 1992.
36. Ferner RE. Neurofibromatosis 1 Europ J Hum Genet 2007·15:131 138.
37 Upadhyaya M, Sahw DJ, Harper PS. Molecular basis of neurofibromatosis type 1 (NF-1): mutation analysis and polymorphisms in the NF-1 gene. Human Mutat 1994;4:83-101
38. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, et al. Neurofibromatosis type I revisited. Pediatrics 2009;123:124-133.
39. Ratjen FA. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. Resp Care 2009; 54:595-604.
40. Davies JC, Alton EW, Bush A. Cystic fibrosis. BMJ 2007;335(7632):1255-1259.
41 Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. Science 1992;256:774-779.
42. Denning GM, Anderson PM, Amara JF Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. Nature 1992;358:761-764.
43. Dean M, Santis G. Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CTFR gene mutations. Hum Genet 1994;93:364-368.
44. Chertkoff L, Visich A, Bienvenu T Grenoville M, Segal E, Carniglia L, et al. Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. Clin Genet 1997;51:43-37
45. Zielenski J, Tsui L-C. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Ann Rev Genet 1995;29:777-807
46. Proesmans M, Vermeulen F De Boeck K. What´s new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction f the basic defect. Eur J Pediatr 2008;167:839-849.
47 Gronskov K, Jakob EK, Brondun-Nielsen K. Oculocutaneous albinism. Orphanet J Rare Dis 2007 Nov 2;2:43.
48. Bassl MT Schaffino MV, Renieri A, De Nigris F Galli L, Bruttini M, et al. Cloning of the gene for ocular albinism tipe 1 from the distal short arm of the X chromosome. Nature Genet 1995;10:13-19.
49. Sturm RA, Larsson M. Genetics of human iris colour. Pigment Cell Melanoma Res 2009;22:544–562.
50. Daiger SP Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. Arch Ophthalmol 2007·125(2):151 158.
51 McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man and Its Online Version, OMIM. Am J Hum Genet 2007;80:588-604. (OMIM: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM).

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Buyse ML (ed.). Birth defects encyclopedia. Center for Birth Defects Information Services, Inc., Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Vols. I-II 1990.

Childs B & Valle D. Genetics, biology, and disease. Annu Rev Genomics Hum Genet 2000;1·1-20.

Oti M, Brunner HG. The modular nature of genetic diseases. Clin Genet 2007;71·1 11

Capítulo 10

Determinación sexual y cromosomas sexuales

La determinación sexual como proceso del desarrollo: conmutación hacia el camino masculino o el femenino. Niveles fenotípicos de asignación del sexo. La gónada indiferenciada y su diferenciación. Morfología, comportamiento y contenido génico de los cromosomas sexuales. El gen determinante de testículo (SRY), el gen SOX9, el gen de HAM y el de RA. Genes del desarrollo ovárico. Alteraciones genéticas de la determinación sexual. Hombres XX y mujeres XY. Hermafroditas verdaderos

INTRODUCCIÓN

Uno de los rasgos fenotípicos que más fácilmente se relacionan con la herencia, y por ende con el genotipo, es el sexo. Sin embargo, la relación entre el genotipo y el sexo, con todos sus aspectos, no es una relación simple, como se creyó durante la mayor parte del siglo XX. La presencia o ausencia de un *cromosoma sexual* (cromosoma con características especiales que lleva genes relacionados con el sexo) no es, como se creía previamente, el mecanismo único, universal y necesario para la determinación del fenotipo sexual. El fenotipo sexual más importante desde un punto de vista biológico es el tipo de gónada (ovario o testículo), y la gónada se establece durante el desarrollo embrionario, de modo que la determinación genética del sexo implica un *desarrollo embrionario específico* y, como tal, comparte características de otros procesos de desarrollo: la existencia de cascadas reguladoras de desarrollo, donde un cierto proceso génico precede y determina el siguiente. Además, el desarrollo gonadal presenta una importancia vital para la especie: la gónada debe ser fértil y lleva un linaje especial de células, la línea germinal, única capaz de entrar en *meiosis* y producir gametos. Adicionalmente, la determinación sexual, en los mamíferos, se relaciona con un proceso que ocurre en uno de los cromosomas sexuales (el X) y que da lugar al fenómeno de "compensación de dosis génica", particular de los mamíferos con inclusión del ser humano. Por último, la especie humana, como todos los vertebrados, posee una gónada primitiva con potencialidad bisexual, es decir que en su historia evolutiva el carácter inicial del fenotipo sexual es hermafrodita.[1] Sucesivas especializaciones en el curso de la evolución biológica han determinado el mecanismo usual de una opción entre una gónada masculina y una femenina.

Estos conceptos son los que en la actualidad llevan a considerar al gen *SRY* del cromosoma Y humano como el "gen conmutador del sexo", que escoge el camino de desarrollo testicular (estando también presente en el genoma el camino de desarrollo ovárico) El gen *SRY* a su vez actúa a través de una cadena génica, necesaria para el desarrollo masculino. Si no se encuentran el gen *SRY* y sus genes dependientes (o funcionan anor-

malmente), el camino de desarrollo de la gónada femenina es automático *por defecto* ("default"), aunque hay situaciones en que la "opción" masculino/femenino se frustra total o parcialmente, dando el hermafroditismo humano verdadero (que es raro), con tejidos ovárico y testicular presentes simultáneamente en el mismo individuo.

Los genes sexuales, a su vez, influyen poderosamente en la organización de los cromosomas sexuales. Una de sus características, en la especie humana, es la presencia del gen *XIST* en el cromosoma X, que determina la formación del corpúsculo de Barr o cromatina sexual, y que funcionalmente determina la compensación de dosis génica y, desde el punto de vista evolutivo, la conservación del grupo de ligamiento del X.

Por otra parte, el cromosoma Y humano está altamente especializado y contiene un grupo de genes relacionado con la funcionalidad de la espermatogénesis, es decir con la fertilidad masculina.

Finalmente, el fenómeno de "impronta génica" ("imprinting") produce diferencias funcionales entre el genoma proveniente de una meiosis femenina y aquél proveniente de una meiosis masculina, con lo cual el fenotipo sexual y el genotipo quedan vinculados orgánicamente en su totalidad, haciendo que sea inviable el desarrollo embrionario con el genoma proveniente de un solo progenitor.

En una crónica brevísima de los estudios de determinación sexual, puede señalarse que el fisiólogo francés André Jost demostró en la década de 1940 que la presencia de una gónada masculina en el embrión determina la masculinización del aparato genital, mientras que en ausencia de gónadas, se desarrolla *por defecto* un aparato genital femenino;[2] en 1959, citogenetistas ingleses descubrieron que las personas con cromosomas sexuales X-0 eran mujeres con síndrome de Turner, y los que poseían XXY eran varones (con síndrome de Klinefelter ,[3,4] demostrando que el sexo en la especie humana depende de la presencia del cromosoma Y; en los años 1970-1980 investigadores argentinos comprobaron que los cromosomas humanos X e Y tenían una región común u homóloga, por la cual recombinan, y segmentos *diferenciales* que contienen genes relativos al sexo;[1] en 1990-1991 investigadores ingleses clonaron el gen *SRY* y demostraron que es necesario y suficiente para la formación de testículo;[1] y entre 2006 y 2009 se demostró finalmente el mecanismo de acción del gen *SRY* y se descubrieron los genes de desarrollo del ovario.[5]

Fenotipo sexual y criterios de asignación del sexo

Respecto de la sexualidad humana, en Medicina es necesario discriminar los diversos niveles en los cuales puede adjudicarse el sexo a una persona. Si bien el fenotipo sexual biológico más importante es el *sexo gonadal*, desde el punto de vista médico el fenotipo sexual esencial es el *sexo psicológico* ("orientación sexual") que en la enorme mayoría de los casos se corresponde con el *sexo de crianza*.

Es conveniente que al tratar el tema científico de la determinación sexual se excluyan las connotaciones extracientíficas que frecuentemente lo distorsionan frente al público no informado. Si en un paciente con una personalidad equilibrada y en buena interacción con el ambiente social que lo rodea existe una desarmonía entre su sexo psicológico y alguno de los otros niveles de fenotipo sexual, el primero es el prioritario en la asistencia médica. Son casos ejemplificadores los del *síndrome de feminización testicular*, en los cuales el sexo cromosómico, génico y gonadal son absolutamente masculinos, pero los genitales externos, los caracteres sexuales secundarios, el sexo de crianza y el sexo psicológico son femeninos, y la resección de la gónada (testículo) está indicada especialmente por el riesgo de un desarrollo tumoral. En otro extremo, las variaciones de la orientación sexual usual (homosexualidad y otras), en las cuales no existe ninguna alteración original en los demás niveles del fenotipo sexual, no corresponden al área de la Genética Médica, sino a las áreas de la Psicología, la Psicología Médica y las Ciencias Humanas.

Pueden distinguirse niveles sucesivos en el fenotipo sexual, con ciertas superposiciones (cuadro 10-1).[6]

Cuadro 10-1. Niveles de asignación del fenotipo sexual y el sexo génico en la especie humana

Categoría	Tipo	Características
Sexo génico	Gen *SRY*+ Gen *SRY*–	Diagnóstico por métodos de Genética Molecular (Southern, RCP)
Sexo cigótico o cromosómico	XY XX	Presente desde la fecundación
Sexo cromatínico	+ –	Presencia o ausencia del corpúsculo de Barr· no usado actualmente en clínica
Sexo cariotípico	46,XY 46,XX Variantes	Análisis de rutina en clínica (cultivo de linfocitos)
Sexo gonadal	Testículo Ovario Hermafroditas	Presente desde el 2º mes de desarrollo; análisis por laparoscopia y biopsia
Sexo ductal (conductos genitales)	C. de Wolff C. de Müller	Exploración de la pelvis
Sexo genital externo	Masculino (M) Femenino (F) Variantes (seudohermafroditismos)	Inspección, diagnóstico por imágenes
Caracteres sexuales secundarios	Masculinos Femeninos	Hormonodependientes, pospuberales: vello, masas musculares, laringe, desarrollo mamario, etc.
Sexo de asignación	Legal	Asignado civilmente, al nacer
Sexo de crianza	M o F	Fundamentalmente por la relación materna y paterna en la primera infancia
Sexo psicológico	M, F o variantes	Factores ambientales: crianza y ambiente; factores biológicos

Homologías embrionarias de los sexos en la especie humano

Tal como dijimos antes, en la especie humana la gónada primitiva es "indiferenciada", es decir que no presenta caracteres particulares para un sexo. La diferenciación de esta gónada primitiva comienza en la séptima semana de desarrollo en la especie humana (embriones de 15-19 mm, 44-48 días),[7] cuando el embrión posee el gen *SRY*, que determina la "conmutación" hacia el sexo masculino, esto es, la diferenciación hacia testículo. Si el embrión no posee el gen *SRY*, la gónada indiferenciada comienza a mostrar signos de diferenciación hacia ovario alrededor de la novena semana del desarrollo, o sea que el *SRY* determina un proceso más temprano. Los primeros signos de la diferenciación hacia testículo consisten en la diferenciación de las células de pre-Sertoli, que aparecen como células con capacidad secretora; luego existe una diferenciación morfológica. la formación de esbozos de tubos seminíferos macizos (sin luz) en los que las células de pre-Sertoli rodean a los gonocitos, englobándolos en los esbozos. Si la gónada primitiva se diferencia hacia ovario, los gonocitos, luego de varios ciclos de replicación, son rodeados parcialmente por células del estroma que constituyen los antecesores de las células foliculares, y luego comienzan a entrar en la profase meiótica.

La diferenciación de la gónada primitiva, a su vez, determina el destino de los ductos genitales (de Wolff y de Müller) y de los genitales exter-

Cuadro 10-2. Homologías de órganos y estructuras masculinas y femeninas

	Masculino	Femenino
Gónada	Célula de Leydig Célula de Sertoli Espermatogonias Rete testis	Célula intersticial Célula folicular ovárica Ovogonias (ovario embrionario) Rete ovárica
Conductos	Epidídimo Conducto deferente Hidátide testicular	Epoóforo Conducto de Gartner Trompas, útero y un tercio superior de vagina
Genitales externos	Pene Cuerpo esponjoso Escroto Próstata Glándula de Cowper Utrículo prostático	Clítoris Labios menores Labios mayores Glándulas de Skene (parauretrales) Glándulas de Bartholin Dos tercios de vagina

nos. En el cuadro 10-2 se indican las homologías en los dos sexos de los derivados de los conductos y de los genitales externos, además de las homologías gonadales (fig. 10-1)

Diferenciación de la gónada primitiva: conceptos generales

Las etapas iniciales de la diferenciación de la gónada primitiva han sido estudiadas principalmente en la rata[8] y en el ratón.[9,10] Una de las primeras evidencias de la diferenciación de la gónada (hacia testículo) es el desarrollo de un retículo endoplasmático con secreción en las células que se convierten en células de pre-Sertoli, dentro de la masa de células somáticas que forman la parte central de la gónada indiferenciada, y cuyo origen no está bien determinado (se discute si provienen del epitelio celómico o del mesénquima del mesonefros).[9] Otro indicador

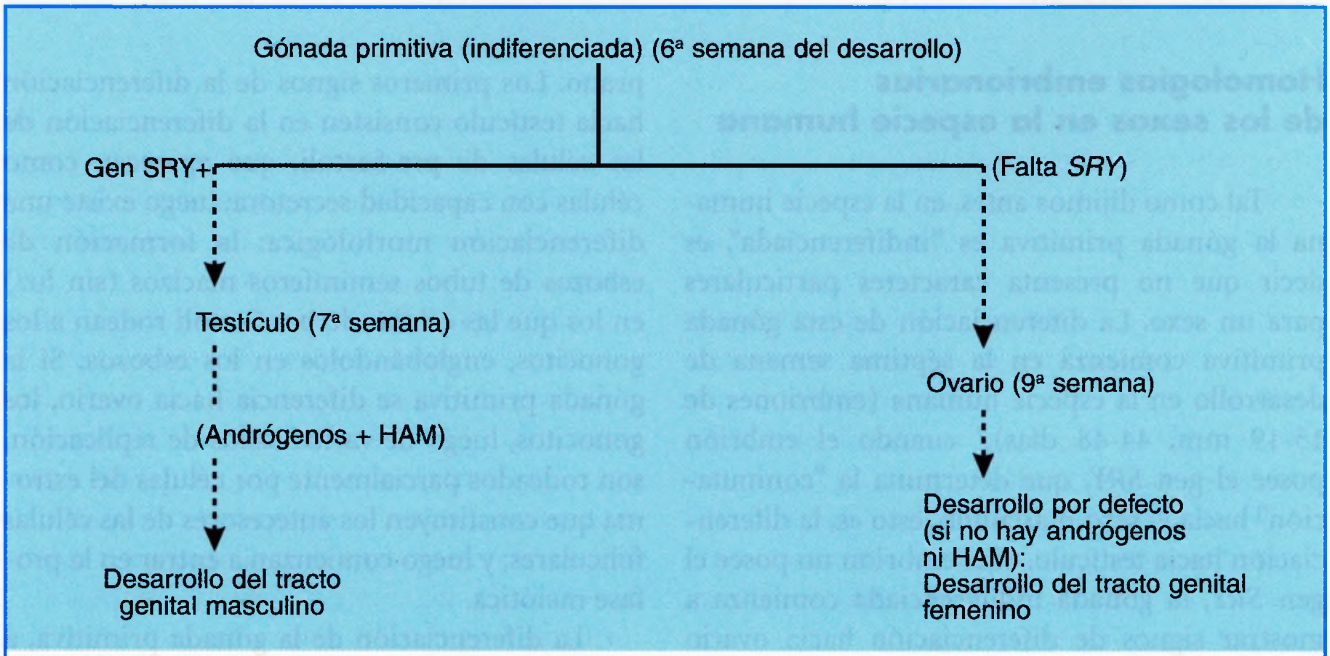


Fig. 10-1 Esquema general del desarrollo embrionario sexual humano. HAM: hormona antimülleriana.

de la diferenciación hacia testículo es la invasión de mesénquima y células endoteliales en esta masa celular de la gónada primitiva, que delimita un estroma de cordones seminíferos primitivos.[9] El gen *SRY* (*Sry* en el ratón) se expresa (se transcribe) justamente 24 horas antes (en el ratón, día 10,5 p.c.) de que se observen los primeros signos de diferenciación de células de Sertoli,[10] y lo hace en la gónada primitiva, en las células precursoras de Sertoli. Estas células se reclutan casi exclusivamente entre aquellas que contengan el cromosoma Y, en el caso de animales quimeras XX XY.[11] Estas observaciones se integran en la teoría más aceptada. que el gen *SRY* al actuar localmente (y no a través de la secreción de un producto que pase al espacio intercelular) determina la diferenciación de las células de Sertoli, y mediante este primer paso se desencadenan otros pasos menos conocidos que llevan a la constitución del testículo. Una evidencia muy importante que apoya esta teoría es la formación del testículo en ratones genéticamente hembras (con cromosomas XX), a los que se les insertó tempranamente (en el cigoto) el segmento de ADN con el gen *Sry*, es decir ratones *transgénicos* para un fragmento de ADN que contiene este gen.[12] Las células germinales (gonocitos) que se originan en la región basal de la alantoides[13] y, mediante su capacidad de movimiento ameboide, migran hasta llegar a la gónada primitiva, a la cual colonizan, no intervienen en la determinación primaria de la gónada indiferenciada. Esto se ha deducido de la observación de mutantes tales como el "moteado blanco" (W) del ratón, en el cual la migración de los gonocitos se inhibe y las gónadas carecen de células germinales, aunque se diferencian en sentido testicular u ovárico de acuerdo con la presencia o la ausencia, respectivamente, del gen *SRY*; además, la aniquilación selectiva de los gonocitos con busulfán en embriones no inhibe la diferenciación gonadal hacia un sexo o el otro.[9] Es decir que el factor conmutador del sexo (*SRY*) no actúa por medio de células germinales sino de células somáticas, y exclusivamente en estas últimas.

Sin embargo, aparte de su acción determinante del sexo gonadal, el gen *SRY* puede tener otras funciones, puesto que su transcripción se detecta en espermatogonias y espermatocitos del testículo adulto y, en menor grado, en las células de Sertoli adultas.[14] Esta función no es completamente conocida, pero dadas las características del gen, podría ser de regulación inhibitoria (véase más adelante) en procesos de las células germinales del adulto, es decir que el producto SRY tiene dos tipos de funciones: activador (a través de un gen "blanco"o "diana") de la diferenciación de las células de Sertoli, y además tiene otras funciones, de tipo represivo.

Origen y características de las células germinales (gonocitos)

Las células germinales primitivas (CGP) o gonocitos son el conjunto de células especialmente diferenciadas en el embrión temprano para llevar a cabo la meiosis y producir finalmente gametos. Estas células no son totipotenciales, como las primeras cuatro blastómeras, en el sentido de que pueden generar un individuo, sino que poseen características de células *troncales* (con amplia capacidad divisional) y son las únicas capaces de ingresar en el proceso meiótico. Esta última característica podría estar ligada a su recepción de un material citoplasmático especial del ovocito, un material fibrogranular que constituye la llamada "nube" o "nuage"[15]

Los gonocitos son células grandes, con abundantes polirribosomas y expansiones citoplasmáticas relacionadas con su capacidad de movimiento ameboide, que dan intensamente positiva la reacción de la fosfatasa alcalina y por ella pueden ser identificadas, así como por anticuerpos contra teratocarcinoma.

El linaje de las CGP proviene del epiblasto o ectodermo primitivo, y pueden identificarse inicialmente en el mesodermo de la base de la alantoides (fig. 10-2) Se ha comprobado que los gonocitos femeninos (XX), al igual que las espermatogonias del testículo, poseen la propiedad de formar puentes intercelulares, que en el ovario embrionario desaparecen cuando empiezan a formarse los folículos; estos puentes y los de las cohortes celulares espermatogénicas, dependen del gen *TEX14*.[16]

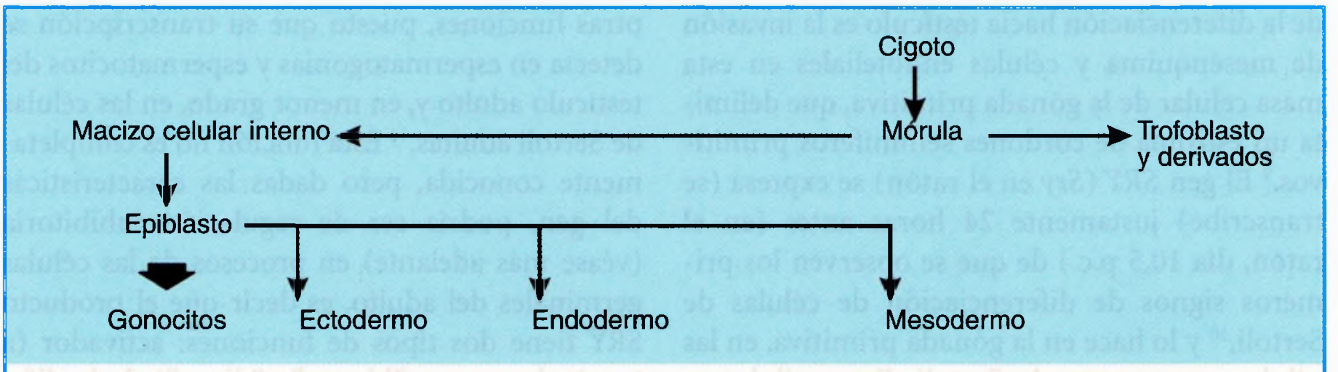


Fig. 10-2. Linaje de las células germinales primitivas.

La gónada humana indiferenciada y su diferenciación

El desarrollo sexual humano puede dividirse en cuatro estadios: a) el pregonadal, b) el de gónada indiferenciada, c) el de diferenciación sexual primaria (gonadal) y d) el de diferenciación sexual secundaria (conductos, genitales externos, etc.) El pregonadal va desde el cigoto hasta la constitución de las crestas gonadales y se caracteriza por la diferenciación del linaje de gonocitos. El segundo comienza con la formación de las crestas gonadales por un espesamiento y proliferación de las células del epitelio celómico a ambos lados de los esbozos de los grandes vasos abdominales, y dura de 7 a 10 días.[17] Los gonocitos realizan una larga migración desde la alantoides y el saco vitelino a los vasos y finalmente se ubican mayoritariamente en las crestas gonadales. En algunos casos los gonocitos quedan en otros órganos o esbozos (como en la adrenal) donde finalmente degeneran.

En la sexta semana, la gónada indiferenciada está formada en ambos sexos por células del epitelio celómico, mesénquima y gonocitos. El origen de las células epiteliales no germinales no está definido, aunque hay evidencia de que se diferencian del mesénquima, y éste proviene probablemente del esbozo del mesonefros. Entre el final de la sexta y la séptima semanas, si el embrión es de sexo masculino, en la gónada aparecen las células de Sertoli, que engloban a los gonocitos y forman los cordones sexuales testiculares macizos. En la gónada masculina los gonocitos son inhibidos de entrar en meiosis, pero no se conoce bien el mecanismo de esta inhibición, aunque hay evidencias que sugieren que hay una diferencia entre el entorno de los gonocitos femeninos (XX), donde se activaría la secreción de ácido retinoico (AR) y la de los masculinos, donde la secreción de AR estaría inhibida y, en consecuencia, la entrada en meiosis de los gonocitos en la gónada masculina estaría frenada.[18] El ácido retinoico es un poderoso agente morfogenético en el embrión temprano, y en los gonocitos femeninos parece ser capaz de activar genes meióticos. Las células de Leydig aparecen a partir de la octava semana. Ambos tipos celulares (Sertoli y Leydig) comienzan una activa secreción hormonal en el embrión temprano; las células de Leydig disminuyen luego de la semana 14 y, sobre todo, en la época perinatal.

Como se mencionó antes, si el embrión es de sexo femenino, empiezan a ocurrir cambios morfológicos alrededor de la novena semana, con englobamiento parcial de gonocitos por células foliculares. En la 12ª semana hay un incremento de mitosis en los gonocitos (ovogonias) y se observan folículos primordiales definidos en la semana 13. El número de gonocitos ováricos es máximo entre las semanas 16 y 20, y luego disminuye. Comienzan a aparecer ovocitos en leptoteno en las zonas profundas entre las semanas 11 y 12, hay un máximo de ovocitos en paquiteno al quinto mes (semanas 20-26) y el máximo de diplotenos se encuentra entre las semanas 35 a 40.[19] A diferencia del testículo embrionario, que es muy activo en secreción

hormonal de HAM y de andrógenos, el ovario embrionario y fetal parece muy poco activo en este aspecto: no hay producción significativa de hormonas esteroideas[17] en los primeros seis meses (aunque hay actividad de aromatasa) y carece de receptores para las gonadatrofinas FSH y HCG, por lo cual se piensa que hay un "silencio" hormonal del ovario en estos estadios.

Diferenciación sexual secundaria (posgonadal) de conductos y genitales externos

La gónada primitiva en ambos sexos está acompañada por dos sistemas de conductos: 1) los conductos *mesonéfricos* o de Wolff, que circulan por el interior del mesonefros y luego hasta la cloaca y 2) los conductos *paramesonéfricos* o de Müller, externos al mesonefros y que siguen un recorrido paralelo al de los conductos de Wolff y luego los cruzan ventralmente para unirse con su homólogo del lado opuesto (fig. 10-3)

El desarrollo y destino de los conductos genitales depende de la diferenciación de la gónada. Si la gónada es masculina, los conductos de Wolff se desarrollan ampliamente y los conductos de Müller desaparecen casi por completo; si la gónada es femenina (o si no hay gónada), los conductos de Müller se desarrollan ampliamente y los de Wolff quedan reducidos a vestigios. Estos cam-

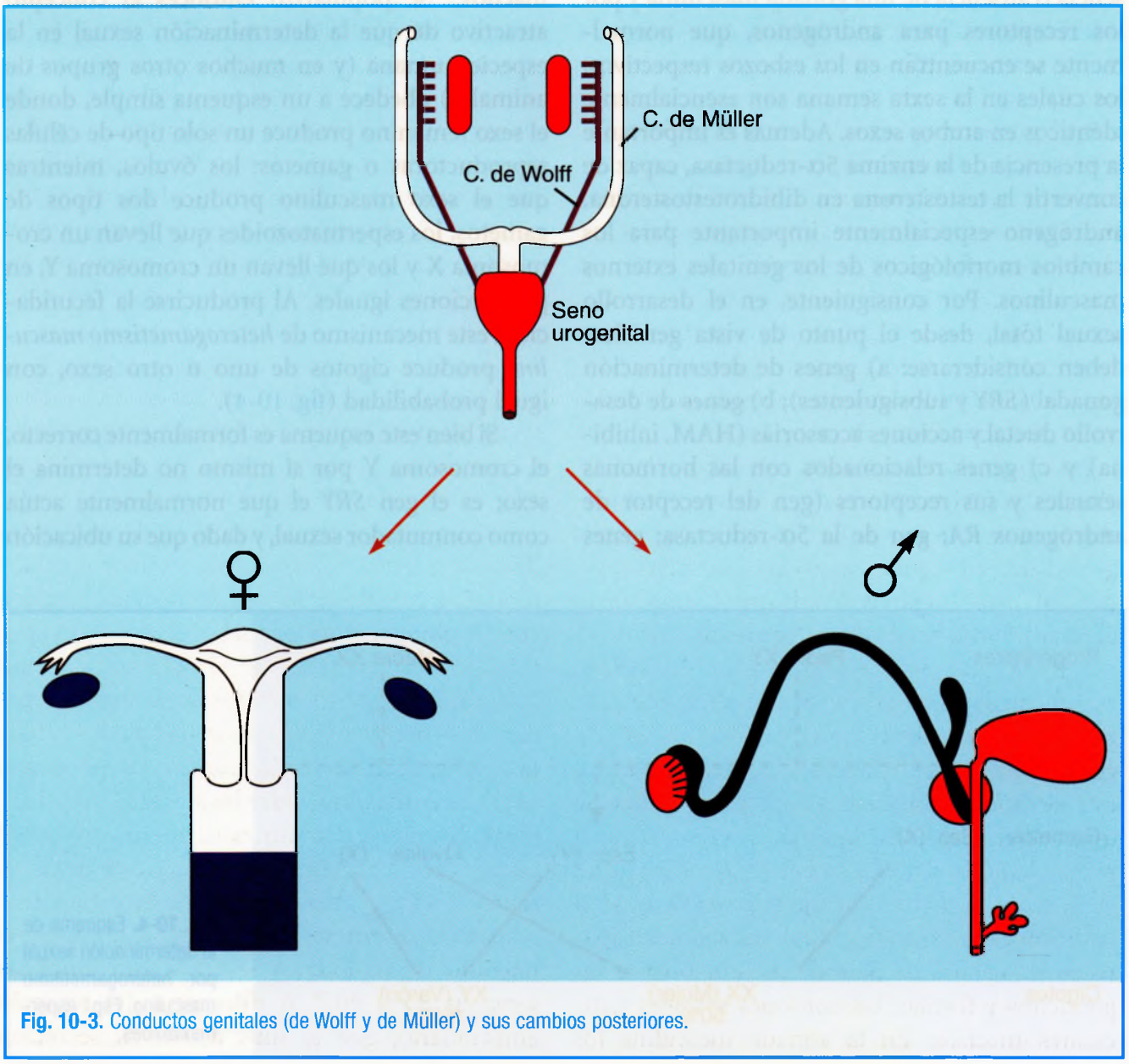


Fig. 10-3. Conductos genitales (de Wolff y de Müller) y sus cambios posteriores.

bios son inducidos por hormonas secretadas por la gónada masculina, que de esta manera determina el destino de los conductos (o en su ausencia, el desarrollo por "defecto" de tipo femenino) En el embrión masculino, los conductos de Wolff forman los conductillos eferentes, el epidídimo, las vesículas seminales, los conductos deferentes y los conductos eyaculadores; mientras que los conductos de Müller, afectados por la HAM, a la octava semana han desaparecido casi completamente, dejando sólo vestigios. En el embrión femenino, los conductos de Müller forman finalmente las trompas de Falopio, el útero y la porción superior de la vagina.

Finalmente, el desarrollo de los genitales externos también está determinado por la presencia o ausencia de una gónada masculina y por los receptores para andrógenos, que normalmente se encuentran en los esbozos respectivos, los cuales en la sexta semana son esencialmente idénticos en ambos sexos. Además es importante la presencia de la enzima 5α-reductasa, capaz de convertir la testosterona en dihidrotestosterona, andrógeno especialmente importante para los cambios morfológicos de los genitales externos masculinos. Por consiguiente, en el desarrollo sexual total, desde el punto de vista genético, deben considerarse: a) genes de determinación gonadal (*SRY* y subsiguientes), b) genes de desarrollo ductal y acciones accesorias (HAM, inhibina) y c) genes relacionados con las hormonas sexuales y sus receptores (gen del receptor de andrógenos *RA*, gen de la 5α-reductasa, genes reguladores de la esteroidogénesis: *FS1* y otros) Por ello, primero se expondrá el papel de los cromosomas sexuales en la determinación del sexo.

Cromosomas sexuales (X e Y) en la especie humana

Desde principios del siglo XX, con los trabajos de E. B. Wilson,[1] se determinó que existe una relación entre ciertos cromosomas con características especiales y el sexo, en insectos, y luego se extendió este concepto (relación entre "heterocromosomas" y sexo) a otros grupos de animales que incluyen a vertebrados, entre ellos los mamíferos, en los cuales las parejas de cromosomas sexuales son XX en las hembras y XY en los machos.[1] Se popularizó entonces el concepto atractivo de que la determinación sexual en la especie humana (y en muchos otros grupos de animales) obedece a un esquema simple, donde el sexo femenino produce un solo tipo de células reproductoras o gametos: los óvulos, mientras que el sexo masculino produce dos tipos de gametos: los espermatozoides que llevan un cromosoma X y los que llevan un cromosoma Y, en proporciones iguales. Al producirse la fecundación, este mecanismo de *heterogametismo masculino* produce cigotos de uno u otro sexo, con igual probabilidad (fig. 10-4)

Si bien este esquema es formalmente correcto, el cromosoma Y por sí mismo no determina el sexo; es el gen *SRY* el que normalmente actúa como conmutador sexual, y dado que su ubicación

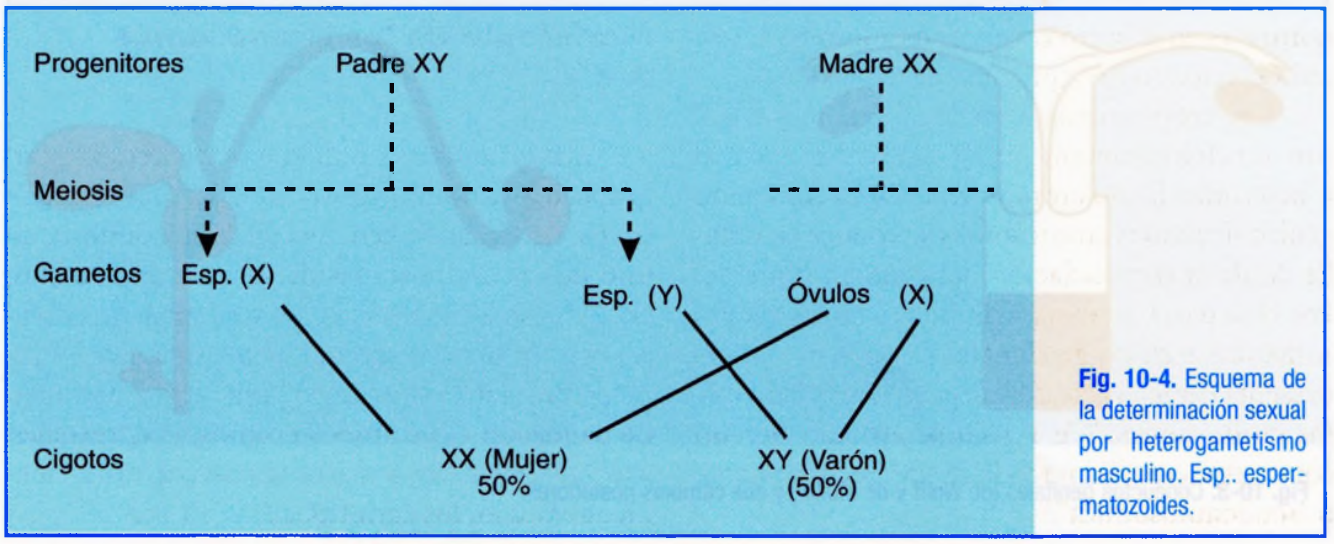


Fig. 10-4. Esquema de la determinación sexual por heterogametismo masculino. Esp.. espermatozoides.

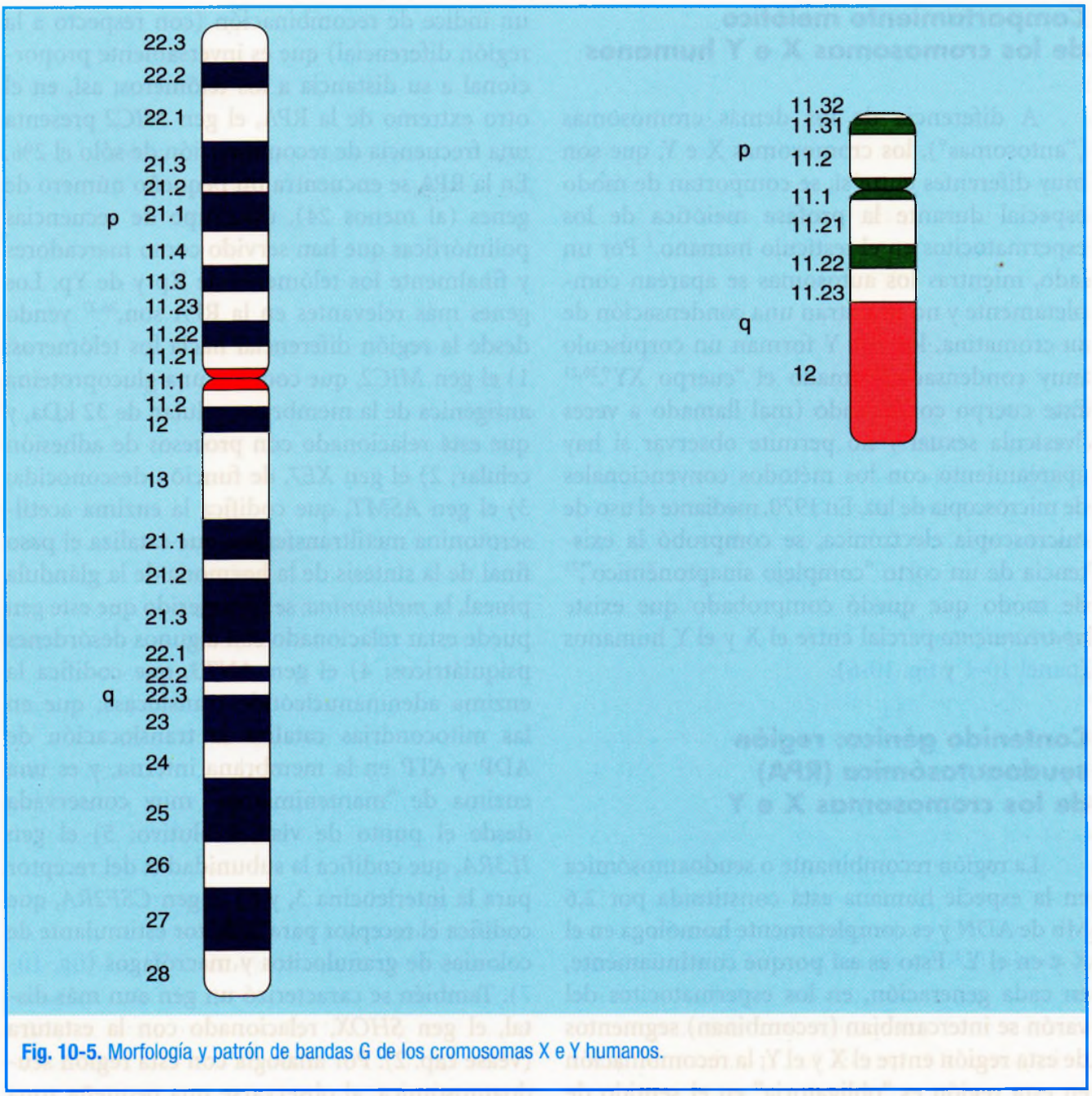


Fig. 10-5. Morfología y patrón de bandas G de los cromosomas X e Y humanos.

normal es en el brazo corto del cromosoma Y, este último actúa como representante del gen *SRY*

Los cromosomas sexuales humanos X e Y son morfológicamente muy diferentes entre sí ("heteromorfismo cromosómico") El contenido génico de ambos cromosomas se conoce en detalle desde la secuenciación del genoma humano. Por otra parte, su comportamiento en las células somáticas y en las germinales durante la meiosis presenta características muy peculiares, dado que los cromosomas X e Y sólo se aparean por un corto segmento, llamado la región recombinante o "seudoautosómica"[1]

Morfología de los cromosomas X e Y

El cromosoma X humano pertenece al tercer grupo del cariotipo (grupo C), de submetacéntricos de tamaño mediano. El Y, en cambio, es uno de los cromosomas de menor tamaño (los Nº 22 y Nº 21 son menores) y es subacrocéntrico, con un brazo largo que posee una gran zona heterocromática terminal ("Yqh") Los patrones de bandeado G de ambos cromosomas sexuales son característicos y permiten su identificación inequívoca en los cariotipos (fig. 10-5)

Comportamiento meiótico de los cromosomas X e Y humanos

A diferencia de los demás cromosomas ("autosomas"), los cromosomas X e Y, que son muy diferentes entre sí, se comportan de modo especial durante la profase meiótica de los espermatocitos en el testículo humano.[1] Por un lado, mientras los autosomas se aparean completamente y no muestran una condensación de su cromatina, los X e Y forman un corpúsculo muy condensado, llamado el "cuerpo XY"[20,21] Este cuerpo condensado (mal llamado a veces "vesícula sexual") no permite observar si hay apareamiento con los métodos convencionales de microscopia de luz. En 1970, mediante el uso de microscopia electrónica, se comprobó la existencia de un corto "complejo sinaptonémico",[21] de modo que quedó comprobado que existe *apareamiento* parcial entre el X y el Y humanos (panel 10-1 y fig. 10-6)

Contenido génico: región seudoautosómica (RPA) de los cromosomas X e Y

La región recombinante o seudoautosómica en la especie humana está constituida por 2,6 Mb de ADN y es completamente homóloga en el X y en el Y.[1] Esto es así porque continuamente, en cada generación, en los espermatocitos del varón se intercambian (recombinan) segmentos de esta región entre el X y el Y; la recombinación en esta región es "obligatoria" en el sentido de que siempre debe haber al menos una recombinación para formar gametos normales. La recombinación es máxima para la región subtelomérica de Xp e Yp, donde una secuencia marcadora, designada DXYS14 (que no corresponde a un gen, sino a ADN no codificante y que presenta polimorfismos), permitió comprobar la regularidad de esta recombinación X Y. Los polimorfismos de la secuencia DXYS14 recombinan con una frecuencia cercana al 50%.[25] Sin embargo, la recombinación puede producirse al azar en cualquier lugar de la región seudoautosómica (RPA) y, por ello, las secuencias que están más alejadas de los telómeros presentan un índice de recombinación (con respecto a la región diferencial) que es inversamente proporcional a su distancia a los telómeros; así, en el otro extremo de la RPA, el gen *MIC2* presenta una frecuencia de recombinación de sólo el 2%. En la RPA se encuentra un pequeño número de genes (al menos 24), un grupo de secuencias polimórficas que han servido como marcadores y finalmente los telómeros de Xp y de Yp. Los genes más relevantes en la RPA son,[26,27] yendo desde la región diferencial hacia los telómeros: 1) el gen *MIC2*, que codifica una glucoproteína antigénica de la membrana celular, de 32 kDa, y que está relacionado con procesos de adhesión celular; 2) el gen *XE7*, de función desconocida, 3) el gen *ASMT*, que codifica la enzima acetil serotonina metiltransferasa, que cataliza el paso final de la síntesis de la hormona de la glándula pineal, la *melatonina*; se ha sugerido que este gen puede estar relacionado con algunos desórdenes psiquiátricos; 4) el gen *ANT3*, que codifica la enzima adeninanucleótido translocasa, que en las mitocondrias cataliza la translocación de ADP y ATP en la membrana interna, y es una enzima de "mantenimiento" muy conservada desde el punto de vista evolutivo; 5) el gen *IL3RA*, que codifica la subunidad α del receptor para la interleucina 3, y 6) el gen *CSF2RA*, que codifica el receptor para el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (fig. 10-7) También se caracterizó un gen aun más distal, el gen *SHOX*, relacionado con la estatura (véase cap. 2). Por analogía con esta región seudoautosómica, al observarse una pequeña zona similar en los extremos distales de los brazos largos del X y del Y, se la denominó segunda región seudoautosómica (RPAII) Esta RPAII es muy pequeña (ocupa 0,33 Mb), tiene sólo 5 genes y recombina con una frecuencia mucho menor (alrededor de 100 veces menos), por lo cual no se puede observar una sinapsis de los X e Y en esta RPAII[27]

Contenido génico del cromosoma Y

El cromosoma Y humano es pequeño (su longitud es el 2,15% del largo total del conjunto haploide de cromosomas),[1] y contiene aproxi

Panel

Panel 10-1 El cuerpo XY de los espermatocitos humanos

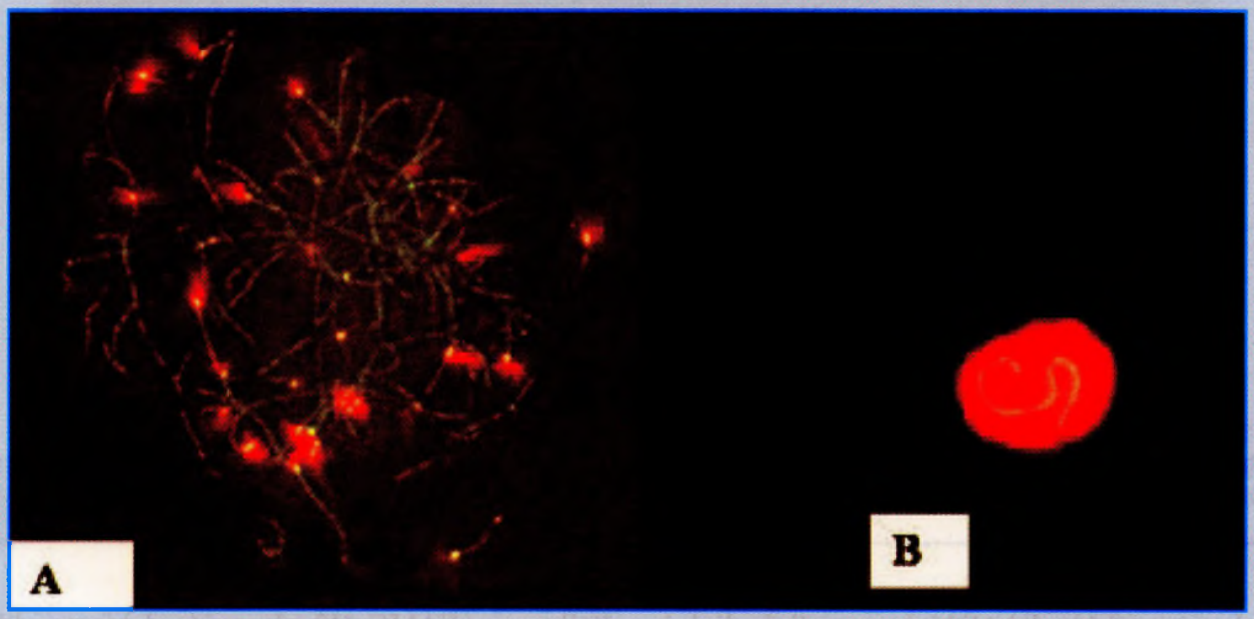


Fig. 1. Detección inmunofluorescente de componentes del cuerpo XY en espermatocitos humanos (micrografías). **A.** Espermatocito de un paciente infértil por mutación meiótica. No hay cuerpo XY. En verde: ejes cromosómicos con proteína SYCP3. Rojo: focos aislados de gamma-H2AX. **B.** Cuerpo XY de un espermatocito normal. Toda su cromatina contiene gamma-H2AX (rojo) y los segmentos diferenciales de los ejes contienen BRCA1 (amarillo) (de Sciurano et al., 2006).[24]

Entre 1968 y 1980 se demostró en la Argentina que en todos los mamíferos, incluida la especie humana, existe un corpúsculo especial en el núcleo de los espermatocitos, que está formado por los cromosomas X e Y y que fue denominado "cuerpo XY" (Solari, 1974).[21] Este corpúsculo había sido confundido con un "nucléolo" o con un cromosoma sexual condensado. Mediante microscopia electrónica y reconstrucciones tridimensionales se probó la existencia de un corto "complejo sinaptonémico" que está presente en uno de los extremos de ambos cromosomas. Este apareamiento o sinapsis parcial es muy evidente en las preparaciones hechas por "extendido" (fig. 10-6 del texto principal).

La mayor parte de ambos cromosomas no se aparea, formando las regiones llamadas "diferenciales". En la meiosis, las regiones *diferenciales* de los "ejes" en el cuerpo XY humano sufren una serie de modificaciones secuenciales (se ramifican, se forman "excrecencias", se anastomosan y forman nódulos densos), que permiten determinar un patrón temporal de las secuencias de eventos durante el estadio de paquiteno.[22] Por otra parte, por estos métodos se descubrió la primera evidencia de recombinación génica entre el X y el Y: se observó un "nódulo de recombinación" localizado muy cerca del extremo sináptico del par XY, que siempre se encuentra en la región terminal del segmento apareado; es decir que el apareamiento promedio (de 1,33 µm en el XY humano)[22] es mayor que el segmento que realmente participa en la recombinación. Este segmento recombinante es pequeño y constituye la región recombinante o "seudoautosómica".

El cuerpo XY está formado por los dos cromosomas sexuales, cada uno con su eje, y la cromatina de éstos no posee actividad transcripcional, excepto en la región seudoautosómica, puesto que esta cromatina tiene modificaciones en sus histonas. Las modificaciones más relevantes son la presencia de la variedad gamma H2AX desde el inicio del paquiteno y posteriores modificaciones tales como la trimetilación de la lisina 9 en la histona H3. Adicionalmente, los ejes en los segmentos "diferenciales" muestran una significativa presencia de la proteína BRCA1.[23] El cuerpo XY es un indicador muy útil para detectar anormalidades en la profase meiótica masculina, ya sea por su desaparición (en caso de ciertas mutaciones) o su modificación (en caso de reordenamientos cromosómicos).

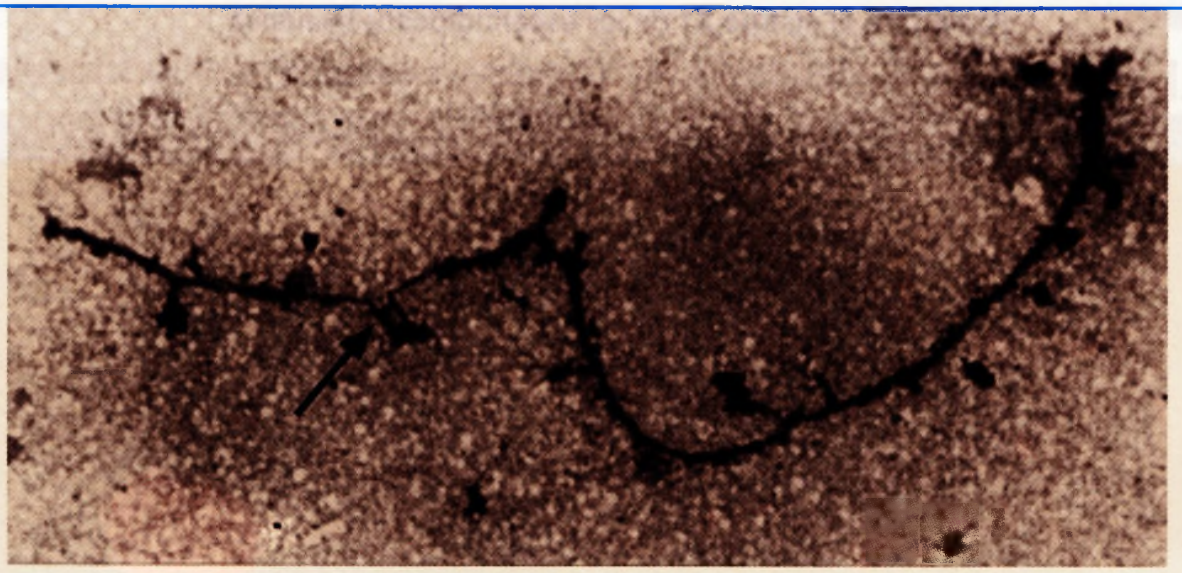


Fig. 10-6. Par XY humano que muestra la región de apareamiento con el complejo sinaptonémico y un nódulo de recombinación (*flecha*) (10.000 ×).

madamente el 1% del ADN de una célula diploi de humana, es decir entre 50 y 60 Mb de ADN No es fácil definir un tamaño estándar para el cromosoma Y puesto que la región heterocromática Yqh es variable en las poblaciones humanas, y por eso las cifras precedentes son promedios. En la parte eucromática del cromosoma Y se han definido por lo menos 78 genes y seudogenes, con 156 transcriptos en total,[28] algunos de los cuales son de gran importancia, empezando por el gen *SRY* o conmutador del sexo; además están los genes *ZFY* ("dedos de zinc, Y"), el de la proteína ribosómica *RPS4*, el de *TSPY* (proteína específica de testículo, Y), el de la amelogenina (*AMGY*), el del antígeno de histocompatibilidad (*H Y*), el relacionado con el síndrome de Kallmann (*KALIG-1Y*) y la región del factor de la azoospermia (*AZF*) (fig. 10-8)

Contenido génico del cromosoma X

El cromosoma X es uno de los mayores submetacéntricos del grupo C, y se conoce un considerable número de genes situados en él, los cuales (excepto los de la RPA) presentan ligamiento "al sexo" (masculino) o, más estrictamente, ligamiento al cromosoma X. El ligamiento al sexo masculino se explica porque los genes mutantes recesivos del X se deben expresar, obligadamen te, en el varón, mientras que en la mujer en general no se expresan (por ser heterocigotas y por el mosaicismo debido a la lionización del X, [véase

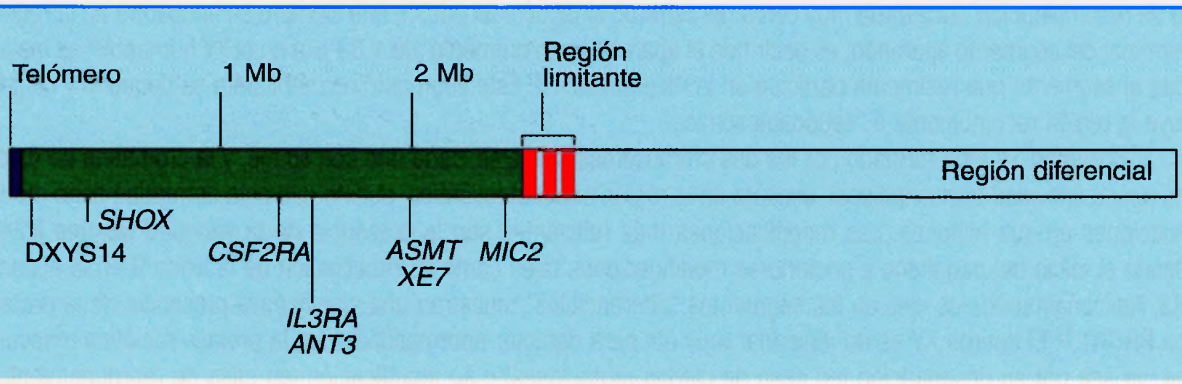


Fig. 10-7 Mapa de la región seudoautosómica humana y algunos de los genes conocidos en ella.

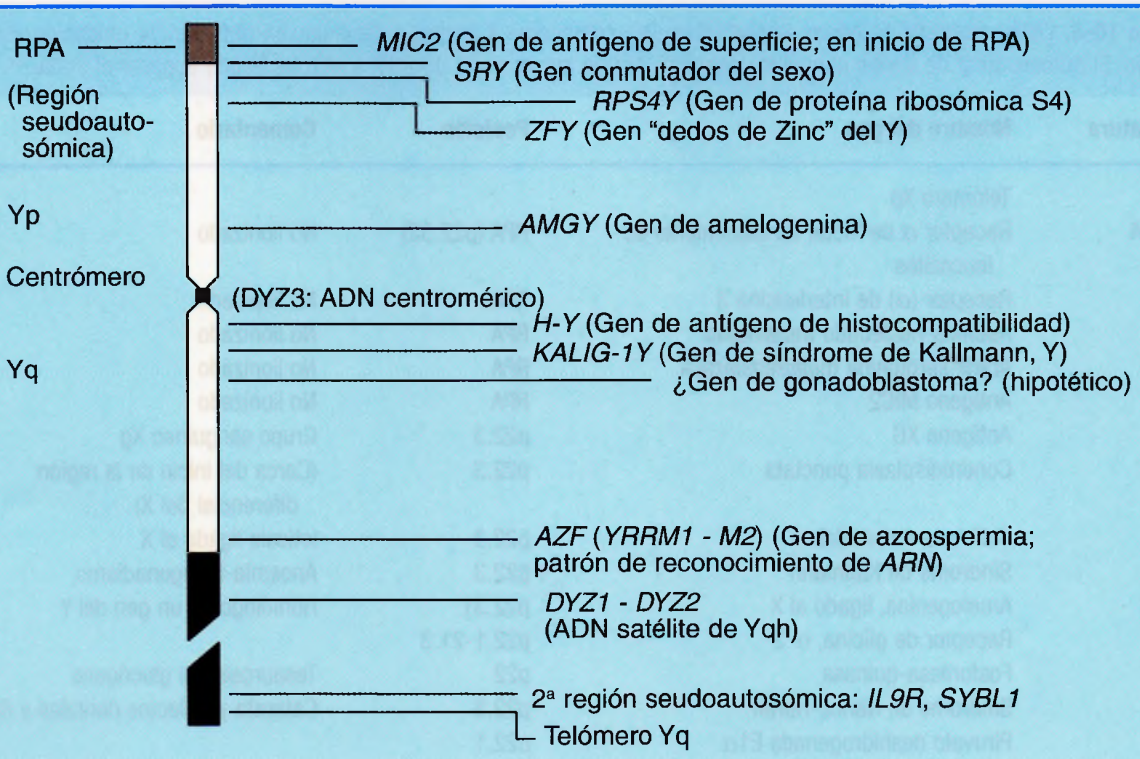


Fig. 10-8. Disposición de algunos genes en el cromosoma Y humano. Se incluye en el extremo de Yq la diminuta segunda región seudoautosómica y sus dos genes más relevantes: IL9R (receptor de interleucina 9) y SYBL1 (símil de sinaptobrevina).

el cap. 11). El cromosoma X humano contiene aproximadamente 164 Mb de ADN,[29] de las cuales 62 Mb corresponden a Xp; en la actualidad se conocen alrededor de 1.000 genes identificados y localizados en este cromosoma.[30] El número total de genes en el cromosoma X humano es seguramente superior a un millar (probablemente entre 1.500 y 1.669), pero tomará tiempo la identificación precisa de muchos de ellos, por desconocerse su función. En el cuadro 10-3 se resume la localización de algunos de los más importantes genes conocidos del cromosoma X humano.[30]

El gen determinante de testículo: *SRY*

Desde el descubrimiento en 1959 de las fórmulas cromosómicas XXY en el síndrome de Klinefelter y X0 en el síndrome de Turner, quedó evidenciado que en la especie humana y en general en los mamíferos) el cromosoma Y normalmente es el portador de un factor génico capaz de determinar la formación de testículo, sin importar el número de cromosomas X presentes, como lo muestra el síndrome de Klinefelter clásico (XXY) o sus variantes XXXY y XXXXY. Además, se mostró que en ausencia del cromosoma Y se desarrolla un fenotipo femenino; las experiencias previas de Alfred Jost en las décadas de 1940 y 1950 habían probado que la resección de las gónadas en el embrión lleva a un desarrollo ductal y de fenotipo externo femenino, de tal forma que el sexo femenino es el sexo que resulta "por defecto" cuando no están los factores génicos determinantes de testículo, o cuando no se forma una gónada testicular. De allí se dedujo la existencia de un "factor determinante de testículo" (TDF en inglés), localizado en el cromosoma Y, que llevó 31 años lograr aislarlo y que hoy se conoce con el nombre de gen *SRY* de "sex region, Y" o región determinante sexual del Y) Finalmente, mediante el análisis del ADN de pacientes que perdieron o tienen alterada la región correspondiente al *SRY*, y que son casos raros de "hombres con cariotipo XX" y "mujeres con cariotipo XY", en 1990 se pudo clonar un

Cuadro 10-3. Lista ordenada de genes importantes del cromosoma X humano. Se incluyen genes cuya ubicación está bien definida. El número total de genes conocidos del X es mucho mayor (más de 900) y el total puede superar el millar.[30]

Abreviatura	Nombre del gen	Posición	Comentario
pter	Telómero Xp		
CSF2RA	Receptor α de factor de crecimiento de leucocitos	RPA (p22.32)	No lionizado
IL3RA	Receptor (α) de interleucina 3	RPA	No lionizado
ANT3	Adenina-nucleótido translocasa	RPA	No lionizado
ASMT	Acetil-serotonina metiltransferasa	RPA	No lionizado
MIC2	Antígeno MIC2	RPA	No lionizado
XG	Antígeno XG	p22.3	Grupo sanguíneo Xg
CDPX1	Condrodisplasia punctata	p22.3	(Cerca del inicio de la región diferencial del X)
STS	Sulfatasa esferoidal	p22.3	Ictiosis ligada al X
KAL	Síndrome de Kallmann	p22.3	Anosmia-hipogonadismo
AMELX	Amelogenina, ligado al X	p22.31	Homólogo de un gen del Y
GLRA2	Receptor de glicina, α-2	p22.1-21.3	
PHK	Fosforilasa-quinasa	p22	Tesaurosis del glucógeno
NHS	Síndrome de Nance-Horan	p22.3	Catarata y defectos dentales y óticos
PDHA1	Piruvato deshidrogenada E1α	p22.1	
HYP	Hipofosfatemia		Mutación "gyro" en ratón
ZFX	"Dedos de Zn" ligado al X	p22.1	Homólogo del ZFY
POLA	α-polimerasa (DNA)	p22.1	
DMD	Distrofia muscular (Duchenne-Becker)	p22.3	Distrofina (gen gigante)
CYBB	Citocromo B, β	p22.1	Granulomatosis crónica
OTC	Ornitina carbamoil-transferasa	p22.1	Mutante "sparse fur" en *Mus*
MAOA	Monoaminooxidasa A	p11.3	
MAOB	Monoaminooxidasa B	p11.3	
ARAF1	Oncogen V-raf	p11.3	Homólogo del de sarcoma (*Mus*)
SYN1	Sinapsina 1	p11.23	
TIMP1	Inhibidor de metal-proteasa	p11.4	
IP1	Incontinentia pigmenti	p11.21	
DXZ1	DNA satélite centromérico	CEN	CENTRÓMERO DEL X
RA	Receptor de andrógenos	q11.2	Feminizaciòn testicular
EDA	Displasia ectodérmica	q12	Displasia anhidrótica
CCG1	Ciclo celular, defecto G1	q13.1	
RPS4	Proteína ribosomal S4	q13.1	
XIST	X-inactivo, transcripto específico	q13.2	Centro inactivador del X
MNK	Enfermedad de Menkes	q13.3	
GLA	α-galactosidasa	q21.3	
PLP	Proteína proteolipídica	q21.33	Enfermedad de Pelizaeus
LYP	Síndrome linfoproliferativo	q25	
HPRT	Hipoxantina fosforribosil transferasa	q26	Síndrome de Lesch-Nyhan
F9	Factor 9 de coagulación	q26.3	Hemofilia B (enfermedad de Christmas)
FRAXA	Sitio frágil del X (A)	q27.3	Síndrome de X frágil
IDS	Iduronato-2-sulfatasa	q27.3	Síndrome de Hunter
GABRA3	Receptor α3 de GABA	q28	
RCP	Pigmento rojo de conos	q28	Daltonismo protánope
GCP	Pigmento verde de conos	q28	Daltonismo deuteránope
G6PD	Glucosa 6-P deshidrogenasa	q28	
F8	Factor 8 de coagulación	q28	Hemofilia A
qter	Telómero del brazo largo del X		

(Nota del autor: F8 y F9 son los símbolos recomendados para los genes humanos del factor VIII y factor IX de coagulación)

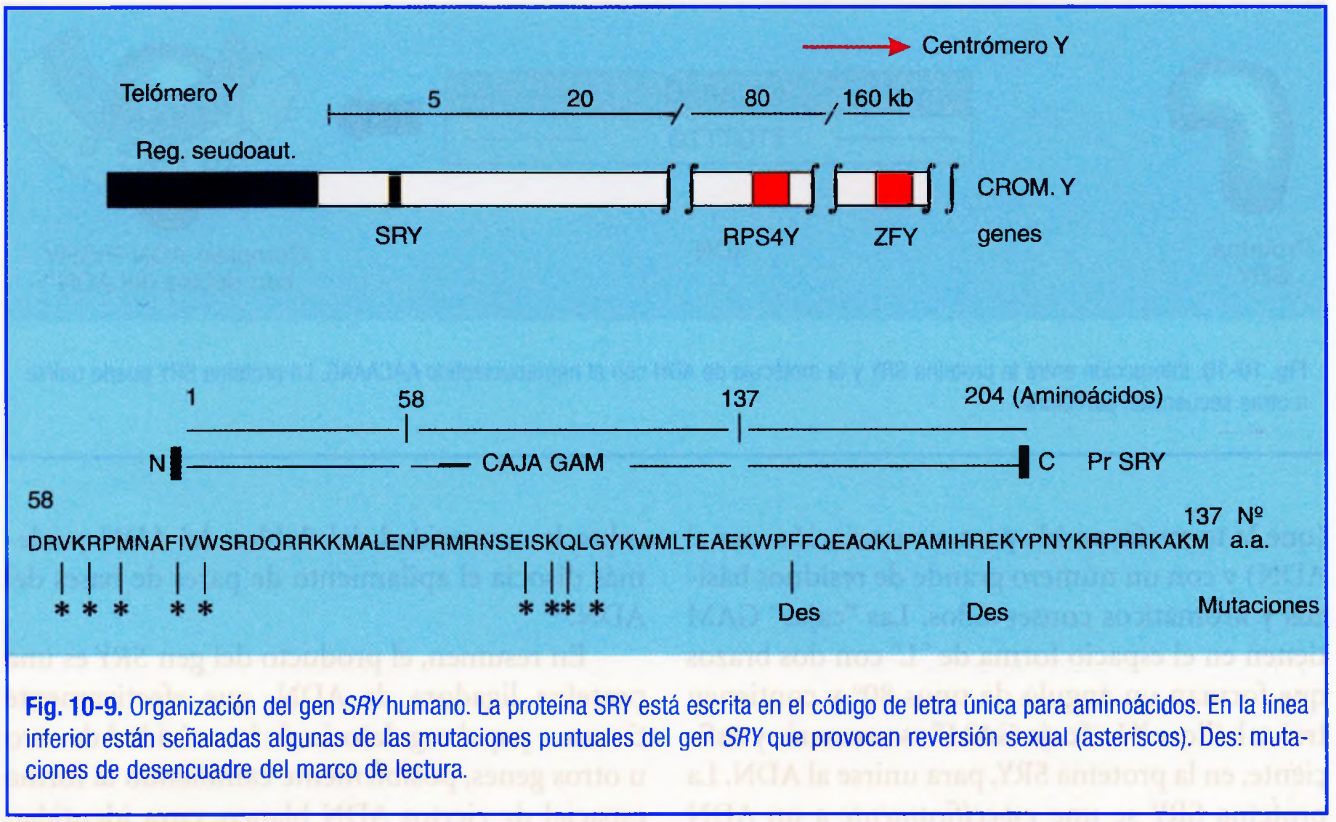


Fig. 10-9. Organización del gen *SRY* humano. La proteína SRY está escrita en el código de letra única para aminoácidos. En la línea inferior están señaladas algunas de las mutaciones puntuales del gen *SRY* que provocan reversión sexual (asteriscos). Des: mutaciones de desencuadre del marco de lectura.

segmento de ADN del cromosoma Y que contiene el gen *SRY*.[31] El gen *SRY*, curiosamente, se encuentra casi en el borde (a 5 kb) de la región seudoautosómica del cromosoma Y, que es homóloga a la del X y recombina con ella, por esto no es sorpresivo que a veces el gen *SRY*, por error, entre en un proceso de entrecruzamiento ("crossing-over") meiótico entre el Y y el X, y sea transferido a un cromosoma X, posibilitando la aparición de "hombres con fórmula XX" (véase más adelante) El gen *SRY* es un gen pequeño y sin intrones, contenido en un segmento de sólo 2,1 kb; posee un marco de lectura abierto de 614 pares de bases, capaces de codificar 204 ammoácidos, que son producidos a partir de un ARN transcripto de 1,1 kb (fig. 10-9).[32] La proteína codificada, también llamada el producto SRY, de 204 aa, contiene en su parte media una región conservada en otras especies, la "caja GAM" o caja del grupo de proteínas de alta movilidad (HMG en inglés; se refiere a movilidad electroforética) Esta proteína pequeña, de 23,9 kDa, tiene una capacidad específica de unirse a ADN, con especificidad de secuencia, y a regiones de ADN cruciforme, sin especificidad. Además, el gen *SRY* posee un promotor situado a 310 pb más arriba (en dirección 5') que el gen, que es rico en GC.[33] La regulación de este promotor no es bien conocida.

Hay varias decenas de mutaciones registradas del gen *SRY* que producen reversión sexual, y casi todas ellas recaen sobre la codificación de la "caja GAM" Por otra parte, esta secuencia de 80 aminoácidos en la "caja" está conservada, es muy similar en el ratón, el conejo, el perro y en otros 12 mamíferos, aunque con porcentajes de homología menores en especies más alejadas filogenéticamente de la humana.

Esta "caja" constituye una secuencia de aa que se encuentra (con algunas variaciones) en un grupo de proteínas; es lo que se considera una secuencia "motivo", muy parecida en proteínas diversas, que se caracterizan por una propiedad común. la de unirse al ADN ("proteínas ligadoras de ADN") Entre estas proteínas se incluye un grupo de proteínas nucleares no histónicas, que por migrar anticipadamente a la mayoría de otras proteínas en electroforesis, se denominan "grupo de alta movilidad. *high mobility group*, lo cual ha dado origen a la sigla HMG – GAM para nombrar a la "caja" La secuencia caja GAM tiene 80 aminoácidos, con una carga neta positiva

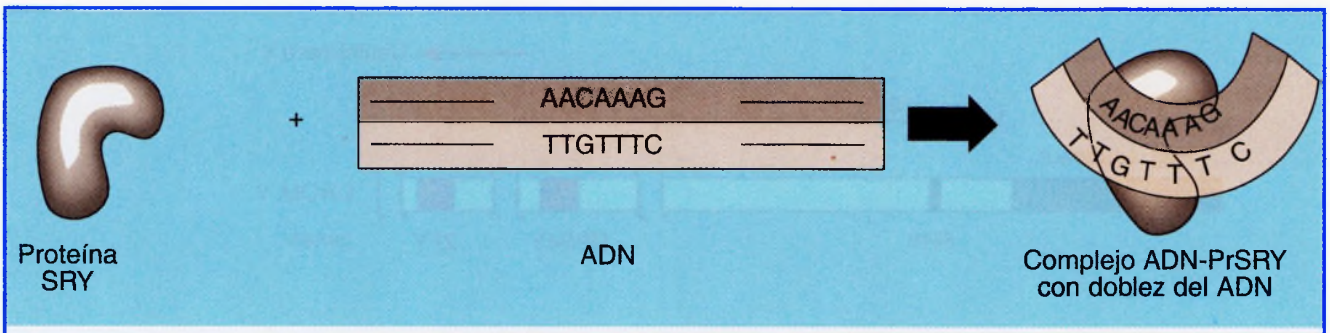


Fig. 10-10. Interacción entre la proteína SRY y la molécula de ADN con el heptanucleótido AACAAAG. La proteína SRY puede unirse a otras secuencias parecidas.

(que la torna favorable para su asociación con el ADN) y con un número grande de residuos básicos y aromáticos conservados. Las "cajas" GAM tienen en el espacio forma de "L" con dos brazos que forman un ángulo de unos 80° y contienen tres α hélices.[34] La "caja GAM" es necesaria y suficiente, en la proteína SRY, para unirse al ADN. La proteína SRY se une *específicamente* a un ADN bicatenario con secuencia de heptanucleótido AACAAAG y, al mismo tiempo, induce un *plegamiento* agudo de la doble hélice del ADN (fig. 10-10).

La unión de la proteína SRY al ADN lo dobla en un ángulo de aproximadamente 83°, variable según la secuencia del ADN: cuanto mayor es la afinidad de la SRY por la secuencia, mayor es el doblez del ADN. La asociación SRY-ADN se lleva a cabo por la ranura menor del ADN, lo cual da lugar a una menor especificidad de esta unión comparada con las que usan la ranura mayor. Se supone que la acción de la proteína SRY se realiza a través de este doblez, que permitiría una asociación de otras proteínas, formando un complejo multiproteínico sensible a los cambios de forma espacial, tal como los complejos de factores de transcripción. Esta hipótesis está apoyada por la observación de que varias de las mutaciones del gen *SRY* (en la "caja GAM") que invierten el sexo, anulan o disminuyen la capacidad de la proteína SRY para producir el plegamiento del ADN. Algunos estudios de resonancia magnética sugieren que la asociación entre la SRY y una secuencia de ADN blanco (de la región del promotor del gen de HAM) se realiza por la concavidad de la "L" de la caja GAM, la cual se aloja sobre la convexidad del doblez del ADN y además disocia el apilamiento de pares de bases del ADN.[35]

En resumen, el producto del gen *SRY* es una proteína ligadora de ADN, que efectivamente tiene un papel regulatorio de la actividad de otro u otros genes, posiblemente cambiando la forma espacial de ciertos ADN blanco, cuya identidad es un intensificador del gen *SOX9*, de modo que altera su transcripción (panel 10-2).

El gen de la hormana antimülleriana (HAM, MIS: *Müllerian Inhibiting Substance*)

La hipótesis de que el testículo embrionario produce una sustancia inhibidora de los conductos de Müller, que actúa a distancia sobre órganos blanco –como una hormona–, la hormona antimülleriana (HAM, MIS: *Müllerian inhibiting substance*), se debe a Alfred Jost, quien en los experimentos ya citados demostró ese papel. La HAM es una glucoproteína dimérica, formada por dos monómeros de 72 kDa. Los monómeros se asocian por dos puentes disulfuro. La HAM pertenece a un grupo de proteínas con características de factores de crecimiento y diferenciación celular, el grupo denominado β de factores de crecimiento y transformación (TGFβ en inglés), que modifican en sentido amplificador o inhibitorio la acción de otras proteínas que son factores de crecimiento más directos. La HAM es secretada por las células de Sertoli del testículo embrionario, a partir de la octava semana, dicha secreción es máxima durante la regresión de los

Panel 10.2 La función del producto SRY en la morfogénesis testicular

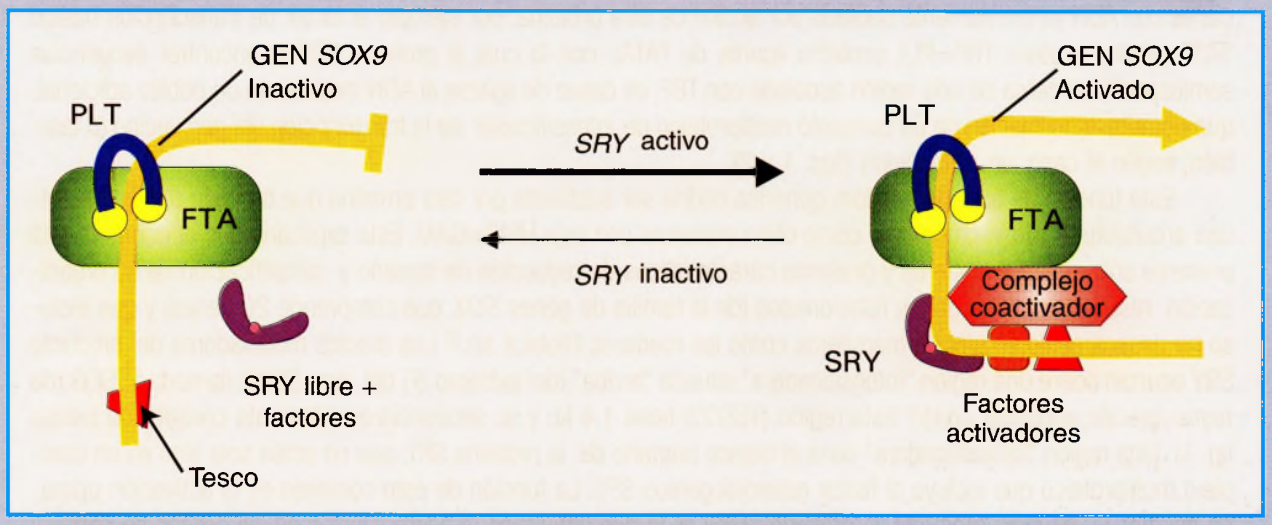


Fig. 1. Esquema de la acción "arquitectural" del producto SRY, provocando un doblez en el ADN que permite la formación de un complejo multiproteico regulador. FTA: complejo de transcripción sobre el gen *SOX9*. PLT: Proteína ligadora de TATA. TESCO: región intensificadora del *SOX9*, blanco de los productos SRY y FS1. El cordón amarillo representa el ADN.

Fig. 2. Modelo de la proteína SRY, con sus tres hélices alfa señaladas, y la posición de la proteína en relación con el ADN. Las dos hélices del ADN están en azul.

Sólo después de 19 años de ser aislado, en 2009 ha sido determinado el *sitio* en el cual actúa la proteína codificada por el gen conmutador del sexo *SRY*, mediante enfoques evolutivos y de la fisiología. Tal como se observó en la década de 1990-2000, el gen *SRY* sólo presenta conservación de su secuencia en la región de la caja HMG=GAM, y el resto de este pequeño gen está muy diversificado en distintos mamíferos. Además, la gran mayoría de las mutaciones del gen *SRY* que afectan la determinación sexual, afectan dicha región exclusivamente (véase texto principal). Es decir, las evidencias sugieren que la función del *SRY* reside en esa región o caja, que es compartida por el *grupo de proteínas de alta movilidad electroforética = HMG* [36] cuyas funciones, según las evidencias actuales, son *modificar* la estructura espacial de distintos sectores del genoma, favoreciendo o inhibiendo su trans-

cripción; son las proteínas llamadas con *actividad arquitectural* de la cromatina. Estas proteínas HMG=GAM tienen alguna especificidad por secuencias determinadas de ADN y al unirse al ADN lo doblan en forma muy significativa (véase texto principal para el caso de la SRY). Por otra parte, las "cajas HMG=GAM" tienen predisposición a asociarse con ADN ya previamente doblado por acción de otra proteína, por ejemplo el factor de transcripción básico *TATA-binding protein* (TBP=PLT, proteína ligante de TATA), con lo cual la proteína SRY al encontrar secuencias semiespecíficas cerca de una región asociada con TBP, es capaz de ligarse al ADN induciendo un doblez adicional, que permite la formación de un complejo multiproteico de *intensificador* de la transcripción del gen vecino (o también, según el caso, un *silenciador*) (figs. 1 y 2).

Esta función de tipo moduladora genérica podría ser sustituida por otra proteína que también tuviera "actividad arquitectural" de la cromatina, como otras proteínas con caja HMG=GAM. Esto explicaría que el gen *SRY* está presente sólo en los mamíferos y presenta características de reducción de tamaño y simplificación de su organización respecto de otros genes relacionados (de la familia de genes *SOX*, que comprende 20 genes) y que incluso ha desaparecido en ciertos mamíferos como los roedores Ellobius sp.[37] Los efectos moduladores del producto SRY ocurren sobre una región "intensificadora" situada "arriba" (del extremo 5') del gen *SOX9*, llamada TESCO (de *testis-specific enhancer core*)[38] Esta región (TESCO) tiene 1,4 kb y su secuencia es altamente conservada (véase fig. 1). Esta región "intensificadora" sería el blanco primario de la proteína SRY, que no actúa sola sino en un complejo multiproteico que incluye al factor esteroidogénico SF1. La función de este complejo es la activación primaria del gen *SOX9*, cuyo producto, la proteína SOX9 es la que determina la diferenciación de las células de Sertoli y la formación de testículo. La síntesis de la proteína SOX9, que sería el verdadero efector de la morfogénesis testicular, está garantizada por un mecanismo de autorregulación, puesto que la proteína SOX9 también activa el intensificador TESCO de su propio gen. De esa manera, cumplida la "conmutación" inicial, el producto SRY ya no es imprescindible para mantener la diferenciación testicular, y el propio gen *SRY* ha sido sustituido en ciertas especies y en animales experimentalmente privados del SRY.[39] A su vez, el gen *SRY* es muy probablemente activado por el producto del gen del factor esteroidogénico 1 (*SF1=FS1*). Adicionalmente a su blanco primario (el gen *SOX9*), el producto SRY tiene otras funciones, que posiblemente se relacionan con una actividad inhibitoria de la morfogénesis del ovario, y aun otras funciones no conocidas. A su vez, cuando el gen *SOX9* está a cargo de la morfogénesis del testículo, activa al factor 9 de crecimiento fibroblástico (*FGF9*), cuyo producto es importante para la formación de los túbulos seminíferos. Por consiguiente, el papel testicular del *SRY* estaría limitado al paso primario de la conmutación hacia la vía testicular en la gónada indiferenciada durante un breve lapso y luego a otras funciones secundarias.

conductos de Müller, aunque sigue segregándose durante el resto de la gestación y durante la época posnatal, el ARNm de la HAM es activo durante las semanas 13 a 25, es decir que el gen de la HAM no es totalmente reprimido luego de la atrofia de los conductos de Müller. Se asigna a la HAM un efecto masculinizante sobre el ovario y se supone que es la HAM la productora de los ovarios anormales (masculinizados) en los embarazos múltiples bovinos de distinto sexo: la HAM, que pasa del testículo embrionario de un feto a la sangre circulante y por ella al ovario del feto femenino, actúa provocando la regresión ovárica y la formación de cordones celulares seudotesticulares. Por ello no es de extrañar que el ovario fetal produzca sólo cantidades insignificantes de HAM, sin embargo, en el ovario adulto, las células foliculares producen una cantidad significativa de HAM, cuya función se ignora.

El gen de la HAM está localizado en el brazo corto del cromosoma 19; es un gen pequeño, de 2,8 kb y presenta cinco exones. El ARNm de la HAM es de 2 kb (fig. 10-11)

La región arriba del 5' del gen *HAM* tiene una región de promotor de 115 pb, que a su vez posee secuencias afines para la proteína SRY (ACAAACA), cuya alteración en mutantes provoca la falta de unión con la proteína SRY, aunque no impide la transcripción del gen *HAM*;[35] es decir que la SRY no actúa *directamente* sobre

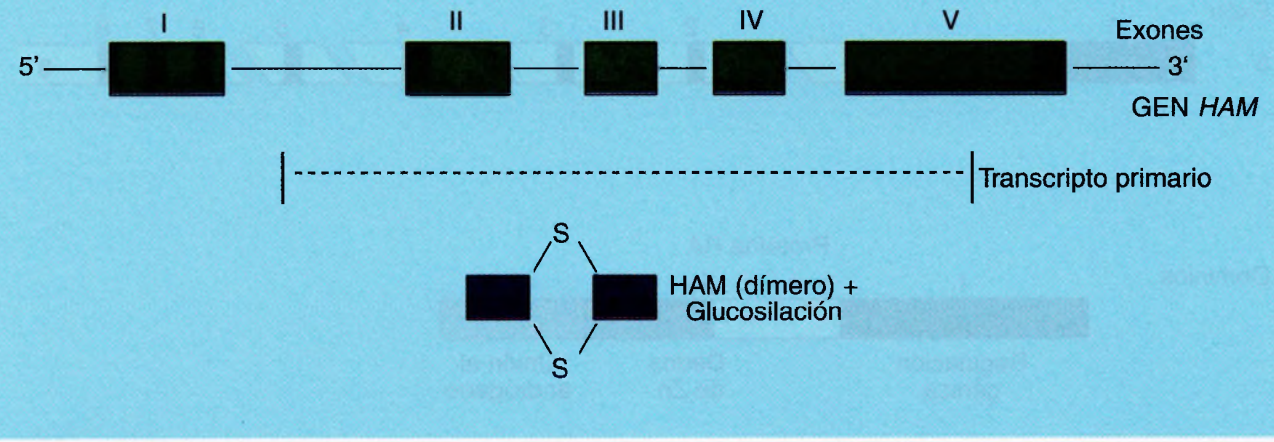


Fig. 10-11 Esquema del gen de la hormona antimülleriana y su producto.

el gen *HAM*, pero puede actuar en forma indirecta (ayudando o inhibiendo otro factor proteínico que se asocia al promotor) Otras evidencias sugieren que el *HAM* no es el gen blanco *inmediato* del *SRY* En el ratón, el *Sry* se expresa (transcribe) 48 horas antes que el *HAM* y en el hombre se expresa una semana antes. Las mutaciones del gen *HAM* no producen reversión sexual gonadal sino hombres con criptorquidia y persistencia de derivados müllerianos (útero y trompas)

El gen del receptor de andrógenos (RA = AR) y los efectos de esteroides

Las hormonas esteroideas tienen efectos fundamentales sobre la diferenciación sexual en todos los vertebrados, y en todos ellos, salvo en los mamíferos, es posible invertir el sexo *gonadal* con hormonas esteroideas.[1] Precisamente en los mamíferos ha surgido durante la evolución una superestructura génica, con el gen *SRY*, que domina a los genes sensibles a efectos hormonales, y esto es una necesidad para los mamíferos, cuyo embrión convive en el útero materno con un ambiente sanguíneo pleno de hormonas maternas que podrían afectar el desarrollo gonadal del embrión.

En el hombre, las hormonas esteroideas actúan básicamente a través de su unión con *receptores específicos*, que son proteínas ubicadas normalmente en el citosol, pero que unidas a un esteroide migran rápidamente al núcleo celular y se acoplan a regiones promotoras de genes hormonodependientes. Los andrógenos, fundamentalmente la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT), actúan básicamente por su unión con una proteína especial (que no está en la membrana sino en el citosol) llamada *receptor de andrógenos* (RA) La proteína RA tiene un peso molecular de 90 kDa, tiene 919 aminoácidos y una compleja estructura con cuatro dominios: el dominio aminoterminal es de *regulación transcripcional*; el dominio II, de dedos de zinc, es el responsable de la unión al ADN (con la peculiaridad de que el primer "dedo" reconoce secuencias del ADN y el segundo estabiliza la unión con el ADN), el dominio III es flexible y el dominio IV (carboxiloterminal) es el de unión al andrógeno (fig. 10-12) La proteína RA *necesita* estar unida al andrógeno esteroide para poder regular la transcripción de genes andrógeno-dependientes, posiblemente mediante un cambio de la estructura espacial de toda la proteína; por otro lado, el dominio I (amino-terminal) es el que posee mayores diferencias con otras proteínas receptoras. La proteína RA se encuentra, cuando no está ligada a esteroides, en el complejo de Golgi o en el retículo endoplasmático perinuclear; cuando se une al andrógeno, pasa rápidamente al núcleo y se acopla a sectores del ADN que tienen secuencias de "respuesta hormonal" de

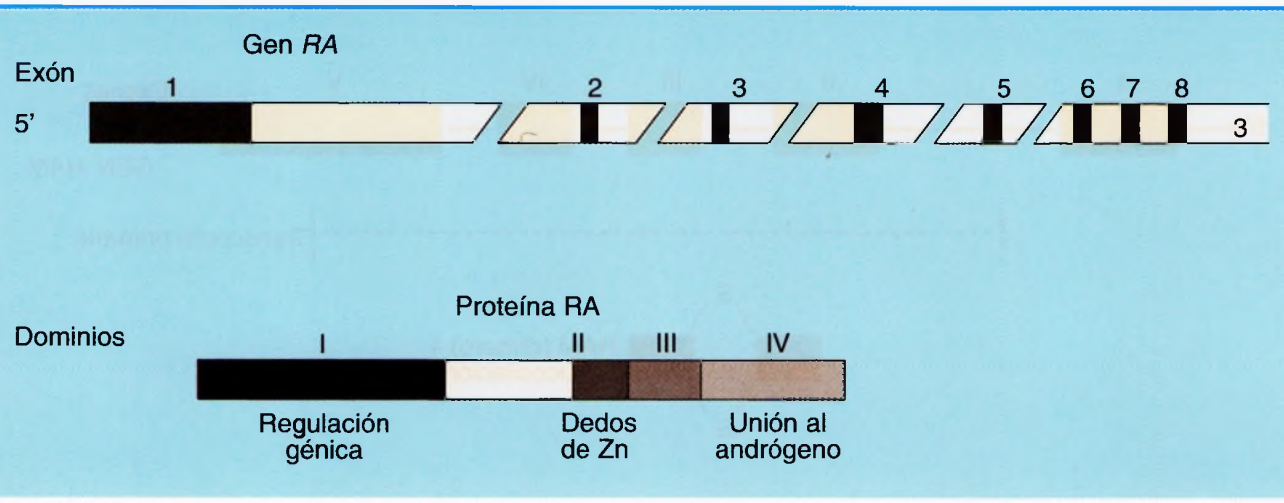


Fig. 10-12. Esquema del gen de receptor de andrógenos *RA* y su producto, la proteína RA.

tipo AGAACANNNTGTTCT. La proteína RA es codificada por el gen *RA*, un importante gen del cromosoma X, localizado en q11.2, algunas de cuyas mutaciones provocan el *síndrome de feminización testicular* (también llamado "síndrome de insensibilidad completa a andrógenos o CAIS, en inglés) El gen *RA* es extenso (90 kb), con ocho exones, separados por algunos intrones extensos y otros menores (véase fig. 10-12)

El gen *RA* no sólo es importante en la diferenciación sexual (produce el síndrome de testículo feminizante en varias de sus mutaciones), sino que su papel de regulador transcripcional parece extenderse a otros efectos en ciertos casos: la *atrofia muscular espinobulbar* (AMEB – SBMA en inglés, o enfermedad de Kennedy) es causada por una "expansión de tripletes" CAGCAG... que ocurre en el primer exón del gen *RA* (que codifica el dominio I de la proteína RA, el cual desempeña un papel de regulación transcripcional) El producto RA, en esta mutación, se liga normalmente a andrógenos, pero *falla en su actividad de regulación transcripcional* y, de una manera poco conocida, finalmente resulta deletéreo para las motoneuronas de la médula espinal y el bulbo.

El *síndrome de feminización testicular o CAIS* ocurre cuando hay deleciones o mutaciones importantes en el segmento génico que corresponde principalmente al dominio IV de la proteína RA, es decir que afectan la unión RA-andrógeno. Las enfermas tienen un cariotipo 46,XY (normal de un varón), tienen testículos no descendidos (generalmente inguinales) y genitales externos de tipo femenino, y son criadas de acuerdo con el sexo aparente femenino. Los andrógenos producidos por el testículo feminizante no masculimzan a la paciente puesto que falta el receptor adecuado, y se convierten en estrógenos que dan caracteres sexuales secundarios absolutamente femeninos (desarrollo mamario, vello de tipo femenino, disposición femenina del tejido adiposo, etc.) En el desarrollo embrionario de estas pacientes, el seno urogenital es refractario a los andrógenos y se desarrolla en sentido femenino. Hay secreción de HAM y por ello estas pacientes carecen de oviducto y útero. Está indicada la extirpación quirúrgica de los testículos para prevenir el desarrollo de un tumor (gonadoblastoma).

El gen de la 5α-reductasa y la acción de los andrógenos

Las hormonas esteroideas se sintetizan a partir de acetato e ingresan en el camino esteroidal a partir del colesterol (fig. 10-13

El principal andrógeno segregado por las células de Leydig del testículo embrionario y adulto es la testosterona (T), que es convertida a una forma más activa (la dihidrotestosterona, DHT) por acción de una enzima, la 5α-reducta

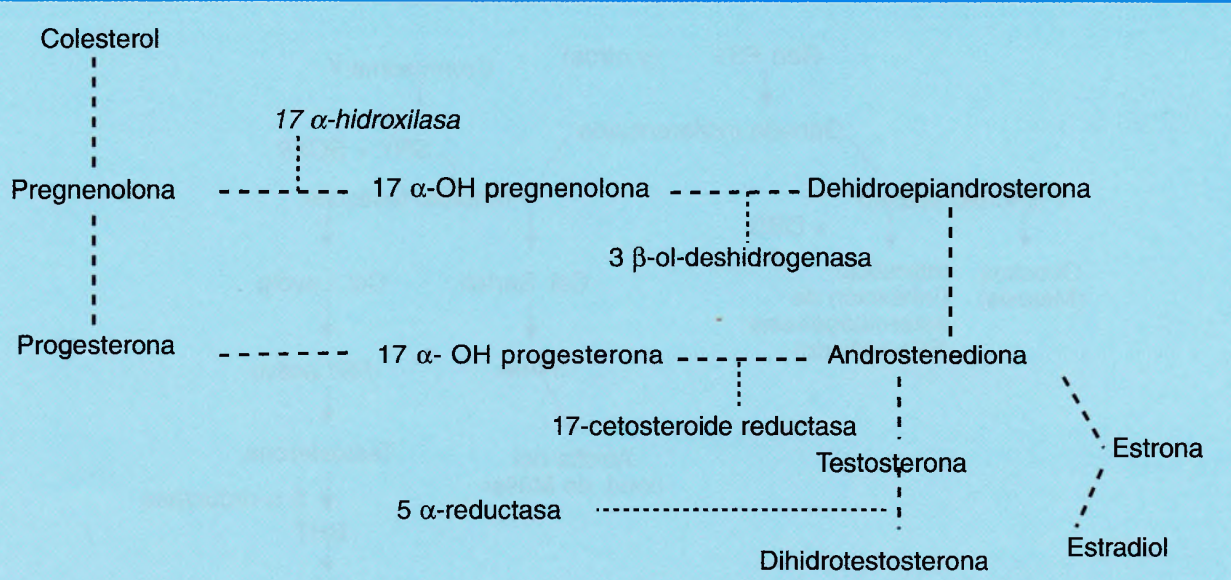


Fig. 10-13. Camino metabólico de los andrógenos.

sa. El receptor de andrógenos RA tiene mayor afinidad por la DHT que por la T. Durante la embriogénesis, la actividad de la 5α-reductasa se expresa en el seno urogenital, por ello, éste es muy receptivo a los andrógenos que, si aparecen en el momento adecuado, inducen el desarrollo de los genitales externos en sentido masculino.

El gen de la 5α-reductasa se encuentra en el cromosoma 5 y consta de cinco exones, que codifican una proteína mediana, de 254 aminoácidos. La deleción o mutación importante de este gen puede producir un síndrome de deficiencia de 5α-reductasa, de seudohermafroditismo masculino, con hipospadias perineoescrotal, seudovaginal. Los caracteres sexuales secundarios, que dependen de la T, no se alteran.

Ubicación del gen *SRY* y de otros genes en el esquema del desarrollo sexual

Como se mencionó antes, en todos los vertebrados, excepto los mamíferos, es posible revertir el sexo gonadal con hormonas esteroideas, y también en todos los vertebrados el desarrollo de la gónada primitiva es ambisexual, es decir que el esquema de desarrollo sexual contiene todos los genes para la producción de los dos tipos de gónada, ovario y testículo, y sólo se adiciona un "conmutador" que elige entre uno u otro tipo de gónada.[1] En los mamíferos (marsupiales y euterios) se ha adicionado la función reguladora del producto SRY, que actúa sobre otros genes, por su cualidad de unirse a secuencias de ADN Actualmente está identificado el principal gen "blanco" del *SRY*, que es el *SOX9* y más específicamente, su región intensificadora TESCO (véase el panel 10-2) Sin embargo, varias evidencias experimentales de inversión sexual y otras halladas naturalmente sugieren la intervención de mecanismos adicionales.

Por otra parte, es razonable pensar que los mecanismos hormonales no han desaparecido, sino que han sido subordinados a otros genes; especialmente la enzima aromatasa (P-450 aromatasa), que es capaz de definir una disyuntiva binaria. sexo masculino/sexo femenino regulando el nivel de estrógeno/andrógeno. Adicionalmente, el gen *SRY* está a su vez acotado en su función por otros genes, puesto que se activa precisamente en un tiempo (7ª semana y lugar (gónada primitiva) bien definidos. De nuevo surge la relación con la regulación hormonal, puesto que se ha observado que un gen regulador de la esteroidogénesis, el factor esteroidogénico 1 (*FS1*), es activo en las crestas genitales

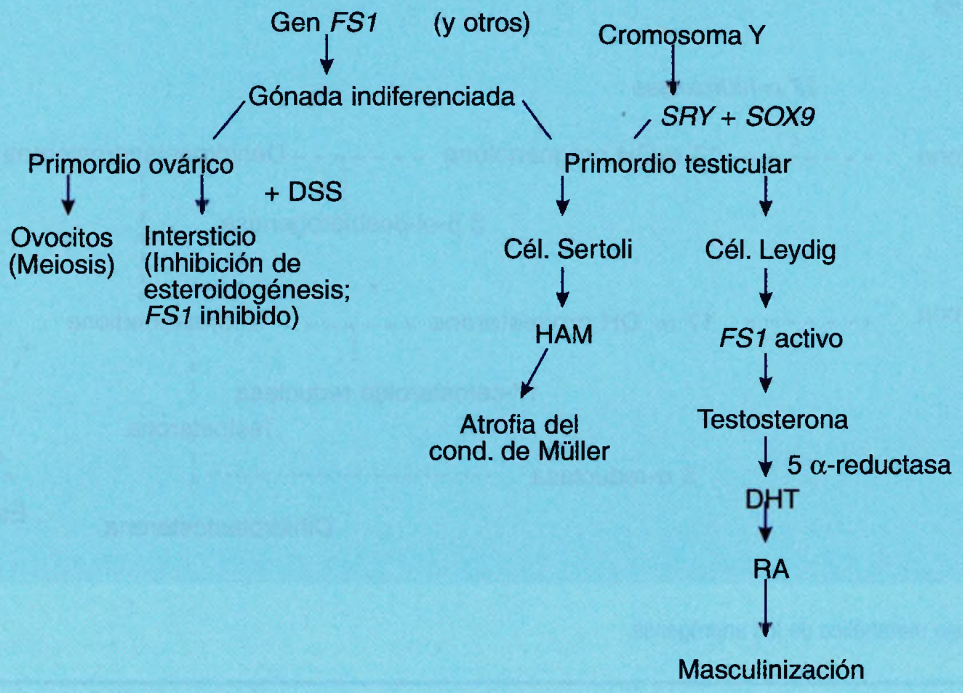


Fig. 10-14. Ubicación de algunos de los factores génicos conocidos en el desarrollo sexual. *SOX9*, *DSS*: genes vinculados a la determinación sexual (véase panel 10-2).

antes que el *SRY*, y en el sexo femenino es reprimido *luego* de la activación del *SRY*, mientras continúa activo en el masculino; además se une a la región TESCO del gen *SOX9* y al promotor del gen de la HAM. La abolición del gen *FS1* produce la ausencia de gónadas. El gen *SRY* puede actuar sobre el *FS1*, *manteniéndolo activo* por un mecanismo positivo (activación) o negativo (inhibiendo un represor) (fig. 10-14) (véase panel 10-2)

Genes del desarrollo ovárico

Aun cuando la vía de desarrollo del ovario sea por defecto, requiere una cascada génica. Entre 2000 y 2010 se han ido revelando los genes que intervienen en el desarrollo del ovario y además las influencias antagónicas mutuas que exhiben los productos de las cascada masculina y la femenina, lo cual permite clarificar ciertos casos de reversión sexual.

Dos son las principales cascadas génicas que determinan la formación del ovario: la que se inicia con el gen *FOXL2* (*factor de transcripción*) y la que comienza por el gen *RSPO1*, que codifica una proteína segregada y se continúa con el sistema de señales de WNT catenina-beta.[40]

El gen *FOXL2* es uno de los miembros de la familia de genes de factores de transcripción "forkhhead = cabeza de flecha", cuyas mutaciones producen falla prematura del ovario (menopausia antes de los 40 años) y además un síndrome ocular. El producto de este gen parece ser necesario para la diferenciación de las células de la granulosa del ovario; se ha demostrado que este gen se expresa en el ovario fetal humano a la octava semana, poco después de su diferenciación y durante la formación de los folículos.[41] Además de su papel en la foliculogénesis, las mutaciones de este gen pueden producir inversión del sexo XX hacia la masculinidad y está relacionado con estados intersexuales en algunos mamíferos, como el "polled" en la cabra.

En forma independiente, el gen RSPO1 (R-espondina, del inglés: *R-sponding homolog*) se activa al inicio de la formación del ovario. Su producto es una proteína segregada, rica en cis-

teína y con un dominio de tipo trombospondina, y cuya actividad induce la proliferación de epitelios pero, fundamentalmente, activa el sistema de señales intercelulares que depende de las proteínas WNT (pronunciado "wint"), probablemente por una interacción directa con estas proteínas, que funcionan durante la embriogénesis de todos los animales que tienen simetría bilateral, determinando la polaridad de segmentos del cuerpo y de varios tipos celulares y los movimientos celulares durante la gastrulación. El camino de señalización WNT (18 genes humanos) tiene una proteína citoplasmática "blanco", la beta catenina, que es clave para la formación de la *zonula adherens* en los epitelios. Esta catenina beta era considerada una proteína de tipo estructural, pero actualmente se ha encontrado que es una importante pieza en los sistemas de transducción de señales y que también desempeña funciones en el núcleo celular y en la formación del ovario. La intervención de este camino de señales en la morfogénesis del ovario ha sido demostrada experimentalmente en ratones XY, que revierten hacia la formación de ovario cuando se estabilizan las cateninas beta.[42]

Estos nuevos conocimientos permitirían explicar los casos de reversión del sexo XY hacia ovario en la especie humana (panel 10-3) y también la formación de ovotestes en el hermafroditismo verdadero humano (muy infrecuente, véase más delante)

Alteracianes genéticas de la determinación sexual: varones XX

Este tipo de pacientes no es excesivamente raro, puesto que se ha deducido que aparecen en la proporción de 1 en 20.000 nacimientos.[45] Tienen apariencia masculina, orientación sexual normal de varón, testículos pequeños, con azoospermia (falta de espermatozoides), generalmente con presencia de células de Sertoli solas en los túbulos seminíferos, nivel normal o bajo de andrógenos y caracteres sexuales secundarios masculinos, pero algo disminuidos. Su talla es ligeramente menor a la esperada de acuerdo con los familiares consanguíneos (y ello lo diferencia del síndrome de Klinefelter XXY, que por lo demás es muy parecido) y la longitud de los dientes permanentes es significativamente menor que en los varones normales consanguíneos (factor de desarrollo dentario en el Y; el gen amelogenina Y se expresa, aunque sólo un 10% comparado al *AMEL X*) Estos pacientes presentan un cariotipo aparente de una mujer normal, 46,XX, pero el uso de sondas de ADN permitió rápidamente definir el origen de la mayoría de estos pacientes: tienen ADN del cromosoma Y insertado en un cromosoma X, más específicamente, un 69% de estos pacientes portan un segmento de ADN del cromosoma Y, que puede contener el gen *SRY* El mecanismo de inserción del ADN del cromosoma Y en un cromosoma X se ha podido demostrar en una serie de estos pacientes: se debe a un error en la meiosis de *su padre*, en la cual –al aparearse el cromosoma Y con el X– se produjo un "crossing-over" o recombinación génica fuera de la región (RPA) donde este fenómeno sucede normalmente, es decir fuera de la región seudoautosómica (véase antes) Si la recombinación, en vez de ocurrir en la RPA, se corre un poco hacia el centrómero, *hay un gran riesgo de que involucre al gen SRY*, dado que este gen está localizado muy cerca de la RPA (5 kb) (fig. 10-15)

Por consiguiente, la mayoría de los varones XX son el producto de la transferencia de un segmento del ADN del Y paterno que contiene el gen SRY; de allí su parecido con el síndrome de Klinefelter (son XX + ADN del Y)

Sin embargo, hay una minoría de varones XX en los cuales las sondas del cromosoma Y no dan positivas. En este grupo se incluyen *casos de incidencia familiar*, ya sea de varones XX o de hermafroditas y varones XX, lo cual sugiere la transmisión de un gen mutado. Casos similares se ven en algunos mamíferos, y se ha sugerido que en ellos existe una mutación de otro gen –diferente del *SRY*– que está integrado a la cascada reguladora de la determinación sexual.

Mujeres "XY"

Como puede apreciarse en la figura 10-15, cada vez que una recombinación anómala pro-

Panel 10-3. La displasia campomélica. El gen *SOX9* y los efectos de sus mutaciones: reversión sexual y displasias congénitas

Panel

Fig. 1. Radiografía de un caso de displasia campomélica (de Silverman FN, Kuhn S. Essentials of Caffey's Pediatric X-ray Diagnosis, fig. 21-139 [(B]), con autorización de la Editorial Médica Panamericana).

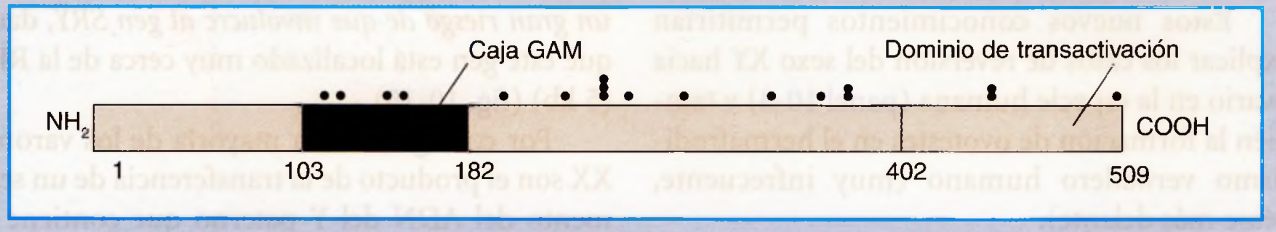


Fig. 2. Proteína codificada por el gen *SOX9*. Algunas de las mutaciones de la displasia campomélica con reversión sexual se señalan encima de la proteína.

La displasia campomélica (de *kamptos*: curvo, y *melos*: miembro) es un cuadro de malformaciones congénitas graves, caracterizado por deformidades de los miembros (los huesos largos están arqueados y son cortos y delgados), paladar hendido y malformaciones de las costillas, la columna y la pelvis (fig. 1). La muerte se produce en el período perinatal, por dificultades respiratorias debidas a las malformaciones del tórax y de los cartílagos traqueales. En un 75% de los casos de displasia campomélica se verifica que los bebés presentan ovotestis, gónadas rudimentarias o genitales ambiguos, a pesar de poseer un cariotipo 46,XY, es decir que se ha producido una reversión del sexo masculino al femenino, lo cual originó interés en los genetistas.[43] El gen responsable de la displasia campomélica fue localizado en el cromosoma 17q24.3-q25, por su asociación con translocaciones en el cromosoma 17. Cuando este gen fue clonado se encontró que presentaba una región muy parecida a la caja ("box") GAM del gen *SRY* (véase el texto principal), de modo que este gen, al igual que otros que también fueron descritos con esta "caja", forman parte de una "familia" de genes, relacionados todos con el *SRY*, por tener todos esa "caja"; de modo que los genes de esta familia son llamados *SOX* (de *SRY-related, box*). El gen de la displasia cam-

pomélica es el *SOX9*, y a pesar de poseer una "caja" GAM (grupo de alta movilidad = HMG) como el *SRY*, es bastante más complejo, puesto que tiene dos intrones y tres exones (el *SRY* es monoexónico, como otros genes *SOX*) y codifica una proteína de 509 aa (fig. 2), que tiene las características de un "factor de transcripción", con una región ligante de ADN (la caja GAM) y un dominio "de transactivación" adyacente a un grupo de poliglutaminas en el extremo carboxilo.[44] En enfermos de displasia campomélica se han encontrado mutaciones en el gen *SOX9*, que pueden corresponder a cualquiera de los dominios de la proteína, y esta mutación es heterocigótica, de modo que es dominante; su efecto dominante se atribuye a "insuficiencia haploide".[44] Este gen *SOX9* se expresa en las células formadoras de cartílago, pero también se expresa en la gónada embrionaria, inmediatamente después del *SRY*, por lo cual se le asigna un papel decisivo en la formación de testículo, y además porque está conservado en aves y mamíferos.

duce la transferencia de un segmento del cromosoma Y (incluido el gen *SRY*) al cromosoma X, se produce un cromosoma X que porta el segmento del Y; como contrapartida, porque la recombinación es recíproca, se produce un cromosoma Y que lleva un segmento del X, *sin gen SRY*, y sería dable esperar que un gameto con este Y, al fertilizar un ovocito con X normal, pro-

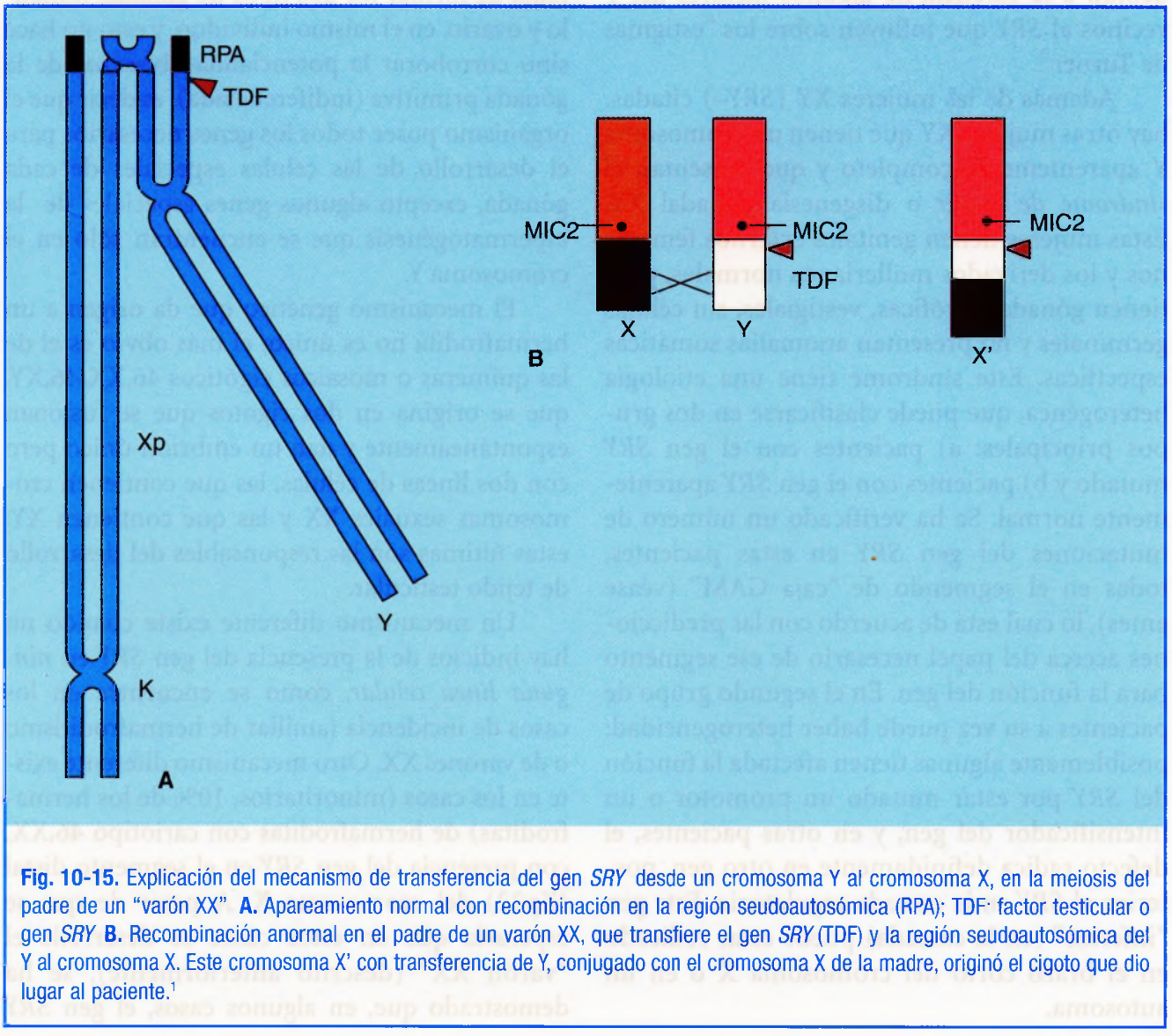


Fig. 10-15. Explicación del mecanismo de transferencia del gen *SRY* desde un cromosoma Y al cromosoma X, en la meiosis del padre de un "varón XX" **A.** Apareamiento normal con recombinación en la región seudoautosómica (RPA); TDF· factor testicular o gen *SRY* **B.** Recombinación anormal en el padre de un varón XX, que transfiere el gen *SRY* (TDF) y la región seudoautosómica del Y al cromosoma X. Este cromosoma X' con transferencia de Y, conjugado con el cromosoma X de la madre, originó el cigoto que dio lugar al paciente.[1]

duzca un cigoto XY, pero sin gen *SRY*, que por consiguiente no forma testículo y (por defecto) da el sexo constitutivo, femenino, es decir una "mujer XY" La existencia de este tipo de mujeres XY fue verificada por la experiencia. Hay un pequeño número de casos de mujeres que presentan un cromosoma Y pero sin el gen *SRY*, y frecuentemente desprovisto de otros segmentos vecinos al *SRY*, que probablemente inciden en otros aspectos fenotípicos de esas mujeres XY. En efecto, en su mayoría presentan "estigmas de Turner" cuello corto con pliegues laterales cutá neos ("pterigium colli"), implantación baja del cabello, linfedema, baja estatura, anomalías de órganos internos y una mortalidad embrionaria alta. Se ha sugerido que la desproporción entre mujeres XY (sin *SRY*) y varones XX se debe a la mayor mortalidad embrionaria de las primeras, debido a la carencia de algunos factores del Y vecinos al *SRY* que influyen sobre los "estigmas de Turner"

Además de las mujeres XY (*SRY*–) citadas, hay otras mujeres XY que tienen un cromosoma Y aparentemente completo y que presentan el *síndrome de Swyer* o disgenesia gonadal XY. Estas mujeres tienen genitales externos femeni nos y los derivados müllerianos normales, pero tienen gónadas atróficas, vestigiales, sin células germinales y no presentan anomalías somáticas específicas. Este síndrome tiene una etiología heterogénea, que puede clasificarse en dos gru pos principales: a) pacientes con el gen *SRY* mutado y b) pacientes con el gen *SRY* aparentemente normal. Se ha verificado un número de mutaciones del gen *SRY* en estas pacientes, todas en el segmendo de "caja GAM" (véase antes), lo cual está de acuerdo con las predicciones acerca del papel necesario de ese segmento para la función del gen. En el segundo grupo de pacientes a su vez puede haber heterogeneidad. posiblemente algunas tienen afectada la función del *SRY* por estar mutado un promotor o un intensificador del gen, y en otras pacientes, el defecto radica definidamente en otro gen, posterior al *SRY* en la cascada regulatoria. Este gen "inferior" (en la cascada) puede estar radicado en el brazo corto del cromosoma X o en un autosoma.

Hermafroditas verdaderos

Se define como hermafrodita verdadero un individuo en el cual coexisten el tejido ovárico y el tejido testicular. Se han recopilado 409 casos,[46] que muestran que el hermafroditismo lateral un ovario en un lado del cuerpo y un testículo del otro lado) es el tipo más frecuente, aunque también es frecuente la presencia de ovotestis, es decir una gónada donde coexisten túbulos seminíferos y tejido ovárico (panel 10-4)

Desde el punto de vista cromosómico, la mayoría de los hermafroditas tienen dos cromosomas X (59,5% del total de los hermafroditas), pero también hay mosaicos 46,XX/46,XY (12,8%) y hermafroditas 46,XY (12,3%) Estos casos muestran que el organismo humano (como el de otros vertebrados) posee la *potencialidad* de formar los dos tipos de gónada, testícu lo y ovario, en el mismo individuo, y esto no hace sino corroborar la potencialidad bisexual de la gónada primitiva (indiferenciada), es decir que el organismo posee todos los genes necesarios para el desarrollo de las células especiales de cada gónada, excepto algunos genes especiales de la espermatogénesis que se encuentran sólo en el cromosoma Y.

El mecanismo genético que da origen a un hermafrodita no es único; el más obvio es el de las quimeras o mosaicos cigóticos 46,XX/46,XY, que se origina en dos cigotos que se fusionan espontáneamente y dan un embrión único pero con dos líneas de células, las que contienen cromosomas sexuales XX y las que contienen XY; estas últimas son las responsables del desarrollo de tejido testicular.

Un mecanismo diferente existe cuando no hay indicios de la presencia del gen *SRY* en *ninguna línea celular*, como se encuentra en los casos de incidencia familiar de hermafroditismo o de varones XX. Otro mecanismo diferente existe en los casos (minoritarios, 10% de los herma froditas) de hermafroditas con cariotipo 46,XX, con presencia del gen *SRY* en el segmento distal (Xp22) del cromosoma X. A pesar de que se esperaría que en estos casos se desarrolle el "varón XX" (descrito anteriormente), se ha demostrado que, en algunos casos, el gen *SRY*

Panel 10-4. Hermafroditismo verdadero

Panel

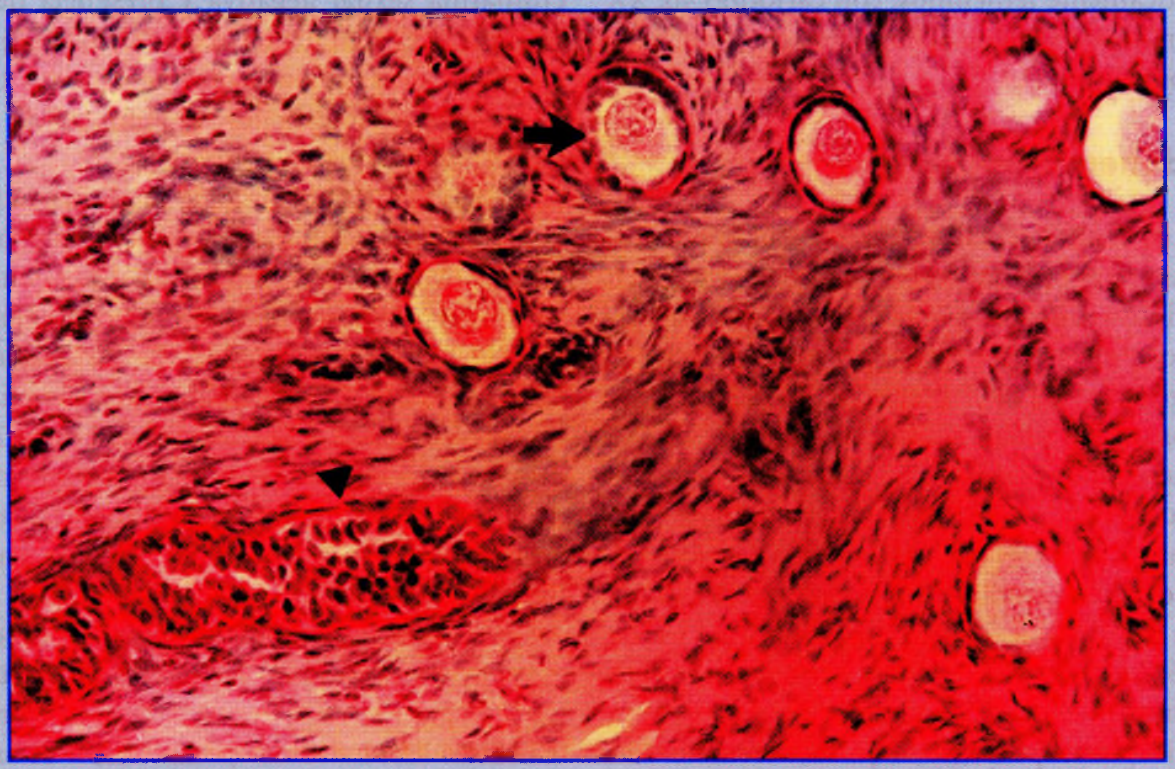


Fig. 1. Corte histológico de la biopsia de un ovotestis en una paciente con hermafroditismo verdadero. Se observan folículos ováricos (*flecha*) y túbulos seminíferos (triángulo) en el mismo campo (gentileza de la doctora V. Adámoli).

En la especie humana los hermafroditas verdaderos son muy raros (véase el texto principal), pero de excepcional interés para la Genética, puesto que demuestran la bipotencialidad de la gónada primitiva. Por definición, un hermafrodita posee simultáneamente tejido testicular y ovárico, ya sea en gónadas separadas o en una misma gónada ("ovotestis") (fig. 1). La mayoría de los hermafroditas verdaderos tienen un cariotipo 46,XX y no poseen el gen *SRY* en ningún tejido.[47] En algunos de estos casos ha sido posible demostrar la transmisión de un gen mutado responsable de la formación de tejido testicular sin la presencia del gen *SRY*, es decir, "más abajo" del *SRY* en la cascada regulatoria del desarrollo testicular. Aún no ha sido aislado el gen mutado en estos hermafroditas, de modo que se desconocen sus relaciones con el gen *SOX9* (véase el panel anterior) y también con el hipotético gen localizado en el brazo corto del X, el cual en algunas duplicaciones de segmentos de este brazo se asocia con reversión del sexo masculino al femenino; además este gen sería "sensible a dosis génica": DSS (de *Dosage-Sensitive, Sex reversal*) y probablemente corresponde a una proteína receptora hormonal del núcleo que también está relacionada con el desarrollo de la adrenal (DAX1).

translocado al X en las cercanías del gen *STS* (gen de la sulfatasa esteroidal), puede inactivarse (lionizarse) al azar en ciertas células del linaje gonadal, por consiguiente, se produce un "mosaicismo funcional" de dos líneas celulares, las X*Xsry con el gen *SRY* activo y las XX*sry con inactivación (señalada por el asterisco) del X portador del gen *SRY*; la mezcla de estas dos líneas celulares en la gónada primitiva determina la formación de un ovotestis.

Finalmente, es significativo recalcar que se han registrado por lo menos nueve casos de hermafroditas fértiles; en todos ellos, los hermafroditas (aparte de poseer tejido testicular) eran somáticamente femeninos, con cariotipo 46, XX y buen desarrollo ductal femenino, y dieron a luz criaturas normales.[48]

Seudohermafroditismos

Los seudohermafroditismos son anomalías del desarrollo sexual en las cuales hay un único y definido tipo de gónada, pero algunos elementos del fenotipo sexual no coinciden con el tipo gonadal del paciente; es decir que son trastornos que se hallan en una etapa posterior a la del desarrollo gonadal. Se clasifican según el tipo de gónada existente, en *masculinos* (hay testículo) y *femeninos* (hay ovario), y pueden ser de causa genética (frecuentemente) o de causa ambiental (p. ej , administración de andrógenos a una embarazada con un feto femenino) Entre los masculinos y de causa genética, es importante el ya mencionado *síndrome de feminización testicular*, en sus variedades completa o incompleta, debido a mutaciones del gen del receptor de andrógenos *RA*. El aspecto de estas pacientes es muy femenino y generalmente carecen de vello pubiano y axilar, con buen desarrollo mamario, distribución femenina del tejido adiposo, vagina corta y ciega, ausencia de útero y trompas, presencia generalmente *inguinal* de testículos de tipo criptorquídico, caracteres sexuales secundarios femeninos, orientación sexual femenina y sexo de asignación femenino, con cariotipo 46,XY, cromatina sexual negativa y presencia del gen *SRY* normal. Dado que más del 10% de estas pacientes desarrollan espontáneamente tumores malignos del testículo, está indicada la extirpación quirúrgica de las gónadas.

Otro tipo importante de seudohermafroditismo genético, esta vez *femenino*, es el producido por la hiperplasia suprarrenal congénita o síndrome adrenogemtal) en fetos femeninos, que lleva a grados variables de virilización de estas pacientes. El principal origen genético de esta afección es la mutación del gen de la 21 hidroxilasa, localizado cerca del complejo mayor de histocompatibilidad, en el brazo corto del cromosoma 6. La mutación bloquea parcialmente la producción de hidrocortisona en la corteza adrenal, provocando una superproducción de la hormona hipofisaria estimulante (ACTH), que sobreestimula la región interna de la corteza adrenal con hipersecreción de andrógenos, causantes de la virilización. Otra mutación de un gen diferente, el de la 11 hidroxilasa, localizado en el cromosoma 8 (8q21), aunque con menor frecuencia, también provoca esta virilización. Estos ejemplos son sólo parte de una lista de defectos génicos que afectan las diferentes etapas del desarrollo sexual y que se estudian en detalle en la endocrinología sexual.

RESUMEN

El desarrollo sexual humano es un proceso complejo que comprende un número significativo de genes presentes en los dos sexos, necesarios para el desarrollo de los tejidos testiculares y ováricos. Este proceso está dirigido por una simple decisión binaria (con sólo dos opciones): la actividad (o la falta de actividad) del gen llamado "región sexual del Y" o *SRY*; en el caso de que haya actividad del *SRY* (que casi siempre coincide con la presencia de un cromosoma Y), la gónada primitiva del embrión humano de siete semanas se organiza como testículo, y a partir de allí se activan otros genes, como el del gen *SOX9*, el de la hormona antimülleriana (HAM), que determina a su vez el destino de los conductos genitales; también, la permanencia en actividad del gen *FS1* permite el desarrollo de la secreción de andrógenos por el testículo fetal, los que a su vez, encontrando activos el gen normal del receptor de andrógenos *RA* y el gen conversor de testosterona a dihidrotestosterona (5α-reductasa) en el esbozo de genitales externos, inducen la masculinización de éstos.

Si el gen conmutador sexual *SRY* no está presente o está inactivado, el camino de desarrollo obligatorio (constitutivo) es el femenino, con una conversión de la gónada primitiva (indiferenciada) en ovario alrededor de la novena semana y la entrada en meiosis de las células germinales. Varios errores genéticos que son poco o muy poco frecuentes dan lugar a "varones XX", "mujeres XY", hermafroditas verdaderos y seudohermafroditismos, entre otros. Los cromosomas sexuales X e Y son muy diferentes, excepto en la pequeña región (2,6 Mb) llamada recombinante y seudoautosómica, que posee sólo unas dos docenas de genes comunes a ambos cromosomas. La región "diferencial" del Y posee el gen *SRY* y un grupo de genes relacionados con la fertilidad masculina. La región diferencial del X posee un gran número de importantes genes, todos "ligados al sexo" (ligados al X) tales como los genes de los pigmentos visuales, los factores VIII y IX de la coagulación, etcétera. El "cuerpo XY" es distintivo de los espermatocitos en paquitene y está formado por la cromatina transcripcionalmente inactivada de los cromosomas X e Y, que contiene proteínas especiales como la gamma-H2AX. El gen "blanco" del *SRY* es el *SOX9*, que permanece activo para el desarrollo testicular e induce la actividad de los demás genes de la cadena masculina. Para la formación del ovario existen dos vías principales: la iniciada por el factor de transcripción FOXL2 y la iniciada por la proteína RSPO1; esta última se continúa con el camino WNT ("Wint") y la beta catenina. Los hermafroditas verdaderos son muy infrecuentes en la especie humana y mayoritariamente son de fórmula XX, y no tienen el gen *SRY*.

REFERENCIAS

1 Solari AJ. Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates.Boca Raton: CRC Press, 1993.

2. Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP Studies on sex differentiation in mammals. Recent Prog Horm Res 1973;29:1-41

3 Ford CE, Jones KW, Polani PE, et al. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner syndrome). Lancet 1959;I:711 713.

4. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. Nature 1959, 183:302-303.

5. Schlessinger D, García Ortiz, JE, Forabosco A, et al. Determination and stability of gonadal sex. J Androl 2010, en prensa.

6. Van Wyk JJ, and Grumbach MM. Disorders of sex Differentiation. In: Williams RH. (ed), Textbook of Endocrinology. Philadelphia: WB Saunders Co., 1968.

7 Jirasej JE. The relationship between differentiation of the testicle, genital ducts and external genitalia in fetal and postnatal life. In: E Rosemberg, A Paulsen (eds.). The Human Testis. New York: Plenum Press, 1970;19-30.

8. Magre S, Jost A. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat. J Electron Microsc Techn 1991·19:172-188.

9. Merchant-Larios H, Taketo T. Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. J Electron Microsc Techn 1991·19:158-171
10. Koopman P Münsterberg A, Capel B, Nigel V, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. Nature 1990; 348:450-452.
11 Palmer SJ, Burgoyne PS. In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. Development 1991·112:265-268.
12. Koopman P Gubbay J, Vivian N, Goodfellow PN, Lovell Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 1991;351·117 121
13. McLaren A. Primordial germ cells in mice. Bibithca Anatom 1983; 24:59-66.
14. Rossi P Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P Geremia R. Direct evidence that the mouse sex-determining gen Sry is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. Molec Reprod Devel 1993; 34:369-373.
15. Eddy EM, Clark JM, Gong D, Fenderson BA. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. Gamete Res 1981 4:333.
16. Greenbaum MP Iwamori N, Agno JE, Matzuk MM. Mouse TEX14 is required for embryonic germ cell Intercellular bridges but not female fertillkty. Biol Reprod 2009;80:449-457
17 Voutilainen R. Differentiation of the fetal gonad. Horm Res 1992;38:(Suppl. 2) 66-71
18. Kocer A, Reichmann J, Best D, Adams IR. Germ cell sex determination in mammals. Mol Hum Reprod 2009;15:205-213.
19. Kurllo LF Oogenesis in antenatal development in man. Hum Genet 1981;57:86-92.
20. Solari AJ. The behaviour of the XY pair in mammals. Int Rev Cytol 1974;38:273-317
21 Solari AJ, Tres LL. The three-dimensional reconstruction of the XY chromosomal pair in human spermatocytes. J Cell Biol 1970; 45:43-53.
22. Solari AJ. Synaptic behaviour and recombination nodules in the human XY pair. Genetica 1988;77·149-158.
23. Franco MJ, Sciurano RR, Solari AJ. Protein immunolocalization supports the presence of identlcal mechanisms of XY body formation in eutherians and marsupials.Chrom Res 2007·15:815-824.
24. Sciurano BR, Rahn MI, Pigozzi MI, Brugo Olmedo S, Solari AJ. An azoospermic man with a double-strand DNA break-processlng deficiency in the spermatocyte nuclei. Hum Reprod 2006;21·1194-1203.
25. Cooke HJ, Brown WRA, Rappoid GA. Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. Nature 1985;317:687-692.
26. Rappold GA. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. Hum Genet 1993;92:315-324.
27 Flaquer A, Rappold GA, Wienker TF Fischer C. The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologists. Eur J Hum Genet 2008;1 1-9.
28. Skaletzky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature 2003;423:825-837
29. Morton NE. Parameters of the human genome. Proc Nati Acad Sci USA 1991;88:7474-7476.
30. Vease http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/
31 Sinclair AH, Berta P Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sexdetermining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 1990;346:240-244.
32. Su H, Lau CYF Identification of the transcriptional unlt, structural organization and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene using a reverse genetic approach. Am J Hum Genet 1993; 52:24-38.
33. Harley VR, Goodfellow PN. The biochemical role of SRY in sex determination. Mol Reprod Dev 1994;39:184-193.
34. McElreavey K, Vilain E, Cotinot C, Payen E, Fellous M. Control of sex determination in animals. Eur J Biochem 1993;218: 769-783.
35. Haqq CM, Klng CY, Ukiyama E, Falsafi F Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA. Molecular basis of mammaiian sexual determination: Activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. Science 1994;266:1494-1500.
36. Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. Curr Op Genet Dev 2003;13:170-178.
37 Graves JAM. The rise and fall of SRY. Trends in Genet 2002; 259-264.
38. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific *SOX9* enhancer. Nature 2008;453:930-934.
39. Piprek RP Genetic mechanisms underiying male sex determination in mammals. J Appl Genet 2009;50:347-360.
40. Nef S, Vasalli J-D. Complementary pathways in mammaiian female sex dcetermination. J Biol 2009;8:74-41
41 Duffin K, Bayne RAL, Childs AJ, et al. The forkhead transcriptiuon factor FOXL2 is expressed in somatic cells of the human ovary prior to follicle formation. Mol Hum Reprod 2009;12:771 777
42. Maatouk DM, DiNapoll L, Alvers A, et al. Stabillzatiuon of β catenln in XY gonads causes male-to-female sex reversal. Hum Molec Genet 2008;17:2949-2955.

43. Schafer AJ, Goodfellow PN. Sex determination in humans. BioEssays 1996;18:955-962.
44. Cameron FJ, Sinclair AH. Mutations in SRY and SOX9: Testis-determining genes. Hum Mutation 1997;9:388-395.
45. De la Chapelie A. The etiology of maieness in XX men. Hum Genet 1981;58:105-116.
46. Van Niekerk WA, Retief AE. The gonads of human true hermaphrodites. Hum Genet 1981;58:117 122.
47 Ramos ES, Moreira-Fiiho CA, Vicente YAM, Llorach-Veiludo MA, Tucci S, Duarte MH, Araujo AG, Martelli M. SRY-negative true hermaphrodites and an XX male in two generations of the same family. Hum Genet 1996;97:596-598.
48. Verp MS, Harrison HH, Ober C, Oliveri D, Amarose AP Lindgren V, Taierman A. Chimerism as the etiology of a 46,XX/46,XY fertile true hermaphrodite. Fertil Steril 1992;57:346.

43. Schafer AJ, Goodfellow PN. Sex determination in humans. BioEssays 1996;18:955-963.
44. Cameron FJ, Sinclair AH. Mutations in SRY and SOX9: Testis-determining genes. Hum Mutation 1997;9:388-395.
45. De la Chapelle A. The etiology of maleness in XX men. Hum Genet 1981;58:105-116.
46. Van Niekerk WA, Retief AE. The gonads of human true hermaphrodites. Hum Genet 1981;58:117-122.
47. Ramos ES, Moreno-Filho CA, Vicente YAM, Llorach-Velludo MA, Tucci S, Duarte MH, Araujo AG, Marchi M. SRY-negative true hermaphroditism and an XX male in two generations of the same family. Hum Genet 1998;97:586-588.
48. Verp MS, Harrison HH, Ober C, Oliveri D, Anspree AP, Lindgren V, Talerman A. Chimerism as the etiology of a 46,XX/46,XY fertile true hermaphrodite. Fertil Steril 1982;37:346.

Capítulo 11

Ligamiento. Genes ligados al sexo y fenómenos de compensación de dosis

Base física del ligamiento entre genes y su ruptura. la recombinación génica. Grupos y mapas de ligamiento. Marcadores polimórficos. Enfermedades ligadas al sexo (o al X). Genes de la distrofina, de los factores VIII y IX de la coagulación, de las enzimas G6PD, de HPRT y de IDS. Genes de los pigmentos retinianos. Inactivación del cromosoma X (lionización) y su mecanismo

INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito en los capítulos anteriores, una de las propiedades fundamentales del ADN es su capacidad de corte y repegado, que hace posibles las manipulaciones de la "ingeniería genética" (cap. 3) mediante las cuales segmentos de ADN pueden insertarse, sacarse o intercambiarse. Desde un punto de vista macroscópico, esto se traduce en la posibilidad de intercambio de los genes de los cromosomas por otros genes diferentes, conservando como *unidad morfológica y funcional* a esos cromosomas con contenido cambiado en uno o más genes.

En los organismos vivos, el ADN nuclear sufre naturalmente tales procesos de corte y repegado, en grado especial en las células germinales, en un tiempo y forma muy precisamente regulados: durante el período de paquiteno de la meiosis (véase cap. 12) En esa etapa ocurren los procesos de recombinación meiótica de genes, que es obligada para cada par de cromosomas humanos (recordemos que uno de los miembros de cada pareja cromosómica proviene del padre y el otro de la madre) Sin embargo, la recombinación meiótica está estrictamente regulada, de tal manera que afecta sólo a la mitad de las cromátidas en cada recombinación, y el número de recombinaciones por cromosoma humano no es alto (en promedio algo más de dos) (véase cap. 12) Por consiguiente, existe una probabilidad muy significativa de que cada molécula de ADN (es decir, cada cromátida) conserve su integridad y sea transferida como tal a uno de los hijos. Se denomina *ligamiento* a la propiedad o tendencia que tienen los genes que se hallan en el mismo cromosoma a permanecer juntos, en el paso de una generación a la siguiente. El *ligamiento* entre dos genes no es otra cosa que el reflejo de que son segmentos *de la misma molécula de ADN* (cromátida) Dos genes ubicados en cromosomas diferentes, por ejemplo el gen *RA* (véase cap. 10), que se encuentra en el cromosoma X, y el gen *RTFQ* (de fibrosis quística) (véase cap. 9), que está localizado en el cromosoma 7, no están ligados ni podrían estarlo, puesto que pertenecen a moléculas diferentes de ADN (cromosomas X y 7) En la transmisión de padres a hijos, estos dos genes se distribuyen *independientemente* el uno del otro, y las enfermedades o rasgos que son determinados por estos dos genes no aparecen asociados entre sí, más allá de los límites de la pura casualidad, que puede calcularse por méto-

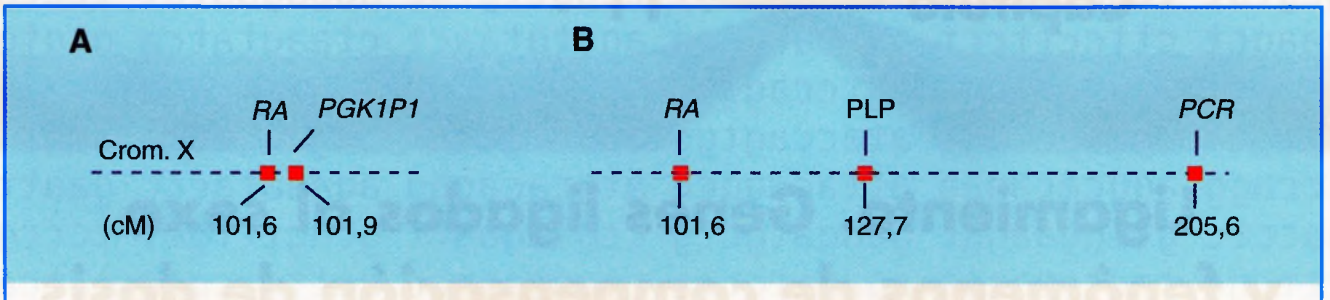


Fig. 11-1 **A.** Genes estrechamente ligados: el del receptor de andrógenos (*RA*) y el de la fosfogliceratoquinasa (*PGK1P1*). **B.** Genes débilmente ligados: el del *RA* y el de la proteína proteolipídica (enfermedad de Pelizaeus); genes no efectivamente ligados: el del *RA* y el del pigmento rojo de conos retinianos (*PCR*), en el cromosoma X humano. Todos estos genes son "sinténicos": están en el mismo cromosoma; las diferencias de ligamiento se deben a diferencias de distancia. Los números que están debajo de cada gen indican "distancias génicas" en centimorgans (cM) desde el extremo seudoautosómico del cromosoma X (datos de Wang y cois., 1994).[1]

dos estadísticos. Es decir que genes localizados en cromosomas diferentes se distribuyen a la siguiente generación de acuerdo con la segunda ley de Mendel, de la distribución independiente de caracteres hereditarios. Por el contrario, los genes localizados en el mismo cromosoma presentan *un grado variable de ligamiento*, desde muy alto hasta nulo, y que es proporcional a la cercanía relativa de los dos genes en la molécula de ADN cuanto más cercanos entre sí están los segmentos (genes) del ADN, mayor es su *ligamiento*; y viceversa, cuanto más lejanos están los segmentos, más débil es su *ligamiento*. Esta dependencia de la distancia se debe a que cuanto mayor es el trecho que separa dos segmentos de ADN, mayor es la probabilidad de que en ese intervalo ocurra un corte del ADN y un intercambio génico y, por consiguiente, es menor la probabilidad de que continúen ligados. Esta relación entre distancia y ligamiento es la base de los *mapas génicos por ligamiento*. Todos los genes situados en un mismo cromosoma se llaman "sinténicos" (etimológicamente, en filamento único) Los genes sinténicos, por ejemplo todos los del cromosoma X, pueden presentar grados variables de ligamiento, incluso ausencia de ligamiento (cuando se encuentran lejos uno del otro, y en promedio hay una recombinación entre ellos) (fig. 11 1)

Históricamente, el *ligamiento de genes* fue descubierto en 1906, por W Bateson y R. C. Punnet, mucho antes de que se conociera su vinculación con la molécula de ADN y su relación con la meiosis, en las cruzas experimentales de plantas. El ligamiento de caracteres, o asociación en la descendencia, más allá de la pura casualidad, contradecía la segunda ley de Mendel (porque ésta se refiere sólo a genes localizados en cromosomas diferentes) El carácter variable del ligamiento se debe a la recombinación meiótica de los cromosomas; el reconocimiento de estos hechos permitió la realización de los primeros mapas de genes en *Drosophila* en 1913

Los estudios de ligamiento en la especie humana fueron lentos (excepto para el cromosoma X) hasta los recientes desarrollos de la Genética Molecular. En los últimos años del siglo XX, los estudios de ligamiento humano han hecho aportes decisivos para el Proyecto Genoma Humano y, esencialmente, para el aislamiento o clonado ("posicional") de genes humanos y para el desarrollo de métodos de diagnóstico. Si bien los métodos de estudio del ligamiento humano no están al alcance del médico general, sus resultados serán resumidos en este capítulo, junto con los fenómenos propios del cromosoma X (compensación de dosis), la impronta génica y algunos de los genes ligados al cromosoma X.

Bases físicas del ligamiento variable entre genes

El corte y repegado de ADN puede producirse entre dos moléculas idénticas de ADN, tales como las cromátidas hermanas en un cromosoma (que son idénticas por ser copias del mismo

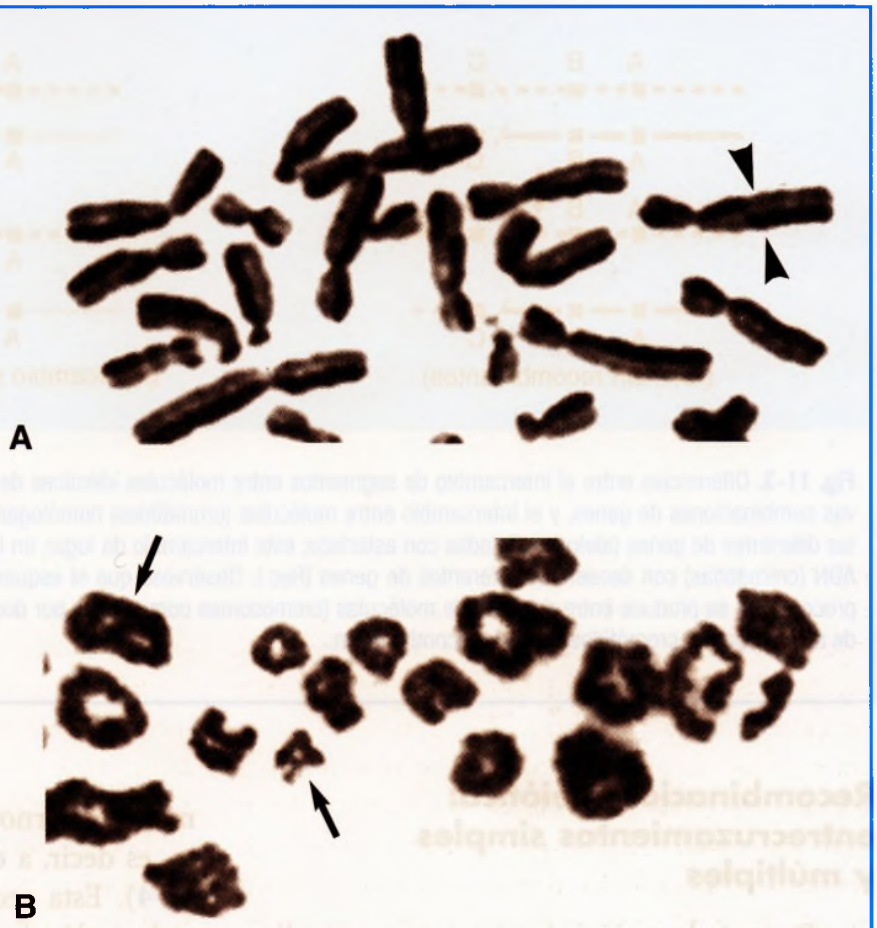


Fig. 11-2. Aspecto visible al microscopio de los dos tipos de corte y repegado del ADN: en **A**, intercambio de cromátidas hermanas (sin formación de nuevas combinaciones génicas); en **B**, quiasmas (señalados por flechas) en un par de cromosomas humanos durante la meiosis en espermatocitos. Los quiasmas representan intercambios de cromátidas homólogas (materna y paterna) y dan lugar a la recombinación génica.

original) En ese caso, el intercambio de segmentos de ADN entre las dos moléculas no entraña ningún cambio en la disposición de los genes, puesto que los segmentos intercambiados son iguales; no hay tampoco ningún efecto sobre el fenotipo en la progenie, y en realidad este tipo de corte y repegado sólo es detectable por métodos especiales que rotulen el ADN durante su replicación, se denomina a este fenómeno "intercambio entre cromátidas hermanas", abreviado ICH (SCE en inglés), y no está relacionado con el ligamiento variable entre genes (fig. 11 2A)

Por el contrario, cuando el intercambio entre moléculas de ADN se realiza entre las moléculas del cromosoma materno y el correspondiente ("homólogo") paterno, hay un cambio en la secuencia de genes, que se traduce en nuevas combinaciones visibles en la descendencia (fig. 11-3) Este tipo de intercambio entre cromosomas *homólogos* es muy poco frecuente excepto en las células germinales durante la meiosis, cuando se establece un aparato especial que favorece precisamente este intercambio genético.

Por ello, cuando se habla del grado de ligamiento entre genes, se presupone que se refiere al grado de ligamiento medido sobre la base de la recombinación meiótica. A su vez, la recombinación meiótica puede estudiarse desde dos puntos de vista. 1) mediante la asociación de rasgos en la descendencia de una pareja determinada y 2) mediante el estudio citológico de las células meióticas (en estas células cada fenómeno de recombinación se puede visualizar como un "quiasma") (fig. 11 2B) Finalmente, el estudio del ligamiento no es el único método para determinar en qué orden y a qué distancias se encuentran los genes, ya que hay métodos directos de análisis de la molécula de ADN que permiten localizar y medir los segmentos génicos ("mapas físicos" de genes); sin embargo, estos métodos requieren la secuenciación del ADN correspondiente, y por consiguiente son más laboriosos, sobre todo para distancias que no sean pequeñas.

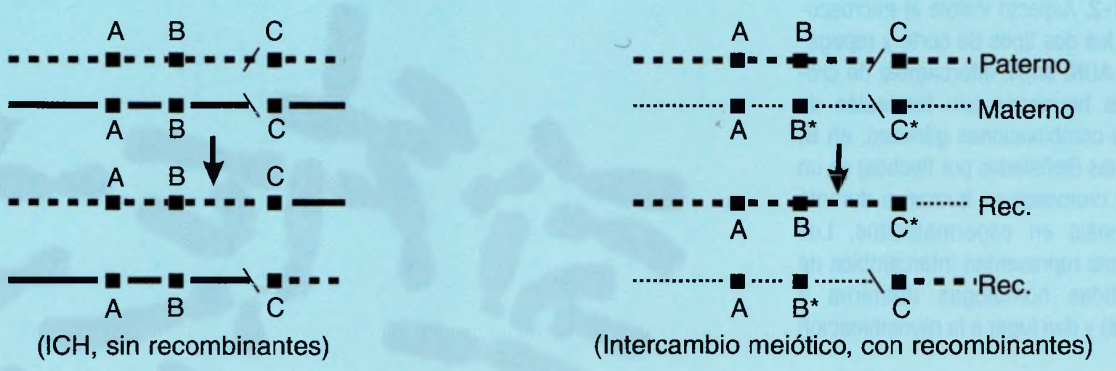


Fig. 11-3. Diferencias entre el intercambio de segmentos entre moléculas idénticas de ADN (ICH, izquierda), que no produce nuevas combinaciones de genes, y el intercambio entre moléculas (cromátidas) homólogas, materna y paterna, que contienen variantes diferentes de genes (alelos) señaladas con asterisco; este intercambio da lugar, en la meiosis, a la producción de moléculas de ADN (cromátidas) con secuencias diferentes de genes (Rec.). Obsérvese que el esquema se refiere a moléculas, mientras que el proceso real se produce entre dobletes de moléculas (cromosomas compuestos por dos cromátidas cada uno), con la intervención de sólo un par de cromátidas en cada recombinación.

Recombinación meiótica: entrecruzamientos simples y múltiples

Durante la meiosis (proceso que se analizará en detalle en el cap. 12) se produce un fenómeno específico de las células germinales (y también único del proceso meiótico) cada cromosoma proveniente de un progenitor se asocia estrechamente con el cromosoma "homólogo" proveniente del otro progenitor. Este proceso llamado "sinapsis" (cromosómica), junto con otros factores (véase cap. 12), permite un incremento notable de los fenómenos de corte y repegado del ADN entre moléculas (cromátidas) paternas y maternas, en un proceso extremadamente regulado que se denomina *entrecruzamiento* ("crossing-over"), tanto por el aspecto microscópico de las cromátidas intervinientes, como por el esquema lineal del nuevo orden de genes resultante.

Cada entrecruzamiento involucra sólo a dos de las cuatro cromátidas que componen el par de cromosomas homólogos sinapsados, de tal manera que las otras dos cromátidas permanecen como cromátidas originales, y darán lugar a moléculas de ADN sin cambios, es decir, *parentales*. Las dos cromátidas intervinientes darán lugar a moléculas de ADN que contienen un segmento paterno pegado a uno materno y viceversa, es decir, a dos moléculas *recombinantes* (fig. 11-4) Esta recombinación es *recíproca* porque cada molécula recombinante recibe un segmento exactamente igual, es decir, se intercambian segmentos iguales (sin pérdida o agregado de ni siquiera un nucleótido) Dado que el cromosoma paterno y el cromosoma materno no tienen exactamente el mismo contenido génico, sino que presentan variantes diferentes en los lugares correspondientes a muchos genes (variantes de un gen se denominan *alelos*), cada entrecruzamiento produce un nuevo ordenamiento de genes, con alelos paternos en un segmento pegado a otro segmento con alelos maternos, que en esencia es el fenómeno de la recombinación meiótica (en el caso hipotético y prácticamente imposible de que el cromosoma materno y el paterno tuvieran *igual* contenido génico –"homocigotas" perfectos–, el entrecruzamiento no daría lugar a recombinación, y se tendría un resultado similar al ICH)

En los pares de cromosomas homólogos sinapsados puede ocurrir más de un entrecruzamiento: en este caso se denominan entrecruzamientos múltiples. El número total de entrecruzamientos en cada par de cromosomas no es grande: en promedio es algo más de dos en la

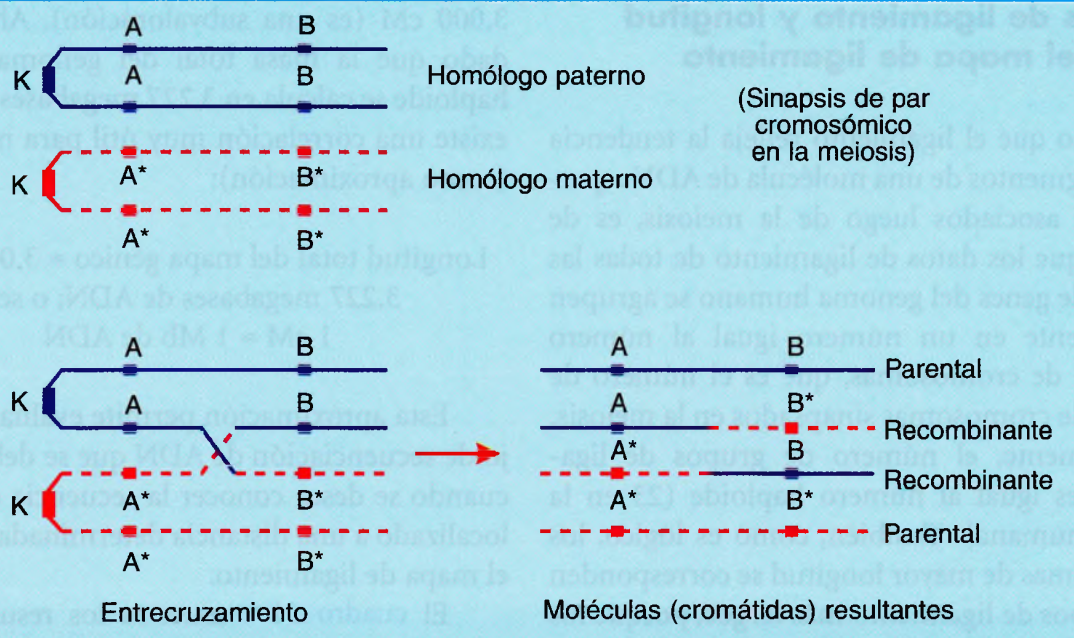


Fig. 11-4. Esquema de un entrecruzamiento meiótico y su resultado como recombinación de alelos maternos y paternos. Cada línea representa una molécula de ADN (o una cromátida de un cromosoma). Las paternas se representan con líneas continuas y las maternas son segmentadas. Se consideran sólo dos lugares génicos ("locus") en los cuales el alelo paterno y el materno son diferentes: A y B (paternos); A* y B* (maternos). A la derecha, las cuatro cromátidas (moléculas) resultantes (50% recombinantes y 50% parentales). K: centrómero.

especie humana. Esto se comprueba por el número de quiasmas, que en la meiosis humana *masculina* es en promedio, de 52 para los 23 pares de cromosomas.[2] El número promedio para el total de entrecruzamientos en la especie humana es importante porque permite definir la *longitud total del mapa de ligamiento*. Dado que un entrecruzamiento determina un 50% de moléculas recombinantes y queda otro 50% de moléculas parentales, se ha definido una unidad para la frecuencia de recombinación entre genes que es el *centimorgan* (del apellido del genetista T. H. Morgan), el cual equivale a una fracción de recombinación del 1% entre genes separados por distancias no muy grandes. Se denomina fracción de recombinación al cociente promedio entre el número de recombinantes sobre el total (parentales + recombinantes), referido a un par específico de genes. Una fracción de recombinación del 50% equivale a decir que en promedio existe un entrecruzamiento entre esos dos genes (y por consiguiente, *no están ligados*). De la misma manera, una fracción de recombinación del 1% equivale a que existe una probabilidad de 1/50 de que ocurra un entrecruzamiento entre esos dos genes, y que estos genes, en un mapa de ligamiento, están separados por un centimorgan. Las fracciones de recombinación de un par de genes varían entre 0 y 50%, y no pueden exceder de 50% porque cada entrecruzamiento afecta sólo dos de las cuatro cromátidas, y el promedio de las combinaciones parentales de alelos no es alterado por los entrecruzamientos múltiples, aunque éstos sí aumentan la longitud del mapa de ligamiento.

En estos mapas de ligamiento, dos genes separados por 50 cM o más (aunque su fracción de recombinación máxima queda limitada a 50%) *no están efectivamente ligados*. Así, en la figura 11 1, los genes *RA* y *PCR*, que están separados por 104 cM, no están ligados, a pesar de pertenecer ambos al mismo cromosoma X, porque en promedio ocurren dos entrecruzamientos en el trecho que los separa en cada meiosis, mientras que el gen *RA* y el *PLP* están ligados (débilmente), porque su separación de 26,1 cM equivale a decir que la frecuencia de un entrecruzamiento entre ellos es aproximadamente una de cada dos meiosis.

Grupos de ligamiento y longitud total del mapa de ligamiento

Dado que el ligamiento refleja la tendencia de los segmentos de una molécula de ADN a permanecer asociados luego de la meiosis, es de esperar que los datos de ligamiento de todas las parejas de genes del genoma humano se agrupen exactamente en un número igual al número haploide de cromosomas, que es el número de parejas de cromosomas sinapsados en la meiosis. Efectivamente, el número de grupos de ligamiento es igual al número haploide (23 en la especie humana) También, como es lógico, los cromosomas de mayor longitud se corresponden con grupos de ligamiento más largos, porque los cromosomas mayores tienen más entrecruzamientos, y eso hace que las distancias génicas medidas en centimorgans desde un telómero al otro sean mayores. La longitud total del mapa de ligamiento total del genoma humano (medida en centimorgans) surge simplemente del producto del número promedio de quiasmas (Nq) observado en células meióticas por la medida (media) de un entrecruzamiento (= 50 cM)

Longitud total del mapa de ligamiento:

$$N_q \times 50 = 52 \times 50 = 2.600 \text{ cM (promedio)}$$

Esta medida es válida para el varón, ya que N_q=52 (en promedio) en *espermatocitos*. En la mujer, el número (y la localización) de los entrecruzamientos es diferente, mayor que en el varón, y se calcula una longitud total del mapa de ligamiento femenino de 4.320 cM[3] en las razas blancas y un poco mayor en las africanas (cuadro 11 1) [4,5]

Algunos datos más actualizados, de 2005[5] y de 1994,[4] han confirmado que el número de entrecruzamientos en la mujer es apreciablemente más elevado que en el varón (un 50 a 60% mayor) y además han alargado apreciablemente la longitud total del mapa de ligamiento (a 3.120 cM en el varón) A pesar de la diferencia entre sexos, es de gran utilidad considerar un promedio (de sexos) para el mapa genético de ligamiento humano, y la cifra que habitualmente se usa es de 3.000 cM (es una subvaloración) Ahora bien, dado que la masa total del genoma humano haploide se calcula en 3.227 megabases de ADN,[5] existe una correlación muy útil para memorizar (como aproximación)

Longitud total del mapa génico ≈ 3.000 cM = 3.227 megabases de ADN, o sea.
1 cM ≈ 1 Mb de ADN

Esta aproximación permite evaluar el trabajo de secuenciación de ADN que se debe realizar cuando se desea conocer la secuencia de un gen localizado a una distancia determinada de cM en el mapa de ligamiento.

El cuadro 11 1 muestra los resultados del mapa de ligamiento humano en 1994, que utilizó 5.840 sitios de secuencias polimórficas del ADN humano para su construcción, y que posee una resolución promedio de 0,7 cM, con lo cual se cumplió una de las metas del Proyecto Genoma Humano en su debido tiempo, y que actualmente está superada por mapas de mejor resolución (véase en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi/) [5]

Marcadores en el estudio del ligamiento

Históricamente, el estudio del ligamiento en especies animales y vegetales se basó en cruzamientos deliberados entre organismos que contenían variedades (alelos) diferentes de un par (o más) de genes. En la especie humana el genetista sólo puede observar la descendencia de parejas que obviamente no se unen por un interés científico sobre sus genomas. Además, el número de hijos de una pareja en los tiempos actuales es pequeño, lo cual limita mucho cualquier estudio por los métodos clásicos de asociación de rasgos, a pesar del adelanto que significó el método de evaluación de "lods" (véase más adelante). El estudio actual del ligamiento de genes humanos se desarrolló mucho en los últimos años por el recurso de usar *marcadores moleculares* en el ADN

Se llaman *marcadores*, en general, aquellos segmentos de ADN cuya posición es conocida, es

Cuadro 11-1. Grupos de ligamiento humanos y sus medidas[4,5]

Cromosoma	Longitud en mujer (cM)	Longitud en varón (cM)
1	423,4	290,8
2	366,4	227 7
3	343,6	211,8
4	329,9	182,6
5	294	211,5
6	304,1	140,2
7	275,4	159,2
8	251 1	123,7
9	213,2	131 7
10	227,2	144,3
11	191,9	121,4
12	274,7	178,5
13	160,1	141 7
14	197,2	104,6
15	159,4	127,6
16	189,6	114,2
17	159,6	95
18	187,6	113,9
19	117 1	89,9
20	143,7	96,5
21	80,5	50,3
22	85,1	63,5
X	247,3	
Total	5.222,1	3.120,6

decir, se sabe a qué cromosoma corresponden y en qué región de éste se hallan. Muchos genes pueden utilizarse como marcadores, siempre que se conozcan sus posiciones y sus variantes (alelos) Sin embargo, el desarrollo explosivo de los mapas de ligamiento se debe al uso de *marcadores moleculares no génicos*, es decir, secuencias únicas y específicas del ADN de un cromosoma que no son codificantes y que son altamente variables en la población humana, es decir, que son "polimórficas" Las secuencias polimórficas de ADN usadas como marcadores pueden clasificarse en tres grupos principales: a) los polimorfismos de longitudes en fragmentos de restricción (PLFR – RFLP en inglés), b) los "minisatélites" o repeticiones en tándem de número variable (RTNV=VNTR en inglés), y c) los "microsatélites" o repeticiones de dinucleótidos (fig. 11-5) Sin embargo, todos estos marcadores han sido superados por las variantes de un solo nucleótido, denomindas SNPs (léase snips = *single nucleotide polymorphisms*) Los SNPs se usan actualmente como los

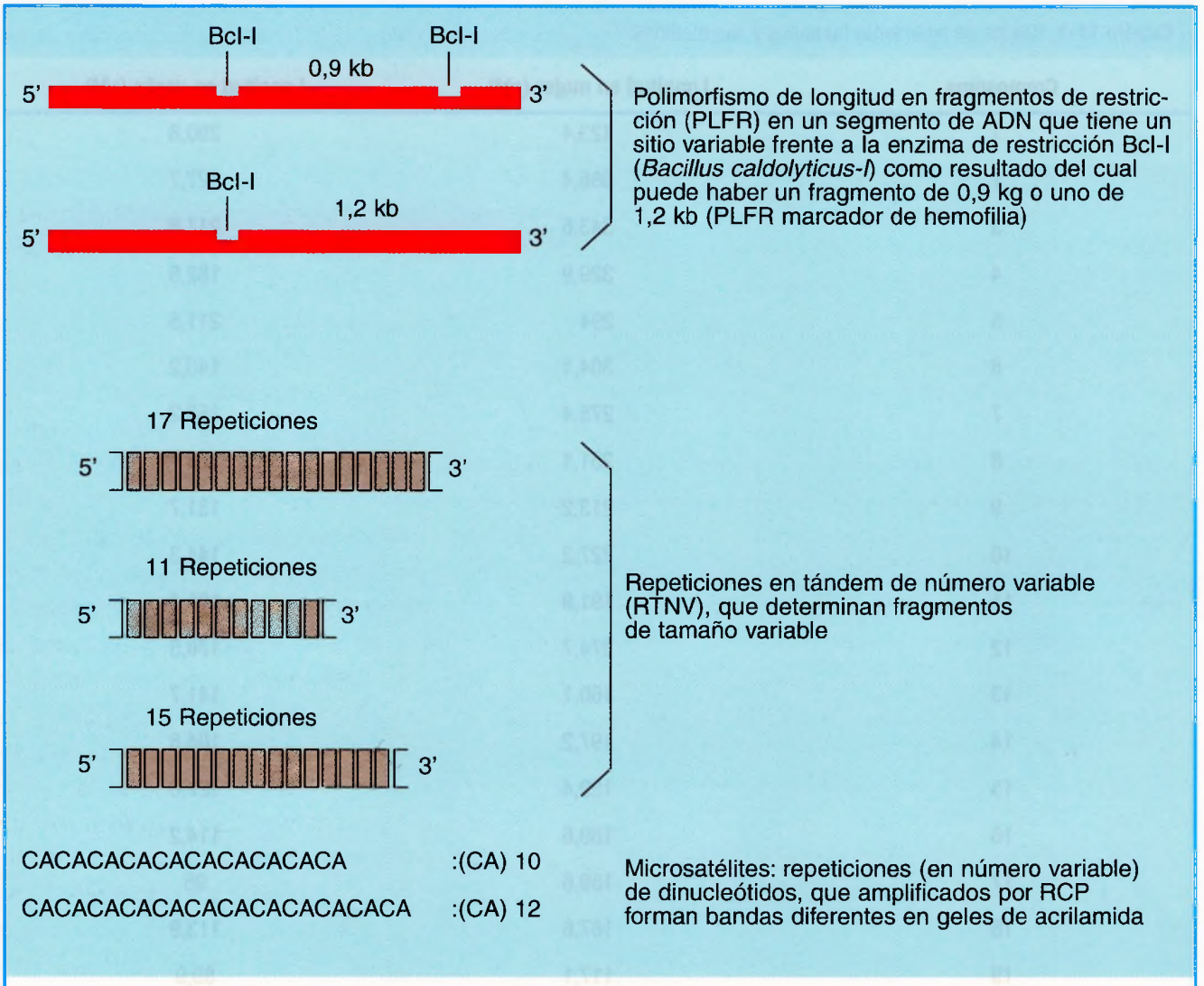


Fig. 11-5. Representación de los tres tipos básicos de "marcadores" moleculares para estudios de ligamiento, que son altamente polimórficos en la especie humana.

marcadorres de mayor utilidad en los estudios de todo el genoma (véase cap. 13)

La gran utilidad de los marcadores molecu lares para el estudio del ligamiento de genes resi de en dos características de éstos: a) son suma mente "polimórficos" en los seres humanos y b) son muy abundantes dentro del genoma huma- no. Estas dos características merecen algunos comentarios.

"Polimorfismos" en marcadores y en genes

Todo estudio de ligamiento se basa, necesa riamente, en la presencia en las poblaciones humanas, de variantes de la secuencia de bases del ADN en el mismo lugar de una molécula de ADN (– cromátida de un cromosoma) Para comprender este requisito, recordemos que si las dos cromátidas (la paterna y la materna) que intervienen en un entrecruzamiento son idénti cas en su secuencia de bases, no resulta ninguna nueva molécula (o cromátida) *recombinante.* En tal caso (como en los ICH), el estudio del liga miento es imposible. El ligamiento es detectable por variantes en los genes (p. ej., el gen normal que produce el factor VIII de la coagulación o globulina antihemofílica posee tantas variantes como mutaciones diferentes que alteran la codi ficación de esa proteína y provocan hemofilia. el

resultado es uno solo (hemofilia), pero las mutaciones son varias y diferenciables a nivel molecular. Las variantes de un gen se llaman *alelos* de ese gen, en muchas ocasiones se supone la presencia de un alelo normal (designado con el signo + en las genealogías) y uno anormal (generalmente no es único, aunque su efecto sea parecido). Desde los estudios de la genética clásica, se denomina "locus" (plural: loci, en latín) a la *posición* de un gen (sin importar cuál de los alelos la ocupa). De esa manera, se puede hablar de un locus con varios alelos posibles para el factor VIII de la coagulación. Sin embargo, los loci más útiles para estudiar un ligamiento son los polimórficos. Se entiende por polimórfico un locus cuyos alelos variantes se encuentran en la población humana con una frecuencia de *por lo menos* un 1%. Para estudios de ligamiento los loci deben ser altamente polimórficos, es decir que es necesario que las variantes sean muy frecuentes en la población, y que por lo tanto sea frecuente que una persona sea *heterocigota* (el alelo materno diferente del paterno) para ese locus (un ejemplo clásico de locus polimórfico es el de los antígenos de los grupos sanguíneos 0, A y B). Los loci de genes que muestran polimorfismos altos son, sin embargo, frecuentemente poco detectables por efectos visibles en el fenotipo humano; de allí la importancia que tomó el uso de marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares del ADN (PLRF, minisatélites o RTNV y microsatélites o repeticiones de dmucleótidos y SNPs) son todos secuencias de ADN "anónimo" sin ninguna codificación ni función conocidas), que no obstante están constantemente presentes en el genoma humano y con numerosas variantes que se encuentran en frecuencias altas en las poblaciones humanas, es decir, son *altamente polimórficas*. Si recordamos (véase cap. 8, teoría neutralista y mutación) que las secuencias de ADN no codificadoras de proteínas esenciales tienden a acumular cambios con el transcurso del tiempo, no es de extrañar que estas secuencias de ADN anónimo sean tan variables y frecuentes en la especie humana. al fin y al cabo, estas variaciones moleculares son inocuas (hasta donde se sabe) y, por lo tanto, se han acumulado variaciones con el tiempo. Dado que la especie humana es notoriamente propensa a las migraciones y al cruzamiento indiscriminado (¡a veces forzado! , la presencia de estas variantes es frecuente en la población. La utilidad de los marcadores moleculares fue señalada a partir de 1980,[6] comenzando con los PLFR, y se ha hecho cada vez más eficiente con los RTNV, los microsatélites y los SNPs. Se estima que hay alrededor de 100.000 secuencias de microsatélites (CA)n distribuidas a lo largo del genoma humano, es decir que en promedio habrá una secuencia polimórfica (CA)n cada 30 kb de ADN y, además, hay una cantidad similar de secuencias (GT)n. Desde 1994, sobre todo mediante el uso de microsatélites, el mapa de ligamiento es mucho más detallado, con una distancia promedio entre marcadores de sólo 0,7 cM[5] y actualmente bastante menor. Por eso, actualmente, cada gen humano tiene, en promedio, un marcador disponible a menos de 1 cM de distancia genética, y esto aceleró notablemente la posibilidad de aislar (clonar) y secuenciar cada gen humano importante en Medicina y actualmente facilita el estudio de la asociación de cada gen con un fenotipo. Los estudios de ligamiento se efectúan en centros especializados, como el Centre d'Étude du Polymorphisme humaine (CEPH), de París (Francia), donde se encuentran disponibles cultivos de tejidos de todas las personas integrantes de un número de familias especialmente elegidas por poseer al menos tres generaciones sucesivas para su estudio, con un número sustancial de hijos por pareja (muchas de esas familias pertenecen a grupos como los mormones y los amish, que siguen reglas estrictas en la identificación de sus descendientes y con números altos de hijos). De los cultivos, en cualquier momento está disponible el ADN respectivo de cada integrante, y esos ejemplares de ADN han sido intensamente estudiados, tanto en sus loci génicos como en sus marcadores moleculares, de modo que se constituye un "centro de referencias" para cualquier laboratorio que posea una sonda de ADN humano y desee saber su localización exacta con respecto a marcadores ya conocidos. Por otra parte, esta información está disponible en bases de datos sobre el genoma

humano y es asequible por parte de laboratorios a través de redes informáticas internacionales como la Internet.

Fases de ligamiento: acoplamiento y repulsión. Haplotipos

Cuando por medio de una genealogía se investiga si dos rasgos están ligados, existe la complicación de que los alelos investigados en los hijos de un matrimonio pueden estar ya sea en los cromosomas maternos o en los paternos y el análisis exclusivo de los hijos no permita determinar si existe tal ligamiento. El tipo informativo de matrimonio es aquél formado por un heterocigota para los dos genes, casado con un homocigota para ambos genes: considerando un gen autosómico dominante, como el de la corea de Huntington, H (presente en el extremo del cromosoma 4) y un marcador polimórfico M (o m), el cruce informativo sería:

HM/+m × +m/+m, y la posible descendencia.

HM/+m, +m/+m (tipos PARENTALES)
Hm/+m; +M/+m (tipos RECOMBINANTES),

el ligamiento entre H y M es definido por la fracción. recombinantes/totales. Sin embargo, fenotípicamente, el progenitor de constitución HM/+m no es distinguible de la constitución Hm/+M, y esta última no da las mismas proporciones de descendencia. Se denomina *fase de ligamiento* a la relación existente entre los diferentes alelos en el cromosoma materno y en el paterno de un heterocigota, en el caso referido, es necesario saber si la fase de ligamiento entre el alelo del locus H y el alelo del locus M es de "acoplamiento" o es de "repulsión".

HM/+m. en fase de "acoplamiento" (los dos dominantes en la misma cromátida)
+M/Hm: en fase de "repulsión" (los alelos dominantes en cromátidas distintas)

Una de las formas de conocer la fase de ligamiento es estudiar la generación *previa* (abuelos), para saber si H y M son separables o no. En esencia, se trata de determinar si H y M están en la misma molécula de ADN o en moléculas homólogas (materna y paterna) y en este sentido es útil el concepto de *haplotipo.*

Se denomina haplotipo a un conjunto de alelos o secuencias de ADN que están cercanos, es decir, estrechamente ligados, y que para muchos usos pueden considerarse como una única región de ADN Esto es así porque al estar físicamente cercanos entre sí (por ejemplo dentro de un mismo segmento que tiene 10 kb en total), es muy improbable que un entrecruzamiento por azar ocurra entre ellos y los separe. Si el marcador M está cerca del gen H, la búsqueda de la fase de ligamiento equivale a determinar si el haplotipo es HM o Hm.

El concepto de haplotipo es especialmente útil cuando se aplica a un grupo de marcadores estrechamente ligados: se trata de un grupo de secuencias polimórficas de ADN que se encuentran cercanas entre sí en un segmento de ADN, y que pueden ser reconocidas simultáneamente con una misma sonda de ADN En una familia determinada es improbable que un haplotipo sea destruido por una recombinación y, por consiguiente, un haplotipo puede ser manejado casi como un único alelo. El concepto de haplotipo permite, con el uso de marcadores moleculares, distinguir el homólogo materno del paterno.

Uso de "lods" en ligamiento

Dado que las familias usualmente tienen un número escaso de hijos para poder definir el ligamiento de rasgos, se ideó un método estadístico que permite *adicionar* los datos de varias o muchas familias referidos a un mismo par de genes o marcadores. Este método de "lods" (del inglés *l*ogarithm of *od*ds) es una medida de la probabilidad de que dos alelos estén efectivamente ligados y no asociados por azar; se designa por la letra Z, y es el logaritmo del cociente entre la probabilidad de ligamiento y la probabilidad de asociación independiente (por azar), para una tasa dada de recombinación entre esos dos alelos (TR) Z = log [pr(lig)/pr(ind)] Los valores de Z pueden

variar generalmente entre +3 y –3, y son consi derados:

Z = 3 [Cociente prob(lig)/prob(indep.)] = 1.000: Ligamiento establecido
Z – 2 [cociente prob(lig)/prob(indep.)] = 100: Ligamiento muy probable
Z – entre 1 y 0: Ligamiento posible
Z – entre 0 y –1 Posible asociación al azar
Z = –2. Asociación aleatoria establecida

Los "lods" de los mismos pares de alelos en familias separadas se pueden sumar hasta llegar a un valor que permita definir la prueba de ligamiento o su falta.

Utilidad de los desequilibrios de ligamiento

Cuando los haplotipos (véase antes) posi bles, es decir, todas las combinaciones posibles de genes estrechamente ligados en una misma molécula de ADN se consideran en una población extensa (ciudad, región), se espera que se encuentren en frecuencias debidas sólo al azar, esto es, en lo que se llama *equilibrio de ligamiento*. No obstante, en ciertas ocasiones, algunos haplotipos son mucho más frecuentes que lo que correspondería sólo por azar; es un *desequilibrio de ligamiento*. Estos conceptos de equilibrio y desequilibrio de ligamiento se basan en el hecho de que (si no existen razones especiales que lo impidan) todos los segmentos de una molécula de ADN son cortados al azar durante el transcurso de muchas generaciones y recombinados en todas las formas posibles en una población donde hay cruzamientos irrestrictos. Sin embargo, hay casos en los que esta asociación al azar no ocurre:

1. Cuando ha surgido recientemente (en términos de número de generaciones) una nueva mutación. este alelo mutante estará ligado a ciertos polimorfismos, de segmentos cercanos en ese ADN, que estaban justo en el individuo en el cual se originó la mutación, en los descendientes, el alelo mutante presentará un desequilibrio de ligamiento respecto de esos marcadores y con referencia a la población general, porque las pocas recombinaciones en escasas generaciones no romperán el ligamiento con el alelo mutante.
2. Cuando se establece una combinación de genes que tiene una ventaja selectiva sobre otras parejas de alelos posibles y, por consiguiente, determina una ventaja reproductiva para mantener ese haplotipo especial.

Tratándose de mutaciones relativamente nuevas, es de esperar desequilibrios de ligamiento con todos los segmentos cercanos de ADN, lo cual es útil para la localización de esos alelos mutados; es decir que un desequilibrio de ligamiento sugiere que una mutación ha surgido hace poco tiempo.

Genes humanos ligados al sexo (al X) y enfermedades relacionadas

La figura 11-6 muestra un mapa de ligamiento simplificado del cromosoma X humano. Se muestran sólo algunos de los genes a los que se hace referencia aquí.

La asociación entre sexo y enfermedad fue una de las primeras en ser observadas; se trata de enfermedades que son típicamente padeci das por *varones*, y muy raramente por mujeres (y aun en estos casos raros, los síntomas son mucho más leves) Esto se explica si se trata de mutaciones recesivas de genes localizados en el cromosoma X. Dado que el varón es *hemicigótico* (hemi = mitad) respecto del X, es decir, posee un solo cromosoma X (y el Y, que salvo en la región seudoautosómica [RPA, véase cap. 10] no tiene genes homólogos al X), todos los genes anormales del único X se expresan en el fenotipo, y se observa la enfermedad. Las mujeres pueden ser portadoras del gen anormal en uno de sus dos cromosomas X y les basta el gen normal en el otro X para no desarrollar la enfermedad (se verá más adelante que la inactivación al azar de uno de los dos X, o *lionización*, no afecta generalmente este resultado) Por consiguiente, un hijo varón con una enfermedad ligada al X necesariamente tiene una madre portadora, heterocigota para esa mutación

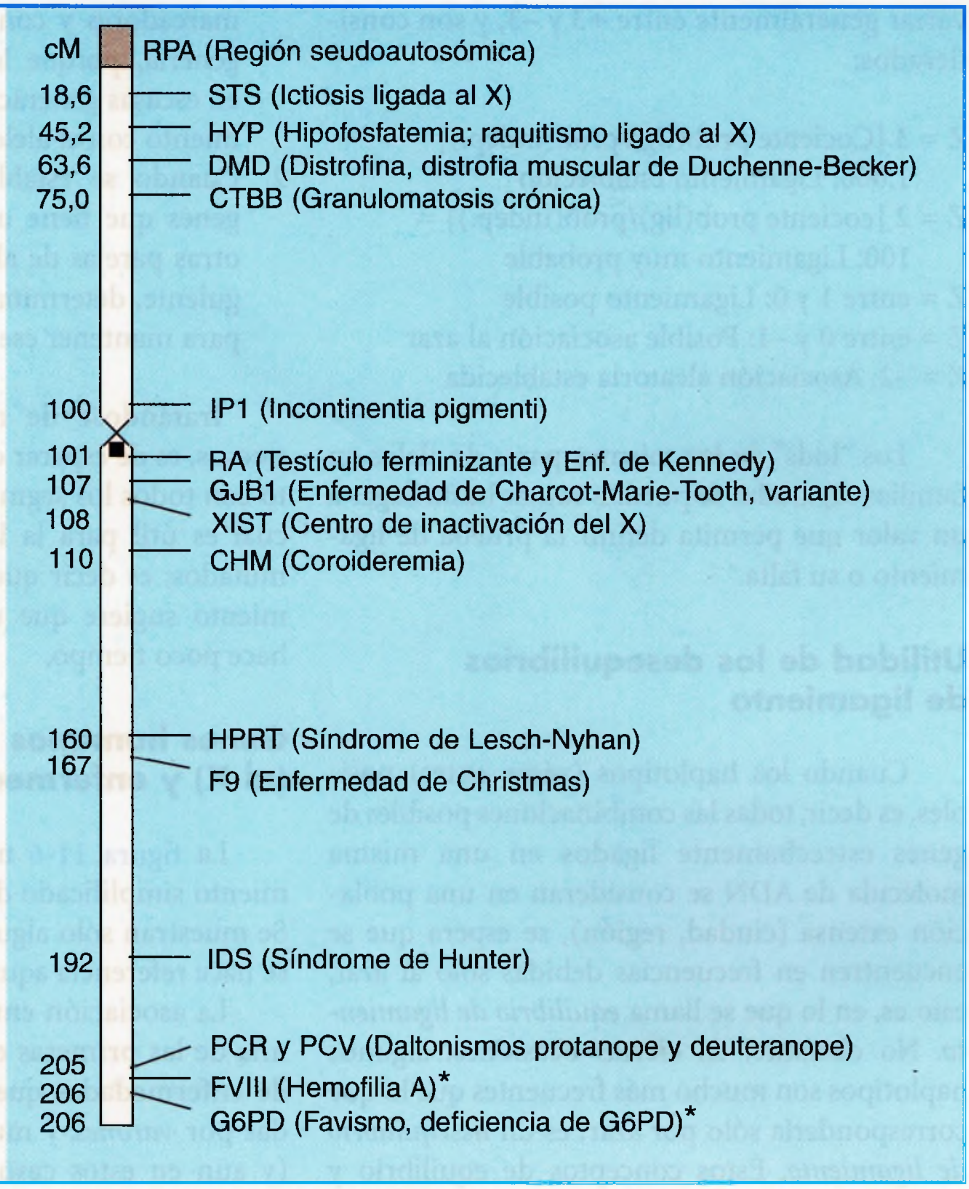


Fig. 11-6. Mapa parcial de ligamiento del cromosoma X que muestra algunos de los genes de las enfermedades citadas (Wang y cols., 1994). * Posiciones indistinguibles entre sí.

(salvo que sea una mutación "de novo" origina da en las células germinales de la madre La gran mayoría de las enfermedades ligadas al sexo (al cromosoma X) son recesivas; en todas ellas es imposible que el gen anormal de un enfermo provenga de su padre (puesto que sólo le transmite un cromosoma Y) Hay unas pocas enfermedades con característica dominante ligada al X, tales como el raquitismo (hipofosfatémico) resistente a la vitamina D; en este caso hay mujeres y varones afectados, con un tipo de transmisión característico (el padre nunca transmite el rasgo a ningún hijo varón) Una genealogía típica de ligamiento al X, junto al uso de un PLFR para detección de hemofilia A, se muestra en la figura 11 7

Gen de la distrofina y los distrofias musculares de Duchenne-Becker

Las distrofias musculares de Duchenne-Becker constituyen una de las enfermedades fata les más comunes ligadas al cromosoma X y afectan a 1 de cada 3.000 varones nacidos vivos.[8] Se distinguen dos variedades principales: la distrofia seudohipertrófica de Duchenne, que es la más grave y típica, cuyo comienzo sintomatológico ocurre a los 3-4 años de edad, y la variedad más tardía, de Becker, que comienza a dar síntomas en la segunda o tercera década de la vida. Los sín tomas de la primera variedad son escasos en el lactante y hasta los 3 años, aunque los niños comienzan a caminar tardíamente y hay hipoto-

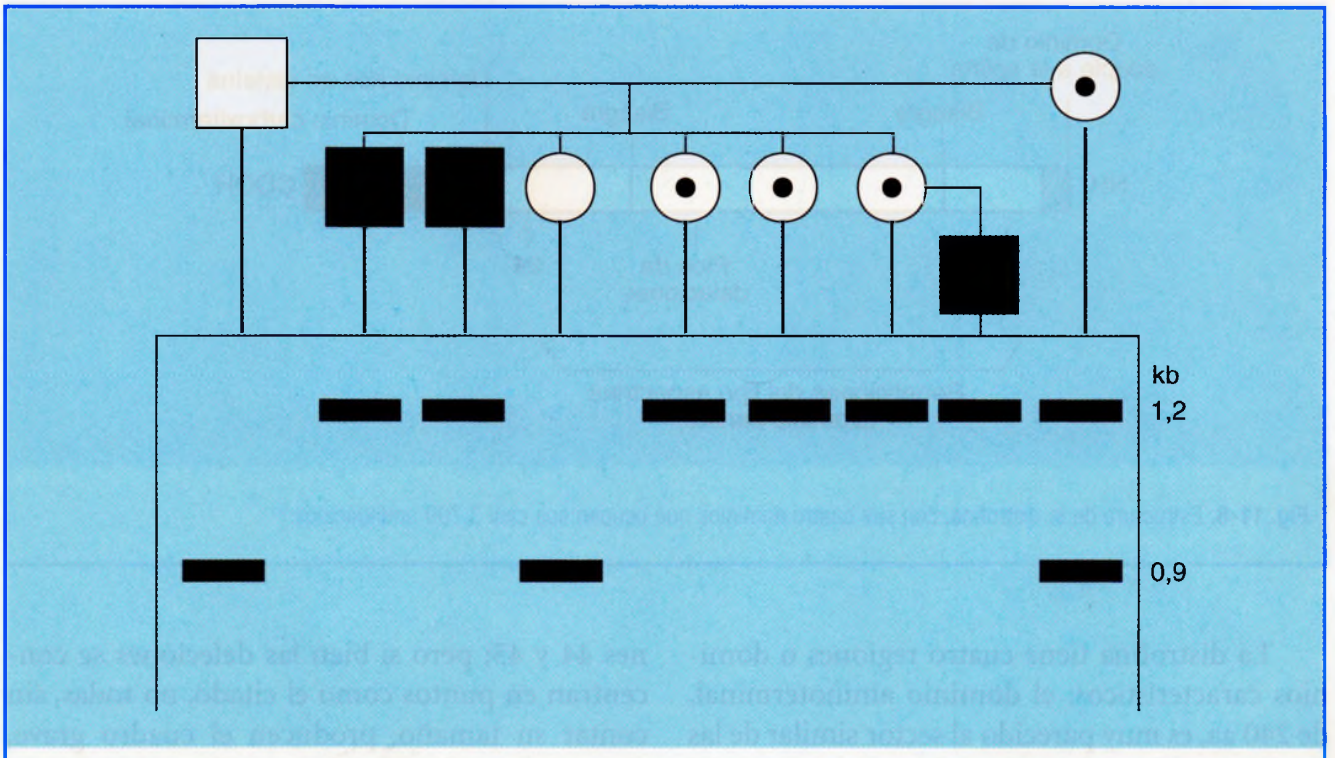


Fig. 11-7 Genealogía de hemofilia A y el uso de una sonda para los exones 17 18 del gen del factor VIII, que detecta un polimorfismo (fragmento de 1,2 kb) asociado al gen mutado, los cuales permiten identificar a las portadoras y familiares sanos.[7] (Las bandas corresponden a improntas de Southern y los sitios de corte a la enzima Bcl-I; véase fig. 11-5, primer ejemplo.)

nía, luego se aprecia debilidad en los músculos pelvianos, glúteos, y progresivamente los músculos de los hombros; les resulta difícil ponerse de pie y no pueden subir escaleras ni saltar. En las pantorrillas pueden aparentar un engrosamiento (seudohipertrofia) por infiltración adiposa y fibrosa de los músculos. La afectación de los músculos es simétrica y llega más tardíamente a las partes distales. Alrededor de los 10 años sólo se movilizan en silla de ruedas; el músculo cardíaco se afecta y mueren entre los 10 y 20 años, de modo que en la variedad Duchenne no hay reproducción, sino transmisión a través de mujeres portadoras. Hay creatinuria y un aumento muy significativo de la creatinfosfoquinasa (CFQ CPK) del suero (de 100 UI en el normal a 10.000 UI en el afectado a la edad de 1 año; sin embargo, la prueba no es segura para detectar portadoras; el embarazo, el ejercicio, etc. pueden dar falsos positivos) Hay una cierta frecuencia de retraso mental en la forma grave.

Esta enfermedad, en todas sus variedades, se debe a mutaciones de un gen de gran extensión, el gen de la proteína normal *distrofina*, que se encuentra normalmente asociada con la membrana celular (sarcolema) de las células musculares estriadas, esqueléticas y cardíacas; en la variedad Duchenne *falta totalmente* o está disminuida y alterada la distrofina, y en la variedad Becker hay formas anormales (mutantes) de la proteína que son disfuncionales.

El gen de la distrofina ha sido clonado[9] (luego de haberse aislado el ADNc correspondiente) y es el mayor gen humano: se extiende por 2,6 mega bases del ADN de la banda Xp21.3 en el brazo corto del X y contiene 79 exones. Esta extraordinaria longitud equivale a un tercio del genoma total de la bacteria *E. coli* y cerca de 1 milésimo del total del genoma humano, por lo cual se supone que la alta tasa de mutación del gen está relacionada con su gran tamaño (véase cap. 8) El ADNc de la distrofina (equivalente al ARNm) mide sólo 14 kb, por esto la mayor parte del gen de la distrofina está ocupada por largos intrones; finalmente, la proteína *distrofina* tiene 3.687 aminoácidos y un peso molecular de 427 kDa (fig. 11-8) [10]

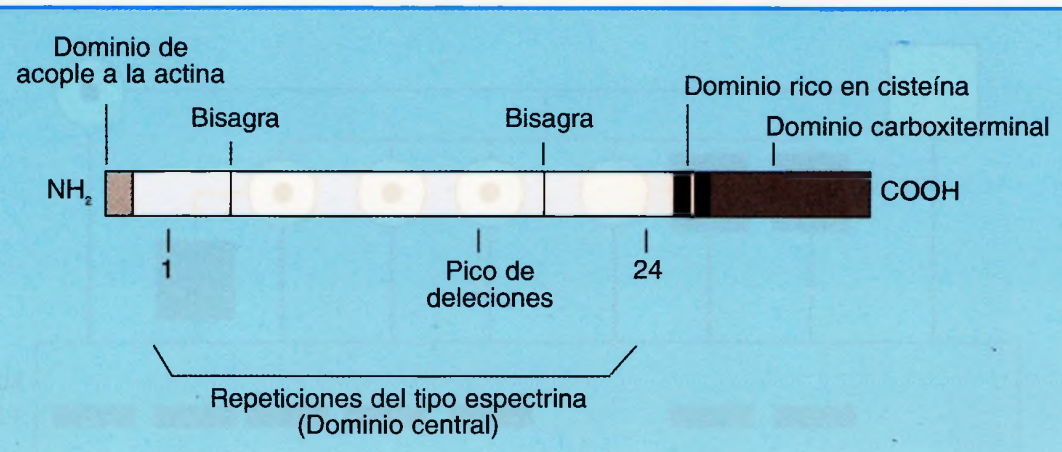


Fig. 11-8. Estructura de la distrofina, con sus cuatro dominios que ocupan sus casi 3.700 aminoácidos.[8,11]

La distrofina tiene cuatro regiones o dominios característicos: el dominio aminoterminal, de 240 aa, es muy parecido al sector similar de las α-actininas y puede unirse a la proteína esencial de las miofibrillas y del citoesqueleto, la actina, luego tiene un dominio central, con 24 repeticiones imperfectas, similares a las de la espectrina, que probablemente constituyen el eje de la molécula de distrofina, incluidas dos secuencias "bisagra" ricas en prolina, luego tiene un dominio rico en cisteína (similar al carboxiterminal de la α-actinina) y un dominio muy específico, carboxiterminal, que es el que se une a glucoproteínas de membrana.[8,11] Por consiguiente, la distrofina es una proteína alargada, con forma de cordón, que por su extremo NH_2 se conecta a la actina citoplasmática y por su extremo COOH a la membrana (sarcolema) a través de glucoproteínas de membrana, es una especie de "puente" al exterior. Además, muy probablemente se encuentra como dímeros (con los monómeros con polaridad opuesta)

A su vez, el enorme gen de la distrofina ha sido analizado en su espectro de mutaciones.[12] Se han informado 1 111 mutaciones de este gen gigante, de las cuales 891 tienen un fenotipo asociado.[12] Es sabido que dos tercios de los pacientes de los tipos Duchenne y Becker tienen deleciones (muchas veces grandes), comprobables con sondas del ADN normal, y que hay una región "caliente" con un pico de deleciones en un gran intrón de 200 kb situado entre los exones 44 y 45; pero si bien las deleciones se concentran en puntos como el citado, no todas, sin contar su tamaño, producen el cuadro grave, sino sólo aquellas que alteran el "marco de lectura", especialmente para el sector final, el dominio carboxiterminal, que por consiguiente es esencial para la función de la distrofina, porque por esa región se asocia con las glucoproteínas de membrana. Esta hipótesis se confirma con la agrupación de mutaciones puntuales, en particular sobre los exones finales, en los enfermos de tipo Duchenne (fig. 11-9)

La función de la distrofina no está totalmente esclarecida. Parece ser un puente de comunicación entre la miofibrilla y el exterior de la fibra muscular, a través de su asociación con un complejo glucoproteico denominado "glucoproteína asociada a la distrofina", GAD DAG (fig. 11 10)

El gen de la distrofina está activo (transcribe no sólo en las células musculares o sus precursoras, sino también en neuronas y en astrocitos de la glía. El gen tiene varios promotores, que están regulados en forma diferente (véase fig. 11-9) El promotor muscular es activo en células miogénicas y en la glía, el promotor cerebral está activo sólo en neuronas diferenciadas, y el tercer promotor es propio de las neuronas de Purkinje en el cerebelo. En las neuronas, la distrofina se encuentra en la región postsináptica (densidad y retículo postsináptico), y en los astrocitos se ubica en los

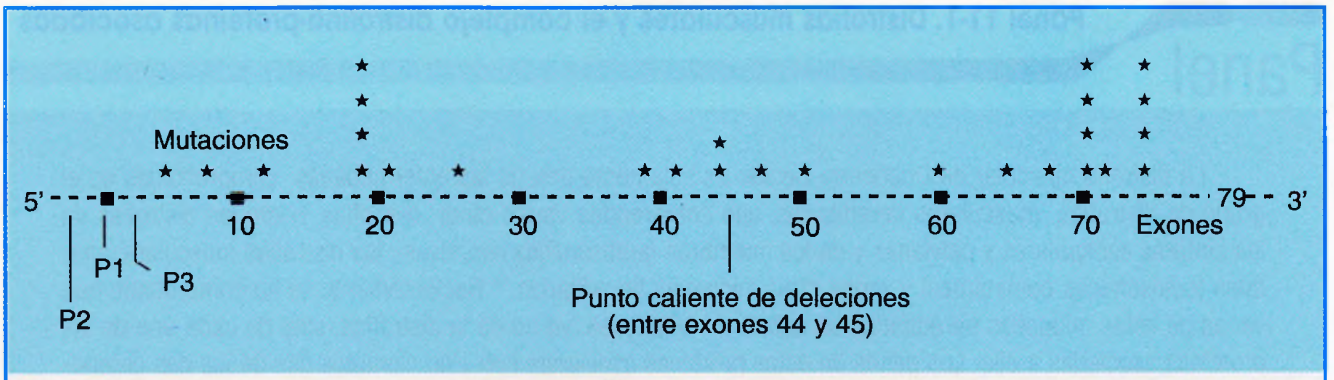


Fig. 11-9. Espectro de mutaciones puntuales sobre los exones del gen de la distrofina.[11] Los asteriscos señalan los exones mutados. P1-P3, promotores.

pies chupadores. Es posible que en todos los casos la distrofina cumpla una función similar hacer de puente y comunicación entre fibrillas de actina (del citoesqueleto) y las proteínas de membrana. La repercusión sobre el desarrollo intelectual en la distrofia muscular, aunque variable, puede estar relacionada con estos hechos. Una proteína muy similar a la distrofina es la *utrofina*, cuyo gen (autosómico, en 6q24) es también un gen gigante, de 1 megabase; se supone que tiene funciones similares a la distrofina.

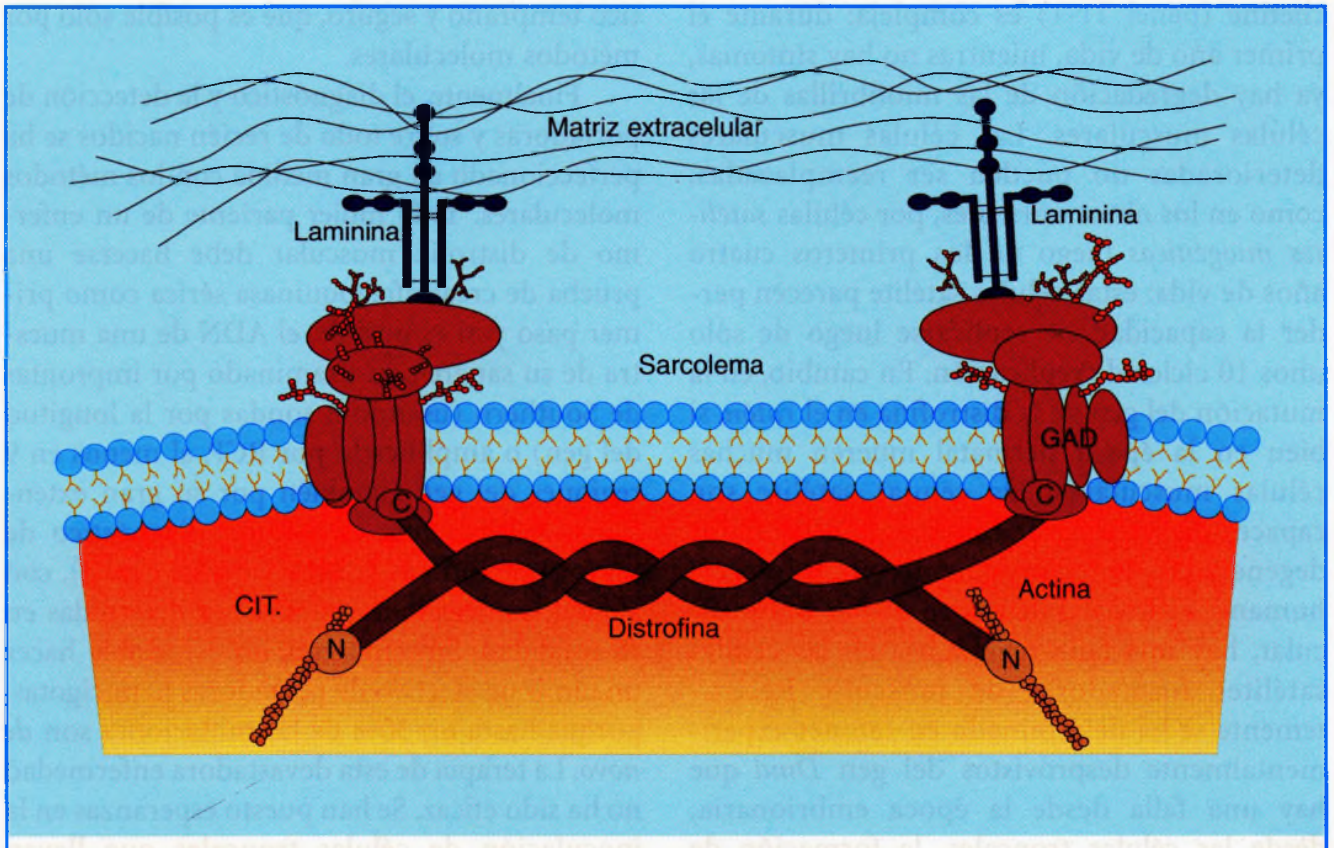


Fig. 11-10. Esquema hipotético de la ubicación de la distrofina en la célula muscular. Los extremos carboxilo (C) se unen al complejo GAD (glucoproteína asociada a la distrofina) y los amino (N) se unen a la actina del citoesqueleto de la fibra muscular. CIT., citoplasma de la célula muscular.

Panel 11-1 Distrofias musculares y el complejo distrofina-proteínas asociadas

Panel

La distrofia muscular de Duchenne-Becker es solamente una de las enfermedades comprendidas en el grupo de distrofias musculares hereditarias, que comprenden varias otras distrofias, como las distrofias de las cinturas escapulares y pelvianas y de los miembros (autosómicas recesivas), las distrofias musculares distales (autosómicas dominantes) y varias otras miopatías hereditarias.[14] Recientemente se ha comprobado que varias de estas miopatías hereditarias se deben a mutaciones, ya no de la distrofina, sino de cada una de las proteínas asociadas a ella. Los genes de estas proteínas asociadas han sido clonados (los de los dos componentes, α y β distroglucanas; de los cinco componentes, α-ε sarcoglucanas y las sintrofinas) y se comprobó que las distintas sarcoglucanas son responsables de las distrofias de las cinturas escapulares y pelvianas y de los miembros.[13] De esta manera, se encuentra un complejo de proteínas que hace de puente entre los filamentos finos de actina (dentro de la fibra muscular) y las sustancias de la matriz extracelular, a través de la laminina especial asociada con el músculo, que es una proteína de la membrana basal, con forma de cruz y formada por tres polipéptidos unidos por puentes disulfuro (véase fig. 11-10). Las funciones de este complejo, aún no bien estudiadas, además de una función estructural o de sostén, comprenden la transmisión de señales entre el exterior y la fibra muscular, y un posible canal de iones calcio.

La patogenia de la enfermedad de Duchenne (panel 11 1) es compleja. durante el primer año de vida, mientras no hay síntomas, ya hay degradación de las miofibrillas de las células musculares. Las células musculares deterioradas no pueden ser reemplazadas, como en los niños normales, por células *satélites miogénicas* luego de los primeros cuatro años de vida. estas células satélite parecen perder la capacidad de replicarse luego de sólo unos 10 ciclos de replicación. En cambio, en la mutación del gen de la distrofina en el *ratón*, si bien en la época perinatal mueren muchas células musculares, las células satélite son capaces de reemplazar totalmente a las fibras degeneradas. Por consiguiente, en la especie humana, aparte del deterioro de la fibra muscular, hay una falla regulatoria en las células satélites formadoras de músculo. Recientemente se ha determinado en ratones experimentalmente desprovistos del gen *Dmd* que hay una falla desde la época embrionaria, desde las células troncales, la formación de miotubos y la correcta expresión del gen *PAX7*.[13] Esto sugiere que cualquier terapia, para ser eficaz, debería comenzar muy temprano, al nacimiento, lo cual requiere un diagnóstico temprano y seguro, que es posible sólo por métodos moleculares.

Finalmente, el diagnóstico y la detección de portadoras y sobre todo de recién nacidos se ha perfeccionado en gran medida con los métodos moleculares. Toda mujer pariente de un enfermo de distrofia muscular debe hacerse una prueba de creatinfosfoquinasa sérica como primer paso y, si es posible, el ADN de una muestra de su sangre será examinado por improntas de Southern (usando 8 sondas por la longitud del gen) o amplificado por RCP, al menos en 9 regiones del gen (también por su gran extensión) Actualmente el método diagnóstico de mayor precisión es la MLPA (véase cap. 3), con la cual las deleciones pueden ser detectadas en su totalidad. Sin embargo, no es posible hacer un tamizaje efectivo de portadoras hemicigotas, porque hasta un 30% de las mutaciones son *de novo*. La terapia de esta devastadora enfermedad no ha sido eficaz. Se han puesto esperanzas en la inoculación de células troncales que llevan transferido el gen normal y capaces de transformarse en células musculares, pero aún no se dispone de una terapia normatizada.

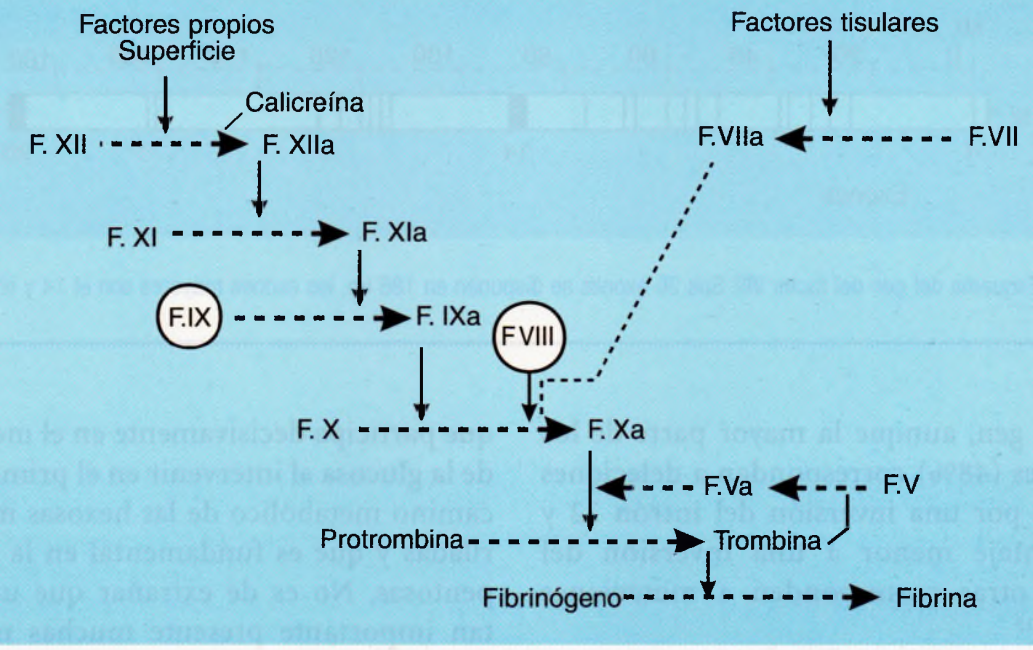


Fig. 11-11 Esquema simplificado de la cascada metabóiica de la coagulación. Al faltar o ser afuncional el factor VIII, se interrumpe la cascada a nivel del factor X (hemofilia clásica). Si falla el factor IX, se produce la hemofilia B.

El gen del factor VIII de la coagulación: hemofilia clásica (A). Factor IX y hemofilia B

La hemofilia A o clásica y la hemofilia B o enfermedad de Christmas (apellido del paciente original) son defectos génicos ligados al cromosoma X en lugares (loci) bastante distantes entre sí, pero ambos en el brazo largo del cromosoma (F8:Xq28, F9:Xq26) La hemofilia A, que muestra un defecto del factor VIII de la coagulación, es tres a cuatro veces más frecuente que la B, que corresponde a un defecto del factor IX de la coagulación. Estos factores son proteínas que actúan en la cascada de la coagulación sanguínea, donde una serie de factores van siendo activados hasta convertir la protrombina en trombina, la cual, al actuar sobre el fibrinógeno soluble del plasma, lo convierte en el coágulo de fibrina fig. 11 11)

La hemofilia clásica A ocurre en 1 cada 5.000 a 10.000 varones nacidos vivos; la B, en 1 cada 40.000. Los síntomas de ambas son parecidos. Se producen hemorragias grandes por pequeños traumas y a veces pueden aparecer espontáneamente hematomas internos. Es característica la hemorragia intraarticular (hemartrosis), que lleva a fibrosis y graves deformaciones en las articulaciones; las extracciones dentarias pueden provocar hemorragias graves. El tiempo de coagulación es muy prolongado, así como el tiempo de tromboplastina parcial, con niveles normales de plaquetas y fibrinógeno. El nivel del factor VIII en la sangre varía entre menos del 1% (forma severa, frecuente) al 2-7% (forma moderada) y hasta el 20% del normal (forma ligera). La transfusión y luego la administración intravenosa de globulina antihemofílica (factor VIII) purificada mejoraron apreciablemente el pronóstico. Hace dos décadas, la contaminación con virus de la hepatitis y el sida determinaron en muchos casos decesos secundarios a transfusiones contaminadas con estos virus. Actualmente, la vigilancia más estricta y el uso de concentrados de factor VIII calentados para inactivar el virus del sida y los de hepatitis han reducido drásticamente este riesgo.

El gen del factor VIII es un gen muy grande, que abarca 186 kb, con 26 exones que comprenden en total sólo 7,05 kb, de modo que la mayor parte del gen está ocupada por largos intrones (fig. 11 12) Se han descrito enfermos de hemofilia A en los que se constató la inserción de un elemento L1 o retroposón en la

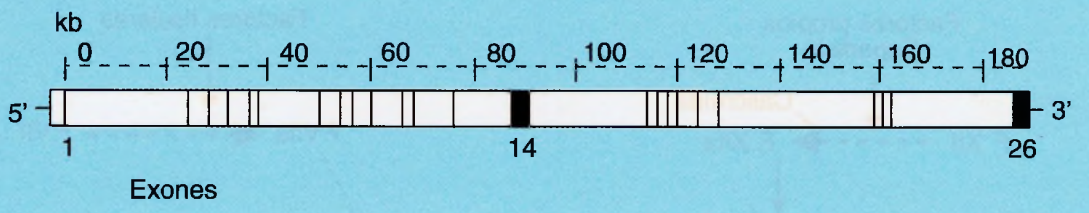


Fig. 11-12. Esquema del gen del factor VIII. Sus 26 exones se disponen en 186 kb; los exones mayores son el 14 y el 26.[16]

región del gen, aunque la mayor parte de los casos graves (48%) corresponden a deleciones originadas por una inversión del intrón 22 y un porcentaje menor a una inversión del intrón 1, otras corresponden a mutaciones puntuales.[15]

El producto del gen (factor VIII) es una proteína de 2.351 aminoácidos, que presenta una estructura particular, con tres tipos de dominios, A, B y C, de los cuales sólo el B es único; la estructura del factor VIII es: A1 A2-B-A3-C1-C2. El dominio B corresponde al gran exón 14, con 925 aa, y la remoción de este dominio se asocia con la activación de la proteína.

La tasa de mutación del gen del factor VIII es relativamente elevada ($4 \times 10\text{-}5$), lo cual estaría de acuerdo con su tamaño. También influyen ciertas secuencias homólogas en un intrón, que provocan frecuentemente, en la meiosis paterna, un mal apareamiento y finalmente una inversión del gen con pérdida de su actividad, por este mecanismo se originan alrededor del 50% de los casos graves. La mayor parte de las mutaciones son "de novo", de modo que pueden usarse PLFR para la detección de portadoras (véase fig. 11 7)

El gen de la glucosa-6-P-deshidrogenasa. Anemias hemolíticas y favismo

Próximo al gen del factor VIII, cerca del extremo del brazo largo del X (Xq28), se encuentra el gen *G6PD*, que codifica la enzima del mismo nombre; ésta es una enzima de mantenimiento, presente en todas las células, que participa decisivamente en el metabolismo de la glucosa al intervenir en el primer paso del camino metabólico de las hexosas monofosforiladas y que es fundamental en la síntesis de pentosas. No es de extrañar que una enzima tan importante presente muchas mutaciones pero sin que desaparezca totalmente la enzima o su actividad catalítica, la desaparición total es letal. La reacción catalizada por la enzima provee NADPH, que es necesario para la manutención de grupos -SH e indirectamente para la destoxificación de peróxidos.

El gen *G6PD* es interesante, entre otras razones, porque sus variantes o mutaciones son varios centenares y todas son funcionales o casi totalmente funcionales; es decir que de las 300 variantes de la enzima G6PD muchas son simples "polimorfismos" y otras producen una disminución relativa de la actividad enzimática, que en algunas condiciones, como la ingesta de ciertos alimentos o drogas, puede provocar síntomas (anemia), por ejemplo la ingesta de habas (favismo) Esto ocurre por la presencia de algunos glucósidos en las habas (como la divicina), que actúan como tóxicos en eritrocitos con el genotipo mutante de la G6PD, desencadenando una anemia hemolítica aguda. Por otra parte, los estudios de genética de poblaciones han mostrado que ciertas variantes del gen *G6PD* se mantienen en las poblaciones endémicamente afectadas por paludismo; es decir que hay una típica interacción entre un polimorfismo génico y una enfermedad ampliamente extendida. Se han calculado en 400 millones las personas que presentan deficiencias relativas de la G6PD, radicadas especialmente en África Central, el Mediterráneo, Extremo Oriente y Brasil.[17]

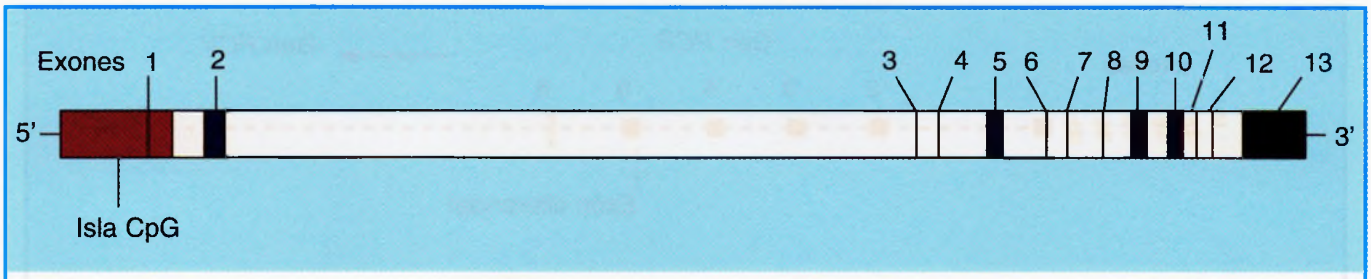


Fig. 11 13. Gen de la G6PD. El segundo intrón ocupa prácticamente la mitad del gen. Las secuencias codificantes son sólo 1.545 pb de las 18 kb del gen.[17]

En realidad, este gen tan polimórfico es muy conveniente para el estudio de la variación génica en poblaciones. El gen consta de 13 exones, ocupa unas 18 kb y ha sido secuenciado totalmente (fig. 11 13)

Como otros genes de mantenimiento, antes de la iniciación del marco de lectura del gen, hay una región muy rica en el dinucleóti do CpG, que se extiende al primer intrón (isla CpG) Las 140 mutaciones comprobadas del gen *G6PD* (que son una minoría de las existentes, dado que se conocen 387 variantes de la proteína) son sobre todo transiciones C → T, puntuales en una base; no se observó ninguna mutación de cambio del marco de lectura o sin sentido (estas mutaciones, que directamente eliminan la proteína total, son letales) Se piensa que la patogenia de las anemias hemolíticas desencadenadas en personas con alelos mutantes de la G6PD se basa en la condición de mutante *condicional* del gen G6PD; es decir, sólo ante un medio especial las células presentan una deficiencia significativa de la enzima que provoca efectos tóxicos. Por consiguiente, se piensa que las mutaciones que llevan al favismo, o a las anemias hemolíticas por ciertas drogas e infecciones, producen una *inestabilidad* de la enzima o reducen algo su actividad catalítica. En células que permanentemente están recambiando sus proteínas, porque mantienen activo todo el sistema de síntesis proteica, un cierto grado de inestabilidad de la G6PD no produce efectos mayores y pasa inadvertida, pero en los eritrocitos maduros, despojados de la maquinaria de síntesis de proteínas, la G6PD que estaba en el reticulocito se va degradando, cuando las mutaciones la vuelven inestable, y el eritrocito (en sus cuatro meses de vida media) se encuentra inerme frente a sustancias que serían rápidamente eliminadas en otros tipos celulares. La gran cantidad de polimorfismos y de mutaciones que sólo disminuyen ligeramente la actividad de la enzima, hacen que sus efectos sólo sean visibles en los eritrocitos y bajo ciertas condiciones. Por otra parte, la asociación entre las variantes B, A (entre otras) y el paludismo se debe a que los eritrocitos con deficiencias ligeras de G6PD presentan un problema que el plasmodio del paludismo no puede resolver fácilmente, que es adaptarse a invadir y parasitar dos tipos de eritrocitos en las mujeres heterocigotas para estas variantes de G6PD· debido a la lionización (véase más adelante) al azar de uno de los cromosomas X, la mujer es un mosaico con dos tipos celulares, y en los eritrocitos presenta dos poblaciones, la de eritrocitos con G6PD estable (y nivel normal) y la de eritrocitos con G6PD inestable y niveles muy disminuidos. Esta heterogeneidad confiere a las *mujeres* (que a su vez conservan el patrimonio génico en la población) un grado de resistencia al parásito que hace favorable la persistencia del gen mutado.

Genes para pigmentos retinianos: *PCR* y *PCV* (pigmentos de conos sensibles al rojo y al verde). Daltonismos

Siguiendo este paseo por la zona terminal del brazo largo del X, se encuentran muy próximos entre sí el gen de pigmento de conos sensi

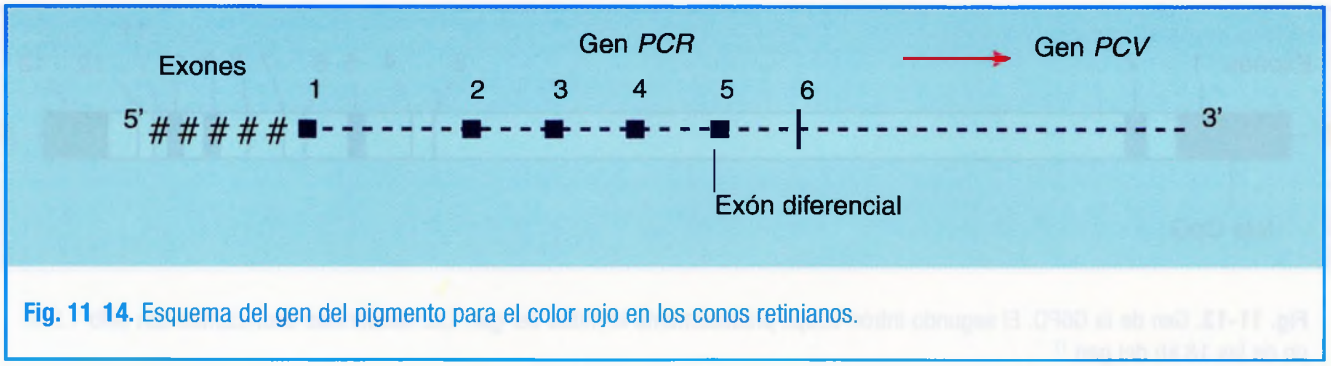


Fig. 11 14. Esquema del gen del pigmento para el color rojo en los conos retinianos.

bles al rojo (PCR – RCP en inglés) y el (o los) genes de pigmento de conos sensibles al verde (PCV = GCP), ambos no muy lejos de los genes del factor VIII y de G6PD (fig. 11-4) En la retina hay alrededor de 130 millones de fotorreceptores, clasificados en una mayoría (más de cien millones) de *bastones*, sensibles a casi todo el espectro pero en condiciones de poca luz (penumbra) y que contienen el pigmento "rodopsina" (cuyo gen está en el cromosoma 3), y una minoría de 8 millones de conos, que a su vez son de tres tipos: los conos con pigmento sensible al rojo, los conos con pigmento sensible al verde y los que tienen pigmento sensible al azul, de tal manera que la visión de los colores depende de la presencia de *los tres tipos de conos*, y cada cono posee un solo tipo de pigmento (lo cual indica que durante el desarrollo existe una inhibición diferencial de algunos de los genes) El pigmento sensible al azul se considera el más antiguo y su gen está localizado en el autosoma 7; por consiguiente, es muy poco frecuente la ceguera al azul (denominada tritanopia), porque requiere la mutación de ambos alelos en los dos homólogos del autosoma 7 En cambio, la ceguera para el rojo o para el verde es relativamente común en los varones, porque sus genes están en el X (Xq28) y sus mutaciones están ligadas al sexo.

Todos los pigmentos visuales consisten en una parte proteica ("opsina") ligada (como una base de Schiff) al cromóforo 11-cis-retinaldehído, derivado de la vitamina A. Las opsinas "roja" y "verde" son proteínas muy parecidas entre sí (98% de homología) con 15 aminoácidos de diferencia entre la opsina sensible a onda larga (roja) y la sensible a onda media (verde) Las diferencias en los aa 277 y 285 (ambos codificados en el exón 5) son las que tienen mayor efecto en el desplazamiento del pico de sensibilidad al espectro.

Los genes *PCR* y *PCV* han sido clonados[18] y constan de sólo seis exones (véase fig. 11 14). El de la opsina roja está "más arriba" (5') que el de la opsina verde.

Los defectos de la visión de los colores ligados al sexo ("daltonismos", de John Dalton, científico que padecía el defecto y lo describió en 1794 en Inglaterra) se encuentran en un 8% de varones de raza blanca y se clasifican en dos grupos principales, los defectos para el color rojo y los defectos para el color verde. Se llaman *protanopes* (de *protos*, primero, por considerar al rojo el primer color, de longitud de onda mayor) (son cerca del 1% de los varones) los del primer grupo, cuando la percepción del color rojo está ausente o muy disminuida, y *protanómalos*, cuando la anomalía para el rojo es menor. En el segundo grupo, se llaman *deuteranopes* ("2º color"), cuando la sensibilidad al verde es manifiestamente defectuosa (5% de la población), o *deuteranómalos* si el defecto es menor.

El defecto en los protanopes reside en la opsina para el rojo, y en los deuteranopes en la opsina para el verde, mientras que la visión normal para los colores es tricromática (fig. 11 15)

Durante un tiempo se supuso que como los genes de las opsinas "roja" y "verde" están seguidos uno del otro y poseen alto grado de homología, podría existir un mal apareamiento en la meiosis, y un entrecruzamiento en esas condiciones podría llevar a la pérdida de uno de los genes, con la consiguiente ceguera para un color. Luego

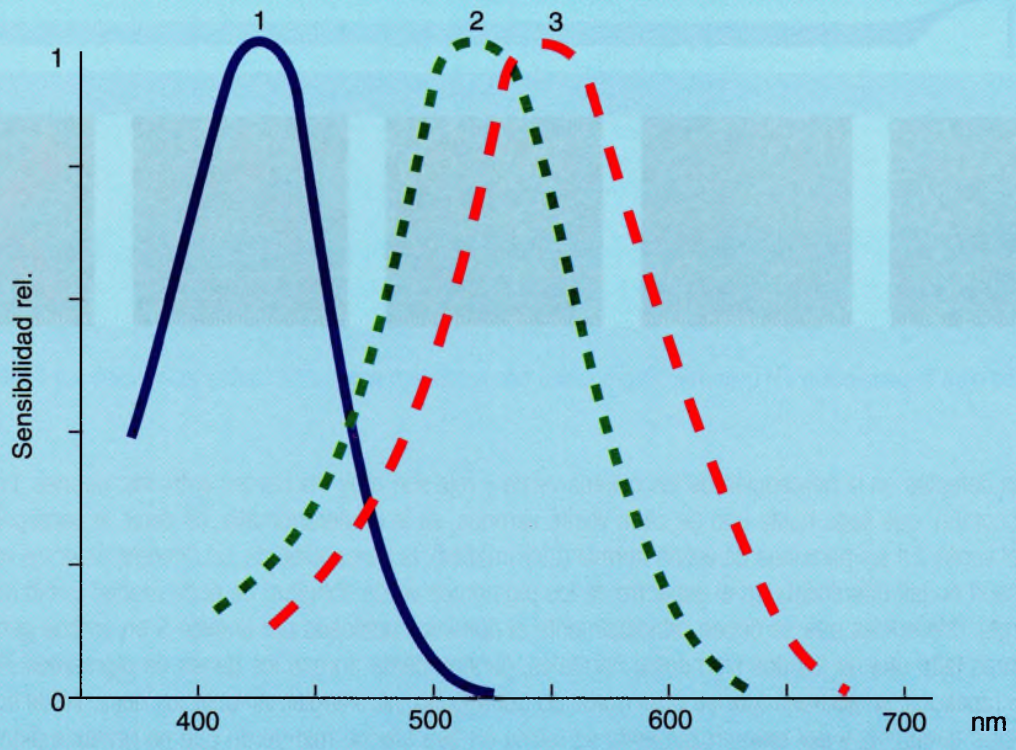


Fig. 11-15. Sensibilidad al espectro en individuos normales (visión tricromática). Los protanopes sólo poseen las curvas 1 y 2; los deuteranopes, las 1 y 3. Los normales poseen las tres curvas.

se observó en un grupo de 27 hombres con visión normal de los colores, que el número y el tipo de genes de opsinas en el cromosoma X es variable entre 2 y 9 genes, colocados uno tras otro (fig. 11 16); el número de genes para la opsina "roja" varía entre 1 (50% de los casos) y 4; y el número de genes para la opsina "verde" oscila entre 1 (raro) y 7, lo más frecuente es poseer 2 genes para la "verde" Además se comprobó la frecuente existencia de genes "híbridos" entre el *PCR* y el *PCV*, producidos por entrecruzamiento intragénico[19] (panel 11 2).

Gen *HPRT* y síndrome de Lesch-Nyhan

Dejando ahora la región final de Xq (con los genes *FVIII*, *G6PD* y *PCR-PCV*) y yendo hacia la mitad del brazo largo, en Xq26, allí se encuentra el gen *HPRT*, que codifica la enzima hipoxantina fosforribosil transferasa, esencial en la reutilización de las bases púricas de ácidos nucleicos y cuyas alteraciones mayores producen el grave síndrome de Lesch-Nyhan (las alteraciones menores provocan hiperuricemia y artritis gotosa)

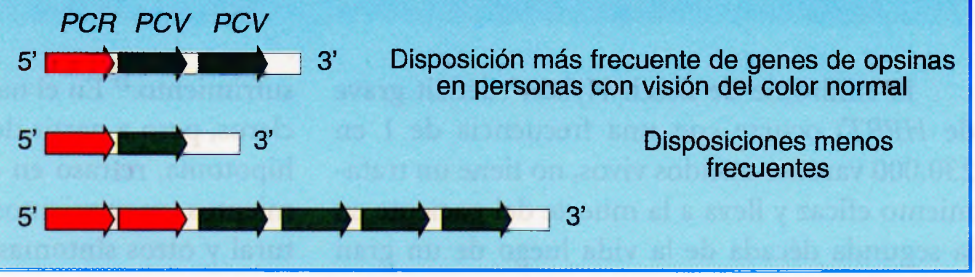


Fig. 11-16. Disposiciones de los genes de opsinas en el cromosoma X.

Panel 11-2. Defectos hereditarios de la visión de los colores

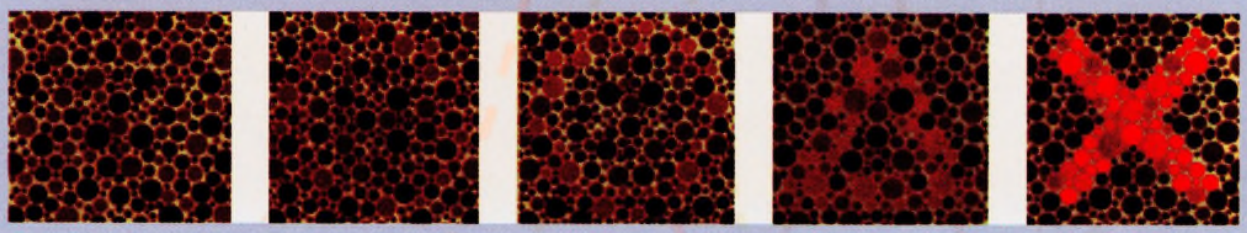


Fig. 1. Prueba para la percepción del color rojo (reproducido con autorización de Neitz, Neitz y Kainz, Science 1996; 274:802).

Los defectos en la percepción de los colores verde y rojo son muy frecuentes entre los varones. La deficiencia más común, que llega hasta uno de cada veinte varones, es la deuteranomalía, es decir, la percepción defectuosa del verde. En las personas de visión normal (tricromática), la percepción de las diferencias entre verde y rojo está basada en las diferencias en el espectro de los pigmentos verde (longitud de onda media) y rojo (longitud de onda larga), diferencias que se deben principalmente al dominio codificado por el exón 5 en ambos genes. En los daltonismos falta uno de los dos pigmentos normales, generalmente porque los genes de pigmentos *PCR* y *PCV*, únicos o repetidos, se aparean (por su gran grado de homología), pero ilegítimamente (es decir, verde con rojo) en una meiosis femenina, y por entrecruzamiento se forma un gen híbrido rojo-verde que no produce pigmento normal. Otras veces, un gen único de pigmento sufre una mutación puntual en el exón 5, que altera el espectro del pigmento. En ausencia de un exón diferencial 5, las diferencias menores que haya en los exones 2, 3 y 4, entre los genes *PCR* y *PCV* resultantes de entrecruzamiento o mutación, son lo único que permite algún grado variable de percepción del verde en los deuteranómalos, es decir que su grado de percepción del verde es proporcional a las diferencias en las secuencias de los exones restantes.[20] De este modo, un test de percepción del color puede informar sobre las diferencias en el ADN (fig. 1). En casos raros, si ya existe un gen híbrido inactivo y se produce una mutación anuladora del gen restante (p. ej., en la región reguladora en 5'), puede anularse la percepción de ambos colores (verde y rojo) y quedar solamente una visión monocromática azul.[21]

No sólo hay una notoria diferencia en los sexos respecto de la ceguera al rojo o al verde, sino que recientemente se ha comprobado que las mujeres poseen un potencial para la visión tetracromática y al poseer la expresión de más de tres tipos de genes para el color, poseen mayor agudeza para discriminar colores.[22] La extrema rareza de la ceguera al color en mujeres se debe (al igual que lo que sucede para otros genes del cromosoma X) a que las mujeres poseen dos cromosomas X, y es muy improbable que hayan recibido la misma mutación de ambos padres; por consiguiente, uno de sus alelos es normal. Por otra parte, las mujeres sufren la inactivación al azar de uno de sus cromosomas X (proceso de lionización, véase más adelante) y por consiguiente los tejidos de la mujer son *mosaicos* respecto de sus dos cromosomas X. En el daltonismo, esto se concreta en que la retina de la mujer contiene un 50% de los conos con el alelo normal, y eso le es suficiente para percibir el color. Además, cualquiera de los genes del cromosoma X puede expresarse en diferentes células de la retina femenina; por consiguiente, los conos que poseen genes "híbridos" (verde-rojo) también se expresan en la retina de la mujer, agregando un tipo celular adicional que permite discriminar matices de color más sutiles[22] además de los colores primarios.

El síndrome de Lesch-Nyhan (déficit grave de *HPRT*) ocurre con una frecuencia de 1 en 230.000 varones nacidos vivos, no tiene un tratamiento eficaz y lleva a la muerte del paciente en la segunda década de la vida luego de un gran sufrimiento.[23] En el nacimiento no hay síntomas claros, pero a partir de los tres meses se observa hipotonía, retraso en el desarrollo de los movimientos, movimientos espásticos, temblor postural y otros síntomas de afectación del sistema

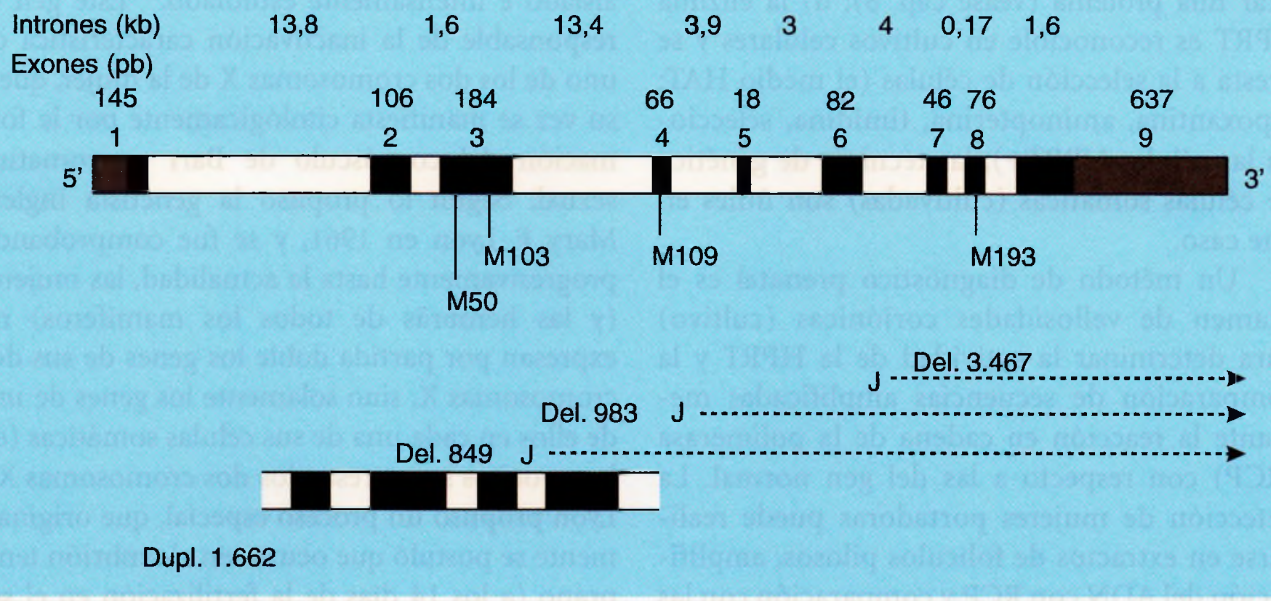


Fig. 11-17 Gen *HPRT* Los exones y los intrones están representados con escalas diferentes. Los exones 1 y 9 contienen regiones no traducidas (grisado). Más abajo del gen se señalan varias mutaciones puntuales (M), varias deleciones parciales y una duplicación parcial, que muestran la heterogeneidad mutacional en la enfermedad.[24]

nervioso, que a partir del año se hacen más claramente de tipo extrapiramidal, con hiperreflexia y movimientos coreoatetósicos.

El desarrollo mental está claramente afectado ya en los primeros años de vida; hay crisis convulsivas y se desarrolla en los niños el síndrome más llamativo: la agresividad contra sí mismos y los demás, con la característica de llegar a las automutilaciones (los niños se muerden los labios, la lengua, los dedos, hasta mutilarse, y compulsivamente se golpean la cabeza contra los objetos) La muerte se produce por infecciones o insuficiencia renal. Hay un aumento significativo y precoz del ácido úrico en plasma (hiperuricemia) tanto en la forma grave como en la leve, y en esta última se desarrollan, con la edad, cálculos renales y depósitos de uratos en las articulaciones, con manifestaciones de gota. Existe deficiencia de la enzima HPRT en las células de todos los pacientes. Los datos de autopsia no muestran signos característicos en los núcleos basales del encéfalo, excepto que la concentración de dopamina en estos centros es menor del 30% de la normal. La enzima HPRT está distribuida en todos los tejidos, pero su actividad más alta se encuentra en los núcleos basales del encéfalo y en el testículo. La enzima tiene 217 aminoácidos y se encuentra en forma activa como tetrámero.

El gen *HPRT* humano ocupa 44 kb y consiste en nueve exones y ocho intrones cuyas secuencias limitantes están bien conservadas entre especies (el gen del ratón tiene los mismos exones) (fig. 11 17).[24]

El gen codifica un ARNm de 1.650 pb y su producto es el monómero proteico de 218 aminoácidos (la metionina aminoterminal es cortada luego de la traducción) Es interesante que se hayan detectado al menos cuatro seudogenes del *HPRT* en los autosomas 3, 5 y 11

Varios aspectos interesantes de este gen son. a) las alteraciones que dan lugar a la enfermedad son muy variadas: mutaciones puntuales, deleciones variadas y duplicaciones; es decir que hay una *heterogeneidad mutacional* evidente (véase fig. 11 17), b) aproximadamente del 30 al 50% de los pacientes poseen mutaciones "de novo", lo cual es frecuente en genes localizados en el cromosoma X, c) más de la mitad de los pacientes del síndrome de Lesch Nyhan no producen una proteína reconocible inmunológicamente, es decir que muchos son portadores de mutaciones de desencuadre o sin sentido, y no pueden codi

ficar una proteína (véase cap. 8), d) la enzima HPRT es reconocible en cultivos celulares y se presta a la selección de células (el medio HAT· hipoxantina, aminopterina, timidina, selecciona las células HPRT+), las técnicas de genética de células somáticas (cultivadas) son útiles en este caso.

Un método de diagnóstico prenatal es el examen de vellosidades coriónicas (cultivo) para determinar la actividad de la HPRT y la comparación de secuencias amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) con respecto a las del gen normal. La detección de mujeres portadoras puede realizarse en extractos de folículos pilosos, amplificación del ADN con RCP y comparación con las secuencias normales.

Síndrame de Hunter y otras enfermedades ligadas al sexo

Las enfermedades ligadas al X descritas con anterioridad son parte de un grupo de más de un centenar de patologías asociadas con genes de este cromosoma y que presentan un tipo de herencia similar. Entre ellas se encuentra el *síndrome de Hunter* o mucopolisacaridosis de tipo II, causada por mutaciones del gen *IDS*, que codifica la enzima *id*uronato-sulfatasa, y que es una típica enfermedad de almacenamiento patológico, como se explicará en el capítulo sobre errores genéticos del metabolismo. En el síndrome de Hunter hay una acumulación de mucopolisacáridos en varios tipos celulares, entre ellos los leucocitos sanguíneos. El cuadro clínico es grave: son niños con hepatomegalia, macrocefalia, rigidez articular, deficiencia mental, hipertricosis, alteraciones óseas en columna vertebral y huesos de los miembros; fallecen entre los 10 y los 20 años.

Inactivación del cromosoma X. Gen *XIST* y compensación de dosis

En una región del brazo largo del cromosoma X relativamente cercana al centrómero (Xq13) se encuentra el gen *XIST* = *XITE* (del inglés *XIST*, X Inactivo, Transcripto Específico), aislado e intensamente estudiado.[25] Este gen es responsable de la inactivación característica de uno de los dos cromosomas X de la mujer, que a su vez se manifiesta citológicamente por la formación del corpúsculo de Barr o cromatina sexual. Según lo propuso la genetista inglesa Mary F. Lyon en 1961, y se fue comprobando progresivamente hasta la actualidad, las mujeres (y las hembras de todos los mamíferos) no expresan por partida doble los genes de sus dos cromosomas X, sino solamente los genes de *uno* de ellos en cada una de sus células somáticas (en los ovocitos se expresan los dos cromosomas X) Lyon propuso un proceso especial, que originalmente se postuló que ocurre en el embrión temprano (a los 14 días de la fertilización en el ser humano), por el cual cada célula del macizo celular interno del embrión selecciona por azar uno de los dos X, el materno o el paterno, para ser inactivado, y una vez que se realiza esta elección, todas las células hijas mantienen ese cromosoma específico inactivo, es decir que se forman clones o líneas celulares que tienen inactivo el cromosoma X paterno y otros clones que tienen de ese modo al X materno, de lo cual resulta un embrión y un organismo, finalmente) que es un *mosaico* para los cromosomas Xm (materno) y Xp (paterno) (fig. 11 18)

De esta manera, si bien todas las células somáticas de la mujer tienen un cromosoma X inactivo (generalmente visible como un corpúsculo de cromatina condensada), ese cromosoma X no es el mismo en células diferentes: puede ser el Xp o el Xm. Muchas pruebas muestran esta heterogeneidad funcional del X en la mujer; por ejemplo, una mujer heterocigota para un alelo variante del gen *G6PD* (véase antes) presenta dos poblaciones de eritrocitos: una con la G6PD normal y otra con la mutante (aunque no son fáciles de separar entre sí) Si se realizan cultivos de fibroblastos de la piel de esa mujer, el cultivo contiene células de los dos tipos (con Xm o Xp inactivo), cuando se toman células aisladas y a partir de cada una se hacen subcultivos, se observa que aproximadamente la mitad de ellos contiene activo el Xp y el resto contiene activo el Xm. La visibilidad del mosaicismo del X depende de varios factores: si se trata de células

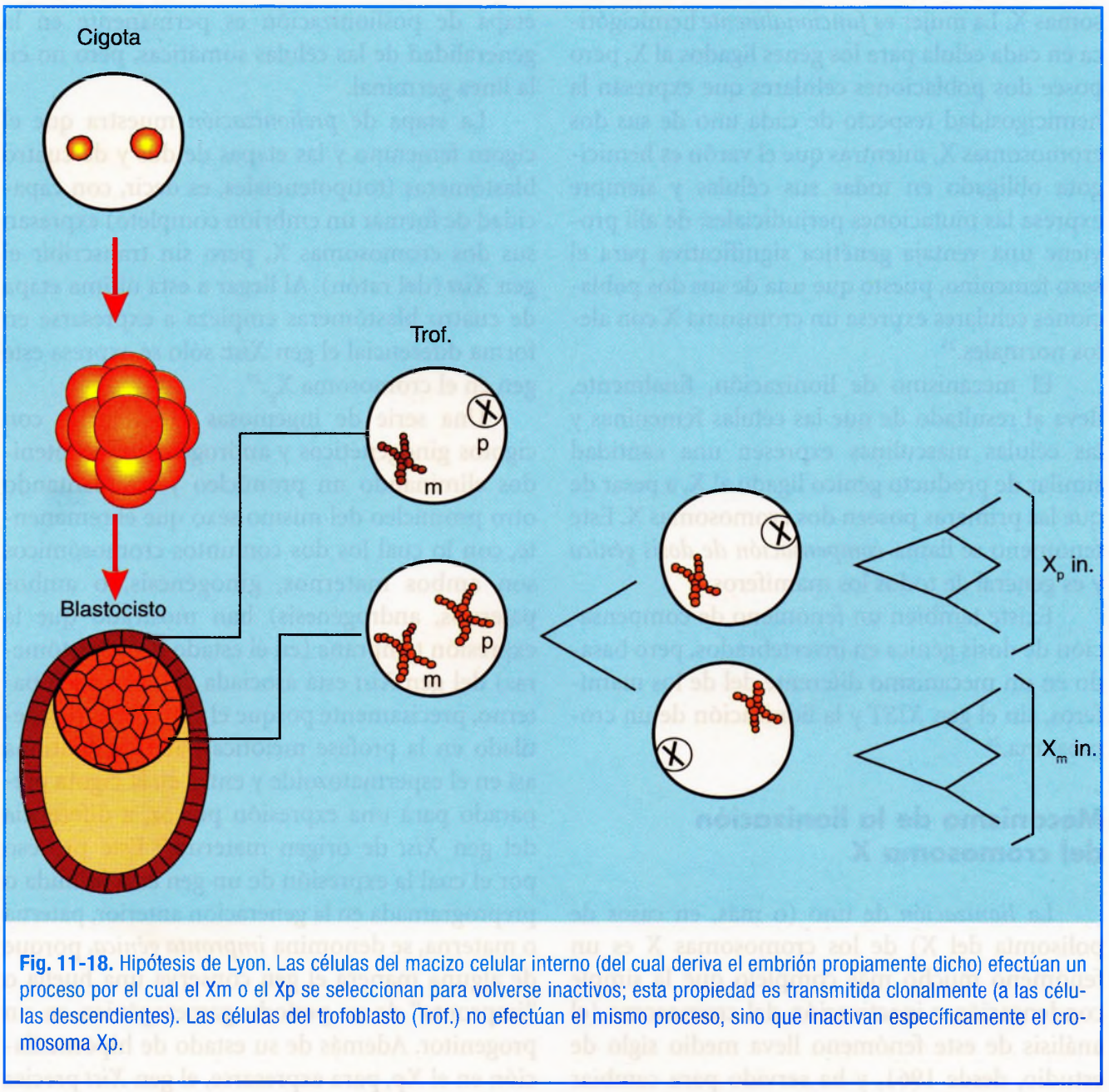


Fig. 11-18. Hipótesis de Lyon. Las células del macizo celular interno (del cual deriva el embrión propiamente dicho) efectúan un proceso por el cual el Xm o el Xp se seleccionan para volverse inactivos; esta propiedad es transmitida clonalmente (a las células descendientes). Las células del trofoblasto (Trof.) no efectúan el mismo proceso, sino que inactivan específicamente el cromosoma Xp.

migrantes o del medio sanguíneo, los dos tipos celulares están mezclados entre sí (es el caso de los eritrocitos). Si, en cambio, su posición es relativamente fija, como las células epidérmicas (que se distribuyen de acuerdo con los dermatomas del embrión), es posible observar cúmulos grandes de células de cada tipo, que pueden ofrecer un aspecto en parches. Tal es el caso de las mujeres heterocigotas para el gen anormal de la displasia ectodérmica anhidrótica (DEA − EDA), mutación que provoca el déficit de desarrollo de las glándulas sudoríparas y que en la mujer aparece en parches grandes en la piel. Las células de la retina femenina también están segregadas en parches respecto de los genes de opsinas, y es justamente esta distribución en parches lo que le da a la mujer heterocigota para una deleción del gen *PCR* o *PCV* una discriminación visual de los colores cercana a la normal.

En términos generales, la inactivación o *lionización* (del nombre de la investigadora Mary Lyon) de un cromosoma X, al convertir a la mujer en un mosaico celular para los cromosomas X, opera produciendo una protección propia del sexo femenino frente a la presencia de mutaciones perjudiciales en uno de sus cromo-

somas X. La mujer es *funcionalmente* hemicigótica en cada célula para los genes ligados al X, pero posee dos poblaciones celulares que expresan la hemicigosidad respecto de cada uno de sus dos cromosomas X, mientras que el varón es hemicigota obligado en todas sus células y siempre expresa las mutaciones perjudiciales; de allí proviene una ventaja genética significativa para el sexo femenino, puesto que una de sus dos poblaciones celulares expresa un cromsoma X con alelos normales.[25]

El mecanismo de lionización, finalmente, lleva al resultado de que las células femeninas y las células masculinas expresen una cantidad similar de producto génico ligado al X, a pesar de que las primeras poseen dos cromosomas X. Este fenómeno se llama *compensación de dosis génica* y es general de todos los mamíferos.

Existe también un fenómeno de compensación de dosis génica en invertebrados, pero basado en un mecanismo diferente del de los mamíferos, sin el gen *XIST* y la lionización de un cromosoma.[26]

Mecanismo de la lionización del cromosoma X

La *lionización* de uno (o más, en casos de polisomía del X) de los cromosomas X es un fenómeno mucho más complejo que la simple condensación e inactivación del cromosoma (el análisis de este fenómeno lleva medio siglo de estudio, desde 1961, y ha servido para cambiar los conceptos de regulación génica por ARN, la conformación activa de la cromatina, impronta génica y los territorios subnucleares) Es un *proceso de desarrollo*, que afecta al cromosoma X en etapas sucesivas, aún incompletamente conocidas.[27,28] Las etapas de este proceso se pueden clasificar en tres partes: a) etapa de *prelionización*, b) etapa de *lionización* y c) etapa de *poslionización*. La etapa de prelionización de los cromosomas X abarca desde la fertilización hasta el día 14 del desarrollo embrionario humano; la etapa de lionización se desarrolla aproximadamente el día 14 pero con diferencias de tiempo en distintas células, de lo cual proviene una distribución no regular de la inactivación en diferentes tejidos; la etapa de poslionización es permanente en la generalidad de las células somáticas, pero no en la línea germinal.

La etapa de *prelionización* muestra que el cigoto femenino y las etapas de dos y de cuatro blastómeras (totipotenciales, es decir, con capacidad de formar un embrión completo) expresan sus dos cromosomas X, pero sin transcribir el gen *Xist* (del ratón) Al llegar a esta última etapa de cuatro blastómeras empieza a expresarse en forma diferencial el gen *Xist*: sólo se expresa este gen en el cromosoma X_p.[27]

Una serie de ingeniosas experiencias con cigotos ginogenéticos y androgenéticos (obtenidos eliminando un pronúcleo y trasplantando otro pronúcleo del mismo sexo que el remanente, con lo cual los dos conjuntos cromosómicos son ambos maternos, gmogénesis, o ambos paternos, androgénesis) han mostrado que la expresión temprana (en el estado de 4 blastómeras) del gen *Xist* está asociada con el origen paterno, precisamente porque el gen *Xist* es desmetilado en la profase meiótica paterna, continúa así en el espermatozoide y entra en la cigota preparado para una expresión precoz, a diferencia del gen *Xist* de origen materno.[27] Este proceso por el cual la expresión de un gen está influida o preprogramada en la generación anterior, paterna o materna, se denomina *impronta génica*, porque de alguna manera el gen conserva una huella o "impronta" de su período gametogénico en un progenitor. Además de su estado de hipometilación en el Xp, para expresarse, el gen *Xist* precisa un factor citoplasmático presente en el ovocito. Posteriormente, al formarse el trofoblasto (trofectodermo), se produce *exclusivamente* en las células trofoblásticas la inactivación selectiva del Xp; por consiguiente, esta inactivación no es una lionización, sino el resultado de la impronta génica del cromosoma X paterno.

La etapa de lionización comienza con el borrado de la impronta génica en las células del macizo celular embrionario, las cuales dan lugar al embrión propiamente dicho; dicho borrado ocurre al mismo tiempo que una desmetilación general del genoma de las células embrionarias, por eso se cree que ambos procesos están vinculados entre sí. Al mismo tiempo, el factor de ori

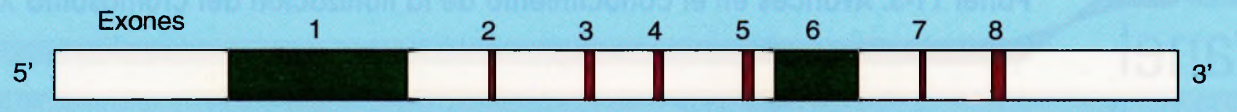


Fig. 11-19. Esquema del gen *XIST* Los exones más largos son el 1 y el 6, pero no tienen el mismo sentido que en otros genes, puesto que no codifican polipéptidos sino el ARN regulador *XIST*

gen materno necesario para la expresión del *Xist*, que en apariencia se agota rápidamente en las células proliferantes del macizo y que correspon de a un gen con impronta materna, empieza a ser producido nuevamente; en ese momento se pone en ejecución un recuento de cromosomas X, cuyo mecanismo se desconoce, pero cuyo efecto es la inhibición del gen *Xist* en un cromosoma X y la expresión de ese gen en todo otro cromoso- ma X adicional (recordemos que la expresión del *Xist* conduce a la inactivación del cromosoma donde está situado el gen: efecto en "cis") Por consiguiente, uno de los cromosomas X queda activo y el otro silenciado; pero este proceso se realiza en forma independiente en cada célula, lo que dará origen al mosaicismo X_m/ X_p.

La etapa de poslionización en las células somáticas consiste en la transmisión constante a las células descendientes del estado de los cromo- somas X en la célula progenitora. Esta transmi sión clonal parece invariable, salvo algunas pocas excepciones (en células en cultivo, células tumo- rales y células envejecidas) En la línea germinal, los pregonocitos sufren el proceso de lionización, pero lo revierten en los ovocitos, al comienzo de la profase meiótica, para llegar a ovocitos deslio- nizados, en los cuales se expresan ambos cromo- somas X.

Aspectos moleculares de la lionización

El gen *XIST*, localizado en Xq13 y estrecha- mente ligado al *RPS4X* (gen de la proteína ribo- sómica S4 del X) y al *PHKA1*,[29] se extiende por cerca de 80 kb y tiene una organización muy peculiar, porque no posee marcos de lectura abiertos de extensión apropiada para codificar polipéptidos; en realidad, el gen *XIST* se transcri be pero no se traduce en ningún polipéptido sig- nificativo. El producto del gen *XIST* es directa mente un ARN que actúa sobre el propio cromo- soma X (en "cis") mediante un mecanismo que gradualmente fue reconocido de regulación génica por ARN La acumulación progresiva de este ARN sobre la región periférica al gen, provo- ca un cambio de conformación de la cromatina que se va extendiendo y finalmente abarca todo el cromosoma, inhibiendo su actividad trans- cripcional. Las secuencias del gen humano *XIST* y las del gen homólogo del ratón *Xist* son poco semejantes, por lo cual no parecen conservadas (esto último es lo esperado si codificara una pro- teína). El gen *XIST* consta de ocho exones y su producto de transcripción es mayor de 15 kb (fig. 11 19)

Con respecto al proceso de lionización (también llamado *inactivación aleatoria.* para distinguirla de la inactivación del X por impron ta génica), se consideran sucesivas etapas: a) "reconocimiento" mutuo de los cromosomas X y consiguiente *recuento* del número de X, quedan do uno de ellos "marcado" mediante el silencia miento de su gen *XIST*, b) *extensión* de la señal de inactivación a lo largo del cromosoma X (en "cis") y c) fijación de este efecto mediante meti lación de las islas CpG de los genes en los X inac- tivos y transmisión clonal a las células hijas. En esta fase, los promotores metilados en los X inac- tivos están asociados a histonas con "colas" modificadas (en especial por metilación, véase cap. 7) que bloquean el acceso de factores de transcripción al promotor.

Además, es importante resaltar que hay un número de genes que, a pesar de estar en un cro- mosoma X inactivo, son resistentes al proceso de lionización y mantienen su actividad transcrip- cional. Estos genes son: a) los de la región seudo-

Panel 11-3. Avances en el conocimiento de la lionización del cromosoma X

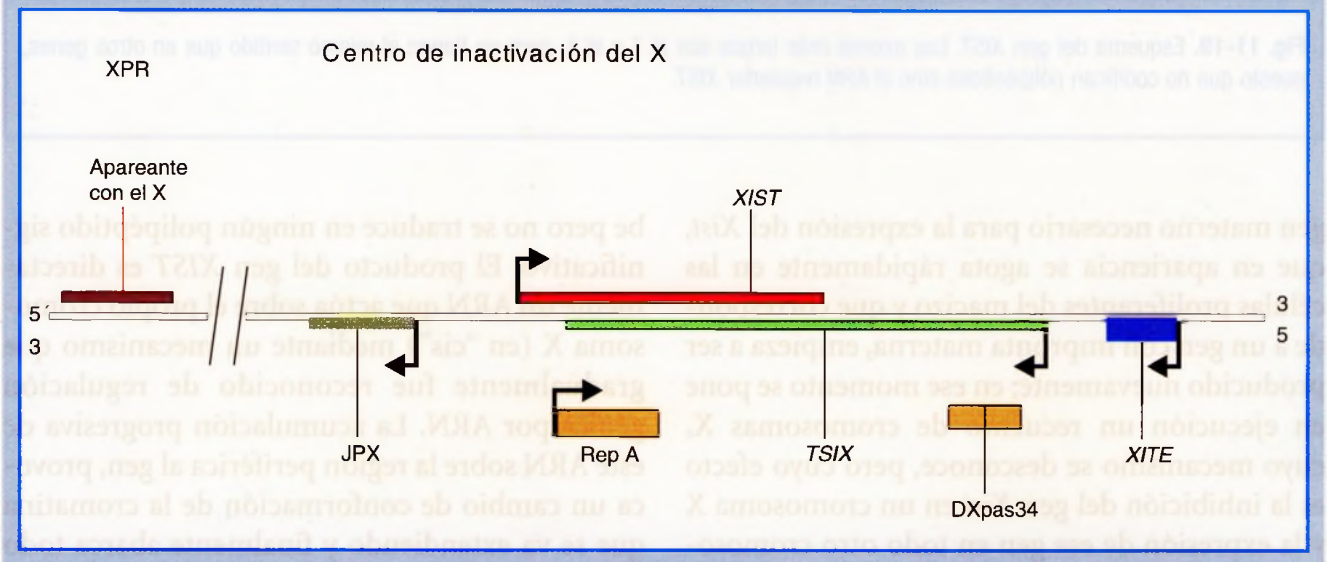


Fig. 1. Región del XIC (centro de inactivación del cromosoma X). Mientras el gen *XIST* está en la cadena superior y es transcripto hacia la derecha, el gen *TSIX* (de antisentido) es transcripto en la cadena complementaria. El regulador DXPas34 está del lado 3' de *XIST*. El gen de ARN regulador *XITE* es un "intensificador" del *TSIX* que mantiene activo a este último. XPR es una región alejada a 200 kb del XIST que interviene en el apareamiento de los dos cromosomas X de la mujer antes de la lionización. JPX es una secuencia reguladora que transcribe un ARN no codificante y que hipotéticamente es un intensificador de *XIST*. RepA es una secuencia con repeticiones, cuyo ARN transcripto es necesario para la activación de XIST.[32]

Coincidiendo con las ideas propuestas por M. Lyon y cols., el *proceso* que significa la inactivación de un cromosoma X no es producido por un único gen, sino que es un proceso en cascada en el cual intervienen varios elementos. El más importante sigue siendo el gen ***XIST***, codificante de un ARN no traducible que se va acumulando y "decora" el X inactivo (véase texto principal). Sin embargo, y tal como se preveía, la *región entera* que contiene el *XIST* (llamada **XIC**: Centro de Inactivación del X), región que abarca unos 680 kb en el X humano,[30] comprende otros elementos génicos imprescindibles para la lionización del X. Un hecho fundamental es que en esta región (XIC) se produzcan varios transcriptos de *antisentido*, es decir que se transcriban ambas cadenas (en sentidos opuestos) en el *mismo sitio*, lo cual producirá transcriptos complementarios entre sí que, como se ha visto en el capítulo 7 (interferencia de ARN), tienden a silenciar ese sitio. El transcripto de antisentido más importante es el "**TSIX**" (inversa de *XIST*), que es un transcripto de alrededor de 40 kb, que se superpone parcialmente con *XIST* (fig. 1).

El tercer elemento importante conocido de la región XIC es un elemento regulador pequeño, rico en CpG y que contiene un ADN minisatélite de 34 nucleótidos, repetidos como unidades.[31] Este regulador, llamado **DXPas34** (de X, sitios de HpaII, satélite de 34), está situado del lado 3' del gen *XIST* y es esencial para la iniciación de la lionización, porque es posiblemente el sitio de iniciación del transcripto de antisentido TSIX[30] (fig. 1).

El proceso probablemente se inicia a través de una mínima transcripción del XIST en células embrionarias, insuficiente para provocar otros efectos, y una transcripción antisentido de *TSIX*, que evita acciones ulteriores del *XIST*. En el momento de inicio de la lionización, el regulador de *TSIX*, es decir el elemento DXPas34, si recibe una señal (proteína, desconocida) deja de ser el sitio de comienzo del transcripto antisentido TSIS, permitiendo así la acumulación del *XIST*. A su vez, la acumulación de *XIST*, va produciendo los sucesivos efectos: extensión de la "decoración" del cromosoma, reclutamiento de la histona especial macroH2A1, metilación de la lisina 9 de la histona H3 de los nucleosomas y desacetilación de las histonas (con la consiguiente condensación de la cromatina), finalizando con la metilación de regiones controladoras CpG de los genes que van a ser silenciados.

Otro aspecto importante es que no todos los genes del X lionizado están inactivos; hay un conjunto de genes que regularmente "escapan" de la inactivación. En primer lugar, los genes de la región seudoautosómica (véase cap. 10) siempre están activos. En segundo lugar, en el *brazo corto* del X humano, que desde un punto de vista evolutivo es una "adquisición reciente" del X de los mamíferos placentados, hay un número considerable de genes no silenciados, con un cierto gradiente decreciente hacia el centrómero (fig. 2). Finalmente, en el brazo largo, la región del centro de inactivación del X (XIC) también permanece activa en un X lionizado.[33]

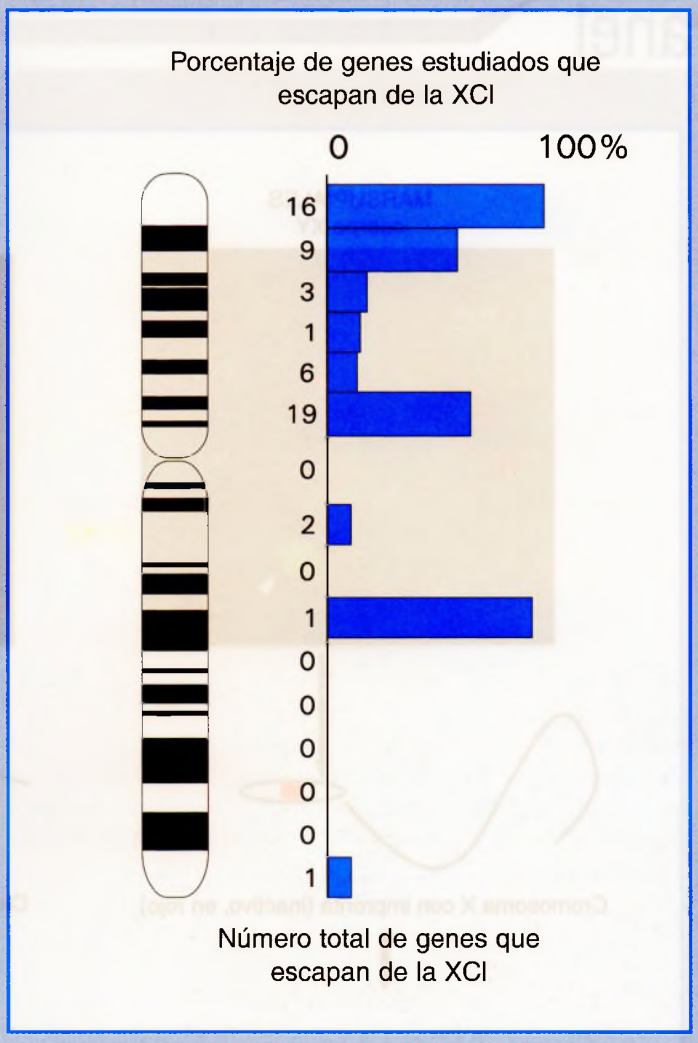


Fig. 2. Representación del cromosoma X y de los genes que "escapan" normalmente de la inactivación en el cromosoma X lionizado.

autosómica, b) ciertos genes cercanos a la región seudoautosómica como *KALIG1* y *STS*, c) genes cercanos al *XIST*, como el *RPS4X* y d) unos pocos genes adicionales en el brazo corto del X, que incluyen *ZFX* y *UBE1* (véase panel 11 3)

El papel de los ARN no codificantes de proteína en la regulación génica

La lionización del cromosoma X depende de la presencia del gen de ARN *XIST* De forma similar, la actividad del gen *XIST* depende del gen de ARN de antisentido *TSIX*. Para la activi dad del gen *TSIX*, a su vez es necesaria la presencia del gen de ARN regulador *XITE*. Finalmente hay "intensificadores" para el *XIST* es el *JPX*, así como para el TSIX sería el XITE (véase fig. 1 en panel 11-3) Este complejo armazón de ARN ha llevado a renovar el concepto general de la función de los transcriptos de ARN que son tan frecuentes en el núcleo y de cuya función no se tenían muchas eviden cias. En el genoma humano hay más de 84.000 transcriptos primarios de acuerdo con los resultados del proyecto del genoma humano, de los cuales sólo alrededor de 25.000 corresponden a genes de proteínas. En el ratón sucede algo similar, puesto que hay 181.000 transcriptos.[32] Estos ARN son de tamaño variable, pero muchos de ellos son grandes hasta de 100.000 kb y forman un gran conjunto de transcriptos a los cuales se les asignan ahora funciones de regulación, puesto que muchos de

Panel

Panel 11-4. Origen evolutivo del gen *XIST* y de la lionización

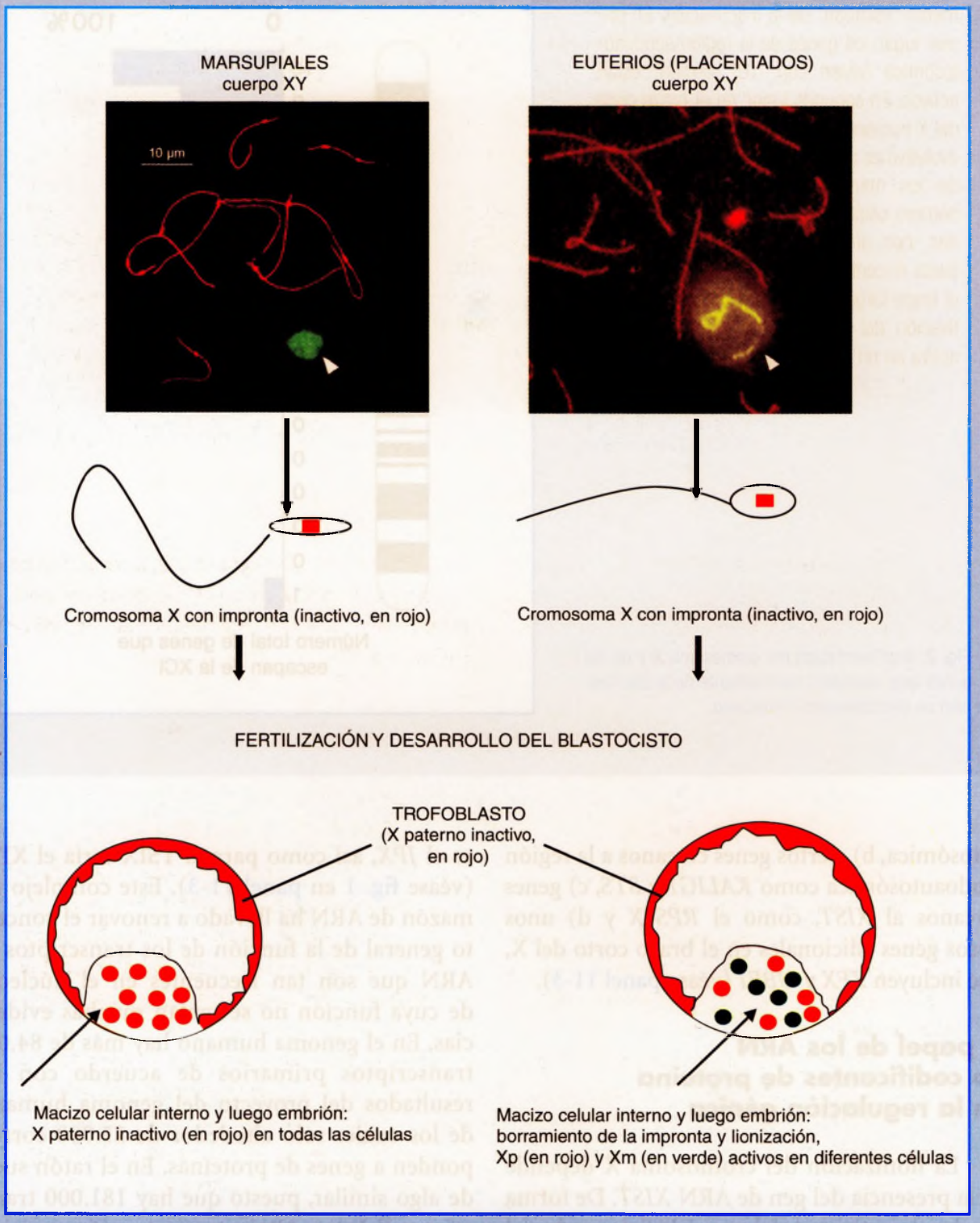


Fig. 1. Origen evolutivo de la inactivación del cromosoma X. En los marsupiales (izquierda), la inactivación de un X es por impronta génica paterna, proveniente de la inactivaciom en el cuerpo XY (cabeza de flecha blanca) de los espermatocitos (de Franco et al., 2007).[36] En los mamíferos euterianos, la impronta del X paterno se mantiene solamente en el trofoblasto y se borra en el macizo celular interno (derecha) donde luego se produce la lionización.

El gen *XIST* es un "invento" de los mamíferos placentados (*o euterianos*). Este gen no se encuentra en ninguna otra clase de vertebrados y, además, no se encuentra en los mamíferos marsupiales.[35]

Sin embargo, en los mamíferos marsupiales hay una compensación de dosis génica del cromosoma X en las hembras, aunque este tipo de compensación de dosis no es una lionización del segundo X, porque se inactiva específicamente el X de origen paterno en todas las células somáticas. Es similar, entonces, a la inactivación muy temprana que ocurre en el trofoblasto de los euterianos. Este tipo de inactivación del segundo X se llama "por impronta génica" y está relacionado con la formación de un cuerpo XY en los espermatocitos, que es idéntica en marsupiales y en euterios, como se demostró en la Argentina.[36] El cuerpo XY, de cromatina inactiva, se forma por un mecanismo que no requiere el gen *XIST* (véase cap. 10). Se ha comprobado que la inactivación transcripcional propia del cuerpo XY se mantiene después de la meiosis, y de esa forma el cromosoma X en los espermatozoides contiene una impronta génica para la inactivación, que es limitada al trofoblasto en los euterianos como el ratón y el ser humano, pero que está presente en todas las células somáticas de los marsupiales.[37] Por consiguiente, el gen *XIST* apareció en el curso de la evolución biológica luego de la separación de los marsupiales y euterios, y permitió un nivel de sofisticación mayor al nivel genómico en estos últimos, por las ventajas del mosaicismo de los cromosomas X producto de la lionización (fig. 1).

ellos son transcriptos de antisentido de genes de proteínas.[32,34]

De estos estudios ha partido un renovado interés por la función de los genes de ARN "largos" (hasta 100 Kb) que se adiciona al interés de los genes de ARN cortos (100 pb o menos) que intervienen en los fenómenos de interferencia (véase cap. 7)

RESUMEN

El fenómeno de *ligamiento* es la expresión del hecho de que dos (o más) genes están localizados en la misma molécula de ADN (cromosoma). El ligamiento es más fuerte cuanto más próximos entre sí están los genes; si están situados suficientemente lejos uno del otro, aun en la misma molécula de ADN, su ligamiento es cero, porque en término medio se producirá una fractura de la molécula durante la meiosis, en los llamados *entrecruzamientos* de cromátidas paternas y maternas, de los cuales resulta la *recombinación meiótica*.

El ligamiento variable entre genes del mismo cromosoma permite la confección de *mapas de ligamiento*, cuyas unidades son centimorgans (cM). La longitud total del mapa de ligamiento humano es de 4.320-5.200 cM para la mujer y de 3.100 cM para el varón, y de ello se deduce que 1 cM equivale aproximadamente a 1 megabase de ADN humano. Para la demostración de ligamiento es necesaria la existencia de variantes génicas (alelos diferentes) o también de variantes en las secuencias de ADN no codificantes; estas últimas constituyen los *marcadores moleculares*, que son principalmente polimorfismos de longitudes en fragmentos de restricción (PLFR), repeticiones en tándem de número variable (RTNV), los microsatélites y los SNP, todos ellos altamente *polimórficos*, es decir, con numerosas variantes en la población humana. Los mapas de ligamiento humanos permiten tener, en promedio, un marcador cada

fracción de 0,7 cM o menor. Un grupo de marcadores o genes estrechamente ligados constituye un *haplotipo*, y los haplotipos permiten distinguir los cromosomas maternos de los paternos. Para la localización y el aislamiento de genes es conveniente tener mapas de ligamiento de gran precisión, y para lograrlo se utilizan los datos de numerosas familias mediante el método de "lods". Los desequilibrios de ligamiento son útiles para detectar mutaciones recientemente aparecidas ("de novo"). Los genes localizados en el cromosoma X humano son numerosos e importantes y sus alteraciones dan un tipo característico de herencia ligada al sexo, con varones *hemicigotas* afectados y mujeres portadoras. El gen de la *distrofina* es un gen "gigante", de 79 exones, cuyas alteraciones provocan la grave *distrofia muscular* de *Duchenne* o formas más leves; el gen del *factor VIII* de la coagulación, cuando está alterado, causa la hemofilia de tipo A; el gen muy polimórfico de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PD*) da mutantes "condicionales" que sólo son sintomáticos al ingerir ciertas sustancias; los genes para pigmentos visuales para los colores rojo y verde pueden dar lugar, por intercambio irregular, al *daltonismo protanope* y *deuteranope*; las alteraciones del gen *HPRT* pueden provocar el grave *síndrome de Lesch-Nyhan*, y muchos otros genes del cromosoma X pueden causar enfermedades. El gen *XIST* (X inactivo, transcripto específico) es responsable de la formación del corpúsculo de Barr y de la inactivación transcripcional de uno de los cromosomas X de las células de la mujer. El proceso complejo de inactivación, o lionización del cromosoma X, fue propuesto y comprobado por Mary F. Lyon, y se produce alrededor del día 14 del desarrollo embrionario humano, con una selección independiente, en cada célula, de cuál de los cromosomas X (el materno o el paterno) ha de ser inactivado. La lionización depende de un gen de ARN, el *XIST*, que a su vez está regulado por un complejo mecanismo de otros ARN reguladores como el *TSIX* y por intensificadores. El gen *XIST* ha permitido la lionización de los cromosomas X en los mamíferos euterianos.

REFERENCIAS

1 Wang LH, Collins A, Lawrence S, Keats BJ, Morton NE. Integration of gene maps: chromosome X. Genomics 1994; 22:590-604.

2. Morton NE, Lindsten J, Iselius L, Yee S. Data and theory for a revised chiasma map of man. Human Genet 1982; 62:266-270.

3. Renwick JH. The mapping of human chromosomes. Ann Rev Genetics 1971 5:81 120.

4. Cooperative Human Linkage Center (Murray JC, et al.). A comprehensive human linkage map with centiMorgan density. Science 1994; 265:2049-2054.

5. Jorgenson E, Tang H, Gadde M, et al. Ethnicity and human genetic linkage maps. Am J Hum Genet 2005; 76:276-290.

6. Botstein D, White RL, Skolnik M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 1980; 32:314-331

7 Philips JA. Use of linkage and restriction fragment lenght polymorphisms to detect genetic disorders. In: Kaback MM, Shapiro LJ (eds.), Frontiers in Genetic Medicine, Report of the 92nd. Ross Conference on Pediatric Research, Ross Laboratories, Columbus (Ohio), 1987·138-147

8. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. Physiol Rev 2002;82:291-329,

9. Monaco AP Walker AP Millwood I, Larin Z, Lehrach H. A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene. Genomics 1992;12: 465-473.

10. Tinsley JM, Blake DJ, Pearce M, Knight AE, Kendrick-Jones J, Davies KE. Dystrophin and related proteins. Current Op Genet Dev 1993; 3:484-490.

11 Mandel JL. Dystrophin. The gene and its product. Nature 1989; 339:584-586.

12. Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, et al. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. Hum Mutat 2009;30:1657 1666.

13. Merrick D, Stadler LKJ, Larner D, Smith J. Muscular dystrophy begins early in embrionic development deriving from stem cell ioss and disrupted skeletal muscle formation. Dis Mod Mechan 2009;2:374-388.
14. Brown RH. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. Ann Rev Med 1997· 48:457-466.
15. Repesse Y, Slaoui M, Ferrandiz D, et al. Factor VIII *(FVIII)* gene mutations in 120 patients with haemophilia A: detection of 26 novel mutations and correiation with FVIII inhibitor development. J Thromb Haemost 2007;5:1469-1476.
16. Gitschier J, Wood WI, Goralkas TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. Nature 1984;312:326-337
17 Vulliamy T, Mason P Luzzatto L. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Trends in Genet 1992;8:138-142.
18. Nathans J. The genes for color vision. Sci Amer 1989;261 42-49.
19. Neitz M, Neitz J. Numbers and ratios of visual pigment genes for normal red-green color vision. Science 1995;267·1013-1016.
20. Neitz J, Neitz M, Kainz PM. Visual pigment gene structure and the severity of color vision defects. Science 1996;274:801 804.
21 Ladekjaer-Mikkelsen AS, Rosenberg T, Jorgensen AL. A new mechanism in blue cone monochromatism. Hum Genet 1996;98:403-408.
22. Deeb SS. The molecular basis of variation in human color vision. Clin Genet 2005; 67:369-377
23. Torres RJ, Puig JG. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. Orph J Rare Dis 2007;2:48.
24 Stout JT, Caskey CT. The Lesch-Nyhan syndrome: clinical, molecular and genetic aspects. Trends in Genet 1988; 4:175-178.
25. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature 1991 349:38.
26. Solari AJ. Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. Boca Raton: CRC Press; 1993.
27 Kay GF Barton SC, Surani MA, Rastan S. Imprinting and X chromosome counting mechanisms determine X*ist* expression in early mouse development. Cell 1994;77:639-650.
28. Ballabio A, Willard HA. Mammalian X-chromosome inactivation and the X*IST* gene. Current Opin Genet Develop 1992; 2:439-447
29. Lafreniere RG, Brown CJ, Rider S, Chelly J, Taillon-Miller P Chinault AC, 2,6 Mb YAC contig of the human X inactivation center region in Xq13: physical linkage of the RPS4X, PHKA1 X*I S T* and DXS128E genes. Hum Mol Genet 1993; 2:1105-1115.
30. Clerc P Avner P Multiple elements within the Xic regulate random X inactivation in mice. Sem Cell Devel Biol 2003;14:85-92.
31 Debrand E, Chureau C, Arnaud D, Avner P Heard E. Functional analysis of the DXPas34 locus, a 3' regulator of Xist expression. Mol Cell Biol 1999;19:8513-8525.
32. Lee JT. Lessons from X-chromosome inactivation: long ncRNA as guides and tethers to the epigenome. Genes Dev 2009;23:1831 1842.
33. Brown CJ, Greally, JM. A stain upon the silence: genes escaping X inactivation. Trends in Genet 2003; 19:432-438.
34. Katayama S Tomaru Y, Kasukawa T, et al. Antisense transcription in the mammaiian transcriptome. Science 2005;309: 1564-1566.
35. Hore TA, Koina E, Wakefieid MJ, Graves MAJ. The region homologous to the X-chromosome inactivation centre has been disrupted in marsupial and monotreme mammals. Chromosome Res 2007·15:147 161
36. Franco MJ, Sciurano RB, Solari AJ. Protein immunolocalization supports the presence of identical mechanisms of XY body formation in eutherians and marsupials. Chromosome Res 2007·15:815-24.
37 Namekawa S, VandeBerg JL, McCarrey JR, Lee JT. Sex chromosome silencing in the marsupial male germ line. Proc Nati Acad Sci USA 2007·104::9730-9735.

Capítulo 12

Meiosis, recombinación y disyunción. Genética e infertilidad

La meiosis como proceso fundamental de la reproducción sexual. Las proteínas SMC y las cohesinas. Sus funciones en la mitosis y en la meiosis. Apareamiento y sinapsis de los homólogos. Complejos sinaptonémicos y sus proteínas. Cariotipos de complejos sinaptonémicos. Expresiones citológicas de la recombinación: quiasmas y nódulos de recombinación. Modelo molecular de la recombinación. Segregación y su patología, la no disyunción. Origen de las aneuploidías. Genética de la infertilidad masculina. Impronta génica. Disomía uniparental y sus efectos patológicos. Síndromes de Prader-Willi y de Angelman

INTRODUCCIÓN

La meiosis es la contrapartida de la fertilización. ambos procesos, fertilización y meiosis, constituyen la base necesaria para la reproducción sexual. La reproducción sexual está universalmente extendida en los eucariontes porque permite una evolución más eficiente de los organismos. Esta mayor eficiencia de la reproducción sexual respecto de la asexual o clonal reside en la mayor rapidez con la cual los organismos sexuados pueden adquirir combinaciones ventajosas de genes (fig. 12-1)

La capacidad de los organismos sexuados de adquirir combinaciones génicas favorables se debe precisamente a una característica esencial de la meiosis: la recombinación génica meiótica. Esta recombinación reordena todo el genoma en cada generación, de modo que los gametos producidos llevan nuevas combinaciones génicas, diferentes de las propias del organismo paterno donde ocurre la meiosis.

El otro aspecto esencial de la meiosis es más obvio: para que pueda ocurrir la smgamia (fertilización) sin que se duplique el número de cromosomas, la meiosis debe reducir previamente ese número al número haploide (básico)

La meiosis es un proceso complejo, cuyos aspectos moleculares han sido objeto de intensos estudios en años recientes. A medida que se acumulan los conocimientos, se revelan las relaciones entre la meiosis y otros procesos básicos del organismo. De esta manera, se ha visto la relación entre la recombinación meiótica y los procesos de reparación del ADN frente a fallas inducidas por radiación y otros agentes dañinos (véase cap. 8), y se ha visto la relación entre algunas proteínas de los ejes meióticos y los ejes de los cromosomas mitóticos de todas las células. Finalmente, la meiosis puede ser el marco de una aberración, origen de enfermedades cromosómicas, tal como es la no disyunción. Además, cuando la meiosis está perturbada, es una importante fuente de esterilidad.[2]

Circunstancias temporales de la meiosis humana

El momento de la meiosis difiere totalmente en los dos sexos. La meiosis humana femenina

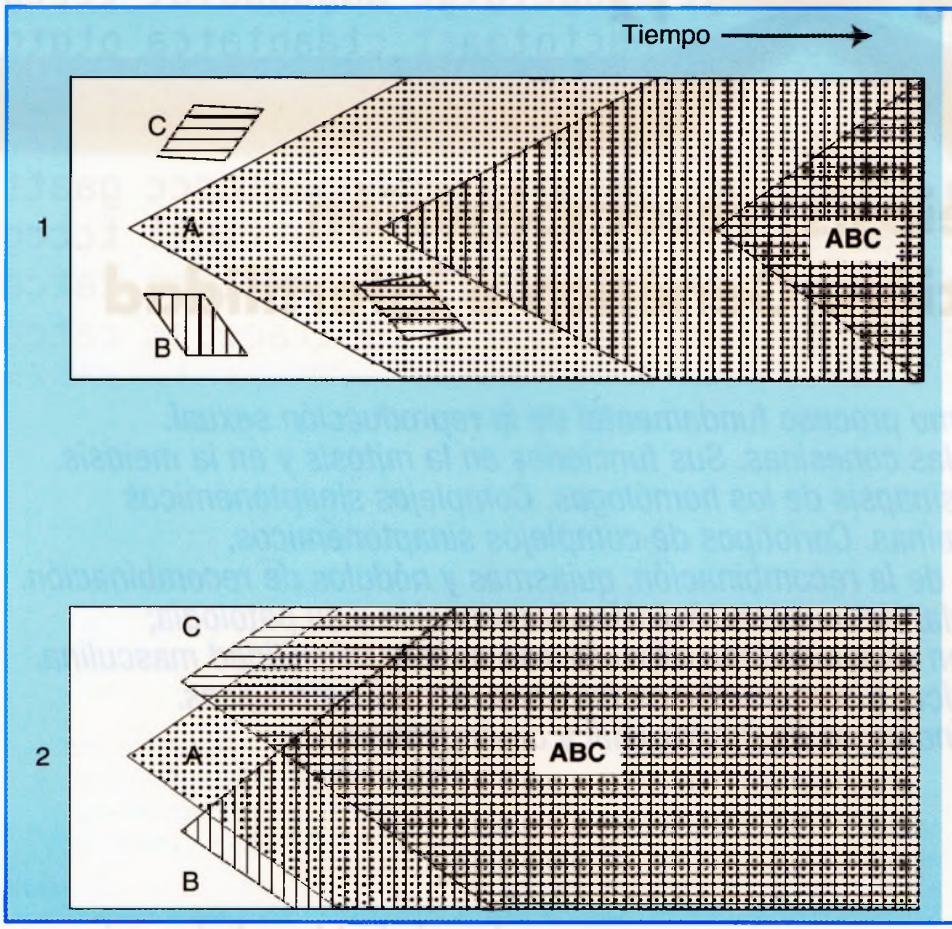


Fig. 12-1 Comparación del tiempo (en generaciones) necesario para adquirir el conjunto de mutaciones ventajosas A, B y C en un organismo asexuado (arriba) y en uno sexuado (abajo). Modificado de Maynard Smith.

comienza en el feto, se prolonga extraordinariamente, hasta la edad madura en la mujer adulta, y sólo se completa durante la fecundación.

De este modo, la meiosis de los ovocitos de la mujer transcurre en un período que dura entre 10 y 45 años o más. Esto sugiere que los ovocitos meióticos están sujetos durante mucho tiempo a un riesgo de que se perturbe este proceso. En el feto de tres meses el ovario contiene numerosos ovogonios en mitosis y algunos que han dejado de multiplicarse y comienzan a prepararse para su entrada en meiosis, transformándose en ovocitos en la etapa premeiótica. Algunas células germinales, las más precoces, entran en profase meiótica en el tercer mes.[3,4] Esto ocurre en los ovocitos más internos y del extremo cefálico y luego se extiende a los demás; en el cuarto mes de vida intrauterina hay ovocitos en meiosis, sobre todo en leptocigoteno, que van progresando en las etapas de la primera profase. Alrededor del octavo mes todos los ovocitos están más o menos sincronizados en la etapa diploteno de la profase, y en esa etapa van a continuar en la vida posnatal hasta la pubertad, cuando los folículos primordiales comienzan a madurar (de a uno) y el ovocito reinicia la parte final del diploteno. Cuando ocurre una ovulación, el ovocito se encuentra entre la primera y la segunda división meiótica, la segunda división queda suspendida hasta la fertilización, cuando ocurre la anafase de la segunda división y el pronúcleo femenino queda preparado para su unión con el masculino.[3,4]

A su vez, el proceso meiótico, en sí mismo, tiene características diferentes en la mujer y en el varón. En la mujer los cromosomas están más elongados durante la primera profase y la tasa de recombinación es mayor que en el varón, por lo cual el mapa de ligamiento de la mujer es el más largo (véase cap. 11)

En el varón, no hay meiosis testicular hasta el inicio de la pubertad; pero una vez que la espermatogénesis se establece, la meiosis sigue iniciándose durante toda la vida adulta. En el varón la duración de la meiosis puede calcularse bien por el ciclo del epitelio seminífero: un

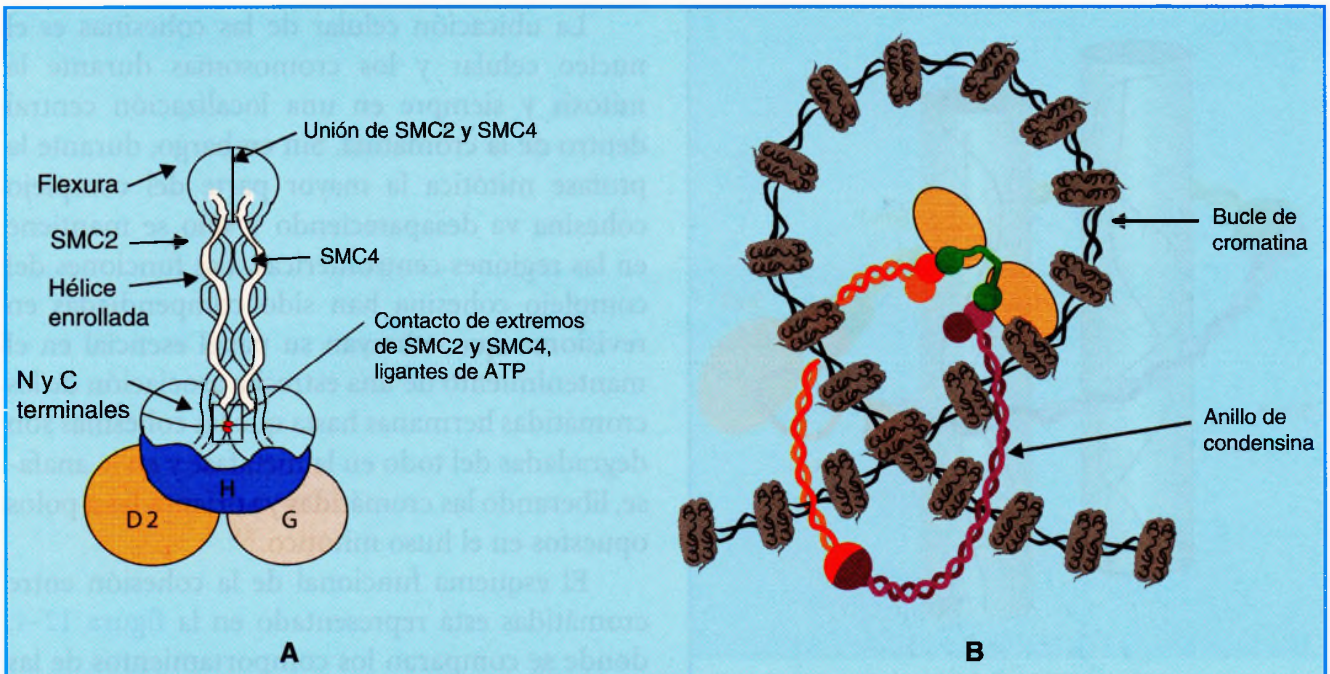


Fig. 12-2. A. Esquema de la estructura de la condensina 1 Los dos componentes largos son SMC2 y SMC4, unidos por su flexura (arriba) y por sus cabezas N y C, que son ligantes de ATP con capacidad de ATPasa. Las tres proteínas coloreadas son las accesorias que se unen a las cabezas de las dos SMC.[7] **B.** Interpretación simplificada del papel de la condensina en el compactamiento de la cromatina. El anillo de condensina encierra un bucle completo de cromatina, que no puede desplegarse sin degradación de la condensina.

espermatocito cumple todas las etapas de la meiosis en alrededor de dos semanas,[5] luego de la cual se forma la gameta masculina.

Las proteínas de manutención de la estructura cromosómica (SMCP)

Tanto para el estudio de la división mitótica como para el de la meiosis es esencial el conocimiento de un grupo nuevo de proteínas, que son las que contribuyen a mantener la forma y condensación de los cromosomas y también aseguran la asociación de las cromátidas hermanas entre sí.

Este grupo de proteínas se denomina "SMC" (del inglés Structural Maintenance of Chromosomes) y puede formar dos tipos de complejos multiproteínicos: las llamadas condensinas y las cohesinas. Estas proteínas fueron descubiertas a partir del reconocimiento de que los cromosomas mantienen su forma global aun después de la extracción de las histonas, y una especie de armazón fibroso se encuentra en los ejes de las cromátidas. Del supuesto papel de "esqueleto" del cromosoma provino el nombre del grupo de proteínas SMC, cuyos complejos fueron luego clasificados en "condensinas", supuestamente a cargo de la compactación de la cromatina del cromosoma, y "cohesinas" cuya función sería mantener la cohesión de las cromátidas hermanas desde el período de síntesis de ADN hasta la anafase mitótica.[6]

Las condensinas son complejos pentaméricos (compuestos por cinco proteínas) muy similares, en los cuales la parte principal está formada por un heterodímero de las proteínas SMC2 y SMC4, al cual se le agregan tres proteínas más pequeñas (CAPD2, CAPG y CAPH en la condensina 1 y otras tres similares en la condensina 2)[7] (fig. 12-2A)

En una interpretación simplificada, las condensinas actuarían sujetando bucles de cromatina e impidiendo su despliegue (fig. 12-2B) Sin embargo, las condensinas no son absolutamente necesarias para la condensación cromatínica

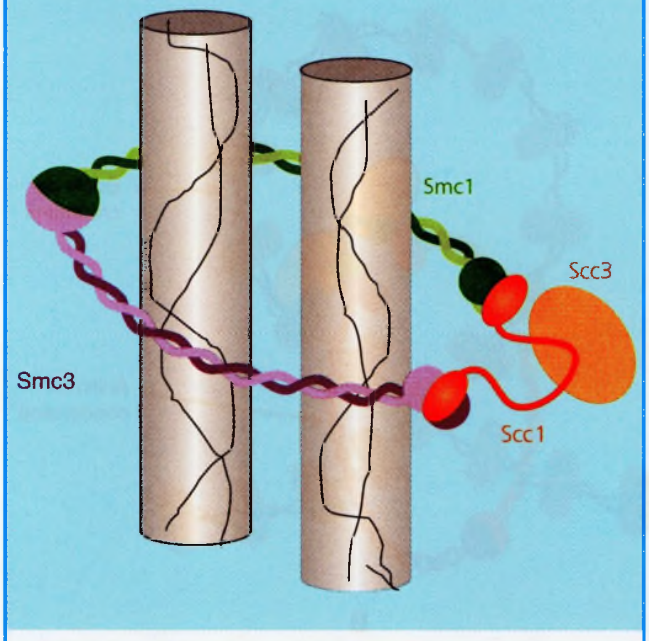


Fig. 12-3. Esquema del anillo de cohesina que contiene dos cromátidas hermanas (cilindros con hélices). Los cuatro componentes del complejo cohesina están rotulados. (Redibujado de Haering CH,Science 2004.)

sino que solamente son parte de ese proceso. Además intervienen en la regulacion de la transcripción, por un mecanismo incompletamente conocido.[7]

El papel funcional de las cohesinas ha sido muy estudiado. Las cohesinas son complejos formados por cuatro proteínas, dos de ellas de forma alargada, las SMC1 y la SMC3, que son similares en forma a las SMC2 y SMC4 que están en las condensinas. Sin embargo, en el caso del complejo de cohesina hay sólidas evidencias de que el tetrámero forma anillos, donde las SMC1 y SMC3 forman una abertura de 50 nm de diámetro, cerrada por las dos proteínas SCC1 y SCC3 o STAG1 Este anillo de cohesina puede encerrar dos moléculas de ADN en su interior, que corresponden a las dos cromátidas hermanas (fig. 12-3)

En los mamíferos, la proteína SCC3 está representada por la STAG1, o por sus variantes STAG2 y STAG3. Las proteínas STAG son grandes (la STAG1 tiene 1.258 aa), tienen un dominio conservado de estromalina y son todas similares entre sí.

La ubicación celular de las cohesinas es el núcleo celular y los cromosomas durante la mitosis y siempre en una localización central dentro de la cromatina. Sin embargo, durante la profase mitótica la mayor parte del complejo cohesina va desapareciendo y sólo se mantiene en las regiones centroméricas. Las funciones del complejo cohesina han sido compendiadas en revisiones que subrayan su papel esencial en el mantenimiento de una estrecha asociación de las cromátidas hermanas hasta que las cohesinas son degradadas del todo en la metafase y en la anafase, liberando las cromátidas ya orientadas a polos opuestos en el huso mitótico.[8,9]

El esquema funcional de la cohesión entre cromátidas está representado en la figura 12-4, donde se comparan los comportamientos de las cohesinas en la mitosis y en la meiosis.

La importancia decisiva de las cohesinas para la segregación meiótica fue demostrada en unos excepcionales organismos en los cuales los cromosomas sexuales, en vez de segregar en la primera división meiótica, separan ecuacionalmente sus cromátidas, y en la segunda división se separan las cromátidas del X y del Y. Esto ocurre en los insectos hemípteros, en los que se demostró que los cromosomas sexuales carecen de la proteína Rec8, mientras los autosomas la tienen y segregan normalmente (fig. 12-5) [11]

El esquema de funcionamiento de las cohesinas es el siguiente:

1 Asociación al ADN El complejo tetramérico de cohesina se asocia al ADN en el período S (de síntesis de ADN) del ciclo celular, inmediatamente por detrás de la horquilla de replicación. De esa manera, la cohesina mantiene las dos moléculas de ADN (cromátidas hermanas) asociadas dentro de su anillo.
2. Papel durante la profase. Durante la profase mitótica, a medida que las cromátidas comienzan a condensarse, las cohesinas se disocian parcialmente de cada cromátida y son reemplazadas por condensina. Sin embargo, en los centrómeros y regiones heterocromáticas las cohesinas permanecen inalteradas.

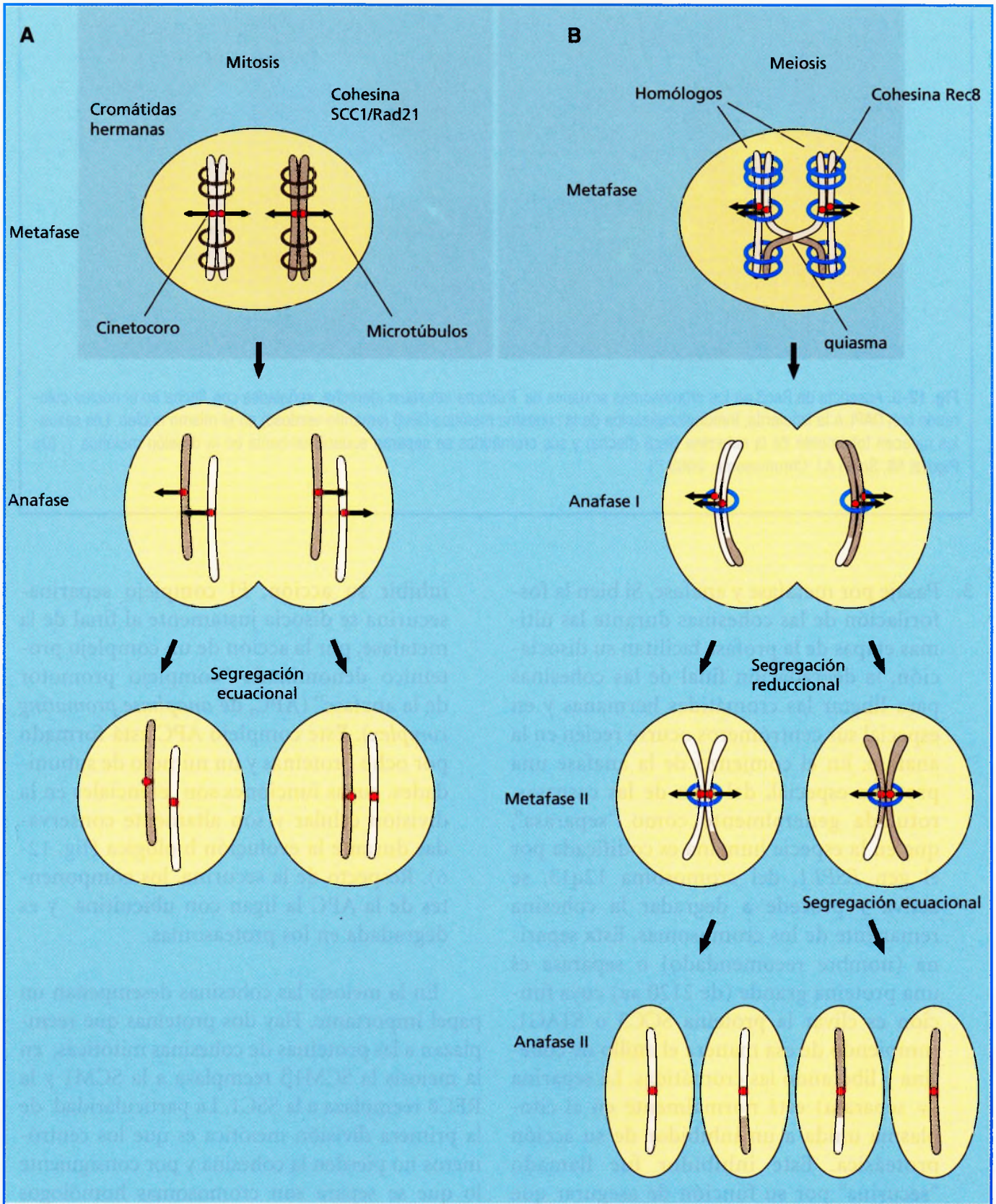


Fig. 12-4. Función de las cohesinas en la mitosis (izquierda) y en la meiosis (derecha). En la mitosis, la cohesina es degradada por la separasa en los brazos y queda en los centrómeros hasta el comienzo de la anafase, cuando pierde la protección de la shugoshina y es cortada, liberando las cromátidas para el movimiento anafásico. En la meiosis la cohesina contiene Rec8 en vez de SCC1 y esta Rec8 es degradada en los brazos pero permanece durante la primera división meiótica en los centrómeros, por lo que se separan los homólogos, y recién en la anafase II se degrada la cohesina centromérica y las cromátidas se separan.[10]

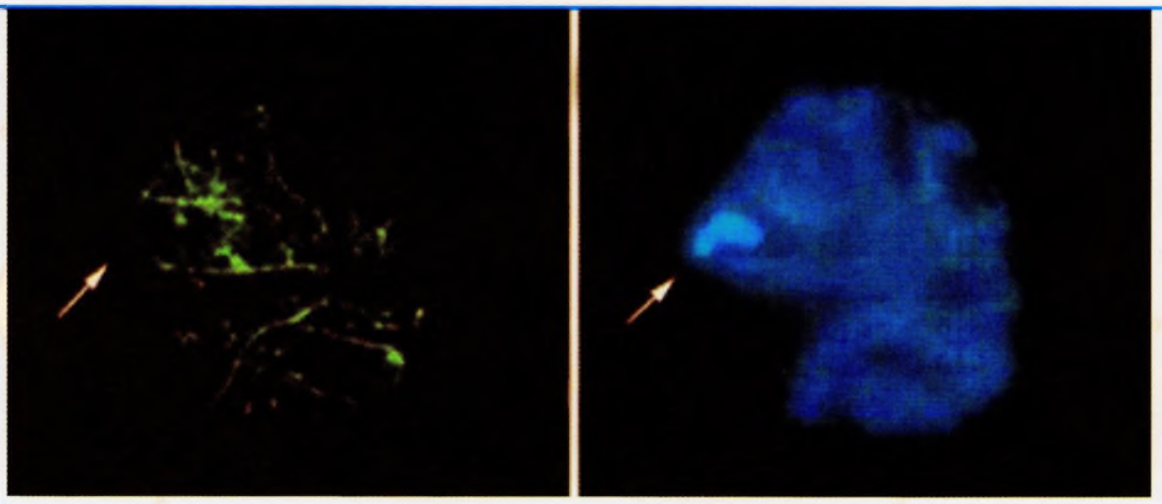


Fig. 12-5. Ausencia de Rec8 en los cromosomas sexuales de *Triatoma infestans* (derecha, señalados con flecha en el núcleo coloreado con DAPI. A la izquierda, inmunolocalización de la cohesina meiótica Rec8 (amarillo-verdoso) en el mismo núcleo. Los sexuales carecen totalmente de la cohesina Rec8 (flecha) y sus cromátidas se separan ecuacionalmente en la división meiótica 1 (De Pigozzi MI, Solari AJ, Chromosoma, 2003.[11])

3 Pasaje por metafase y anafase. Si bien la fosforilación de las cohesinas durante las últimas etapas de la profase facilitan su disociación, la degradación final de las cohesinas para liberar las cromátidas hermanas y en especial sus centrómeros ocurre recién en la anafase. En el comienzo de la anafase una proteasa especial, del tipo de las caspasas, rotulada generalmente como "separasa", que en la especie humana es codificada por el gen *ESPL1*, del cromosoma 12q13, se activa y procede a degradar la cohesina remanente de los cromosomas. Esta separina (nombre recomendado) o separasa es una proteína grande (de 2120 aa) cuya función es clivar la proteína SCC3 o STAG1, rompiendo de esa manera el anillo de cohesina y liberando las cromátidas. La separina (= separasa) está normalmente en el citoplasma unida a un inhibidor de su acción proteásica. Este inhibidor fue llamado "securina" por su función de asegurar que los cromosomas no se disocien en cromátidas al inhibir a la proteasa separina (= separasa). La securina es una proteína pequeña (202 aa) codificada por el gen *PTTG1* del cromosoma 5q35 y su función es asociarse a la separina ocultando su centro activo e inhibir su acción. El complejo separina-securina se disocia justamente al final de la metafase, por la acción de un complejo proteínico denominado "complejo promotor de la anafase" (APC, de *anaphase promoting complex*). Este complejo APC está formado por ocho proteínas y un número de subunidades, cuyas funciones son esenciales en la división celular y son altamente conservadas durante la evolución biológica (fig. 12-6). Respecto de la securina, los componentes de la APC la ligan con ubicuitina y es degradada en los proteasomas.

En la meiosis las cohesinas desempeñan un papel importante. Hay dos proteínas que reemplazan a las proteínas de cohesinas mitóticas: en la meiosis la SCM1β reemplaza a la SCM1 y la REC8 reemplaza a la SSC1. La particularidad de la primera división meiótica es que los centrómeros no pierden la cohesina y por consiguiente lo que se separa son cromosomas homólogos enteros. En esta particularidad interviene una proteína que resguarda las cohesinas centroméricas, llamada shugoshina (del japonés, "espíritu guardián")[10] véase fig. 12-4). La acción protectora para cohesina por parte de la shugoshina (sigla. SGO1) desaparece en la segunda división

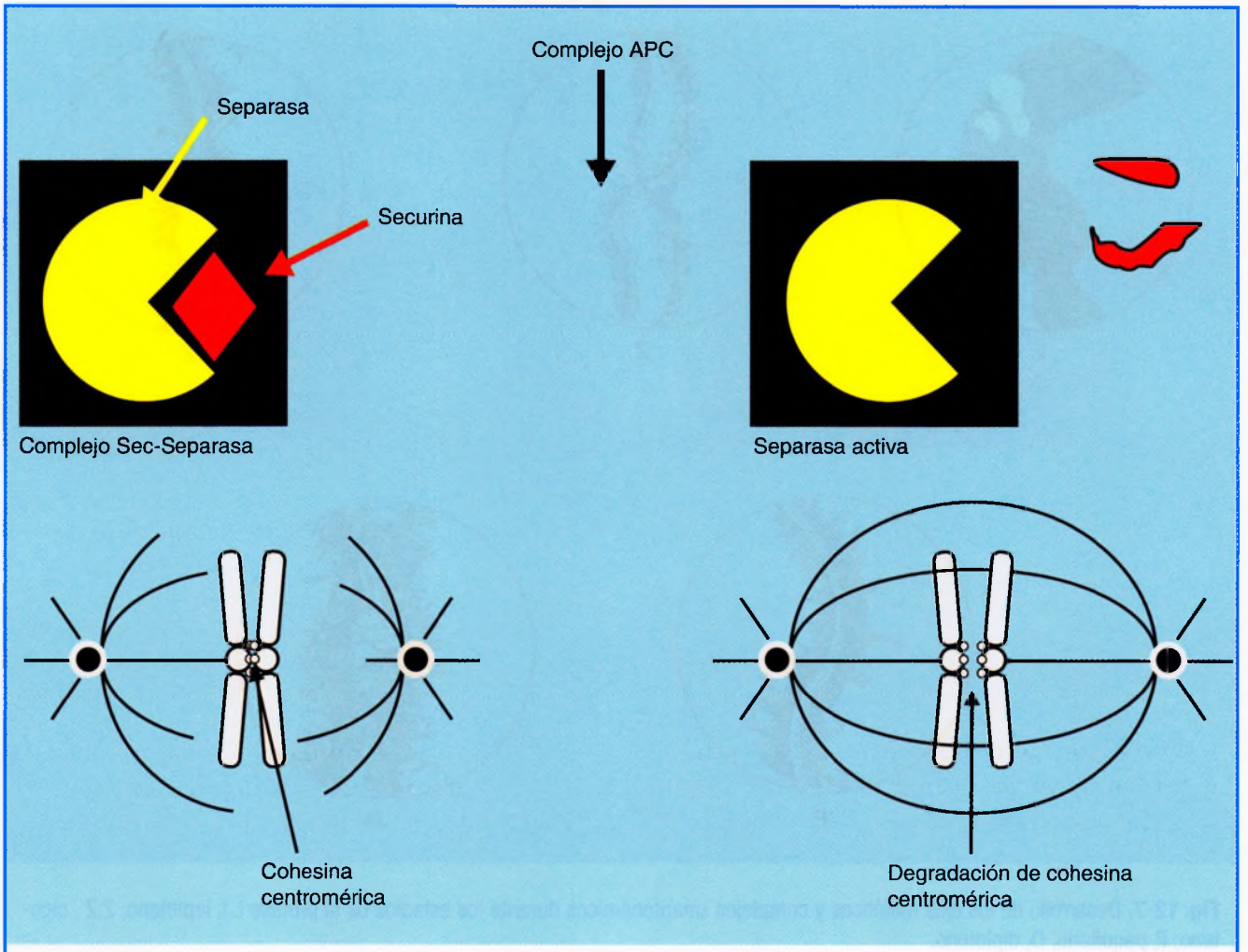


Fig. 12-6. Función del complejo separasa-securina en la división celular. Por acción de las proteínas del APC, la securina es ubicuitinada y degradada, liberando la separasa activa, que degrada la cohesina centromérica.

meiótica, permitiendo la separación de las cromátidas. La shugoshina protege a la REC8 de la degradación por parte de la separasa, lo cual explica que en mutantes de la shugoshina se produzca la separación de cromátidas en la metafase I y una meiosis aberrante.[10]

Por su parte, la proteína REC8, que también es altamente conservada en la evolución, es necesaria para la formación de los ejes de los complejos sinaptonémicos.

Descripción esquemática de las fases de la meiosis

La meiosis consta de dos "divisiones" meióticas, con un único período de síntesis de ADN (período S). Es decir que en la interfase premeiótica se produce la única síntesis de ADN (con características particulares). La segunda división meiótica no está precedida de un período S, sino que la transición entre la división I y la II es muy rápida y similar a un período G_2 aislado. De esta manera, al haber dos divisiones con una sola replicación de ADN, se preanuncia que el contenido de ADN resultante disminuirá a la mitad, como efectivamente sucede en los gametos. Por otra parte, la síntesis premeiótica de ADN tiene ciertas peculiaridades: es muy larga (24 h), debido a que se utilizan menos replicones, y además no es completa, dado que una cantidad aproximada al 0,3% del ADN total queda sin replicarse, y sólo lo hace ya iniciada la meiosis, en el cigoteno, por lo cual se la denomina la "síntesis diferida de ADN cigoténica".[12]

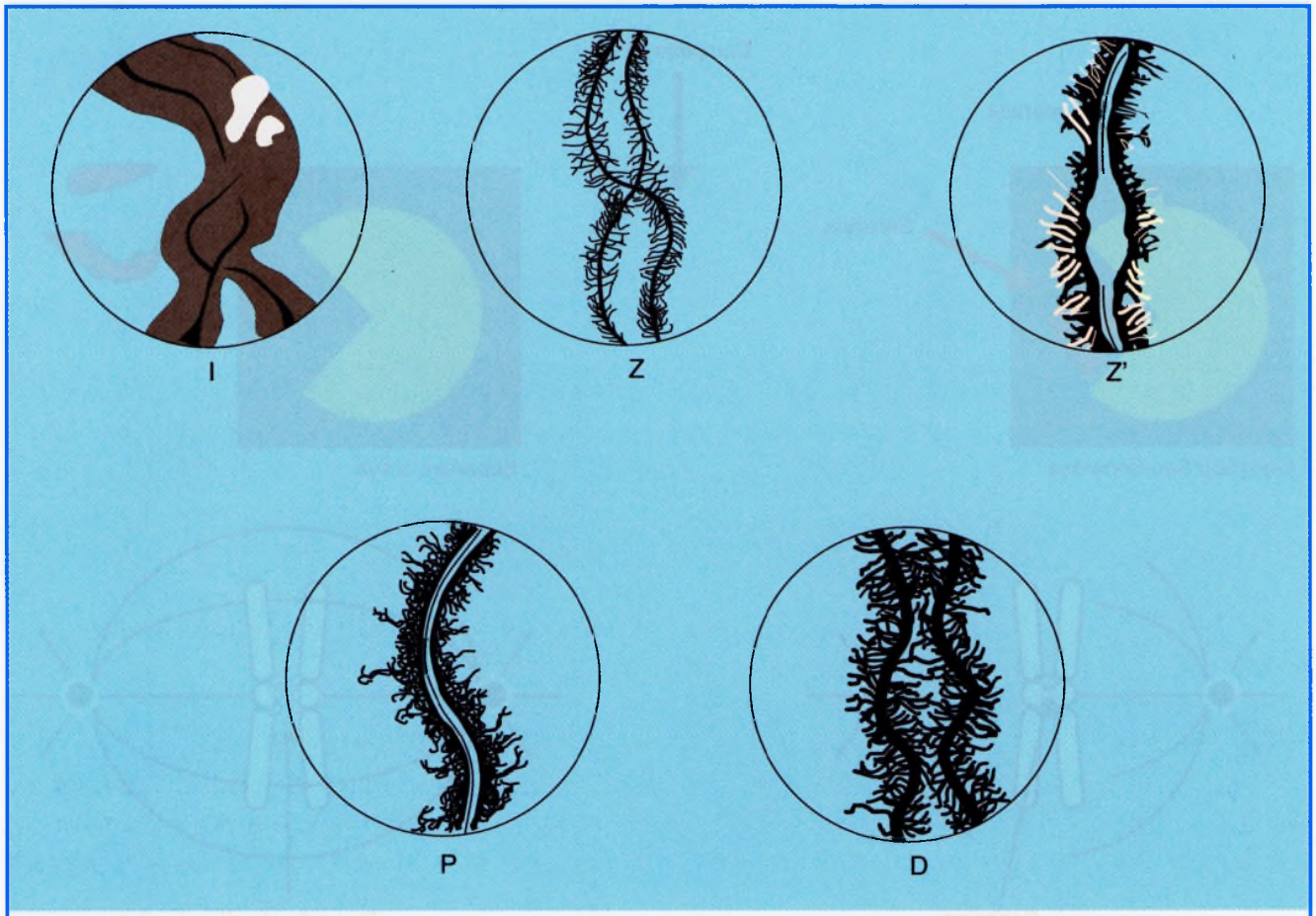


Fig. 12-7 Desarrollo de los ejes meióticos y complejos sinaptonémicos durante los estadios de la profase I. I, leptoteno; Z,Z' cigoteno; P paquiteno; D, diploteno.

Los fenómenos esenciales de la meiosis son tres, cada uno de ellos sumamente complejo: *la sinapsis, la recombinacion y la segregación*, y todos ocurren en la primera división, por lo cual ésta es la más importante. La segunda división es similar a una mitosis común, excepto que no está precedida de una mterfase usual y sólo contiene el conjunto haploide de cromosomas.

La profase de la división I es la etapa más importante y en ella se distinguen los clásicos cinco estadios: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Estos estadios han sido bien caracterizados por la microscopia electrónica, de modo que actualmente su definición se vincula con los cambios de ultraestructura. La sinapsis cromosómica es un fenómeno celular que ocurre única y exclusivamente en la línea de células germinales y sólo durante la meiosis. Consiste en el apareamiento muy estrecho y específico de los dos miembros de cada pareja de cromosomas homólogos, de modo que todas las parejas (salvo los sexuales en el varón) aparecen estrechamente asociadas. Cada una de estas parejas, a partir del diploteno, se denomina bivalente y muestra un total de cuatro cromátidas (dos por cada homólogo) El mecanismo subyacente de esta sinapsis es la construcción de un aparato proteínico, el llamado complejo sinaptonémico (CS), que ejecuta la sinapsis propiamente dicha o final durante el cigoteno, de modo que se establece el conjunto de homólogos totalmente apareado en el paquiteno. A su vez, el complejo se forma a partir de ejes meióticos de los cromosomas que aparecen en el leptoteno. De esta manera, se pueden caracterizar los estadios (fig. 12-7) de una forma definida por el desarrollo del aparato proteínico.

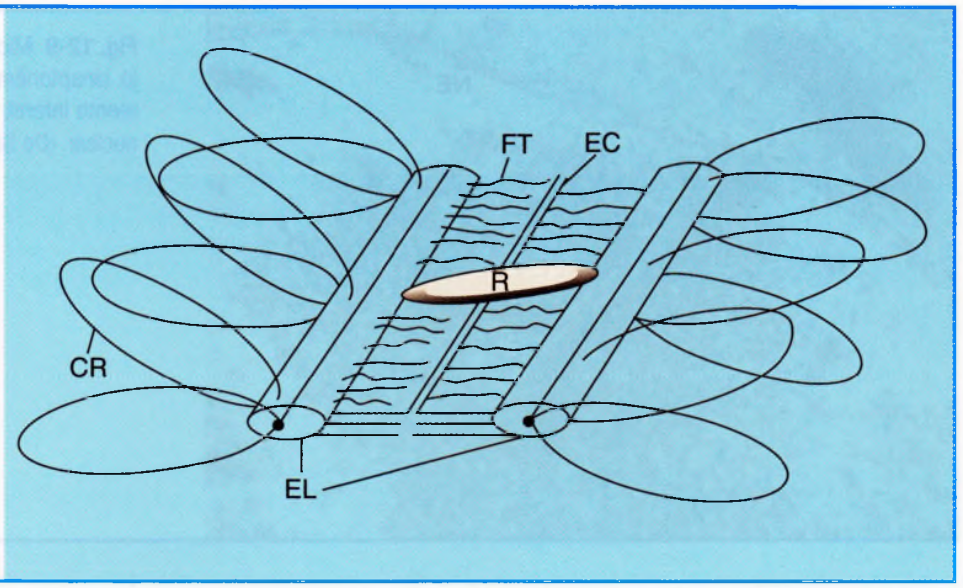


Fig. 12-8. Esquema de la estructura del complejo sinaptonémico. CR: cromatina; EL, EC: elementos laterales y elemento central; FT: filamentos transversales; R: nódulo de recombinación.

En el estadio leptoteno aparecen ejes simples a lo largo de parte o de toda la longitud de un cromosoma. Generalmente estos ejes son finos y discontinuos y pueden estar organizados con uno o dos de sus extremos orientados hacia la misma región de la periferia nuclear, dando un aspecto de ramillete o "bouquet", como se denomina este aspecto de los cromosomas en los períodos de leptoteno y cigoteno. El inicio del cigoteno es marcado por la aparición de segmentos apareados de ejes simples, que constituyen el inicio de un complejo sinaptonémico. Por lo común, estas regiones de iniciación de la sinapsis están en los extremos y asociadas con la carioteca. El cigoteno dura hasta que se completa el apareamiento (sinapsis) de los ejes simples, con lo cual se inicia el paquiteno. Éste es un estadio largo e importante, en el cual se completa el intercambio genético (entrecruzamiento – *crossing-over*) y está caracterizado por la permanencia del CS durante toda la duración del período. En el diploteno los complejos se disocian, el espacio central se agranda y sus componentes desaparecen excepto en las regiones donde hubo quiasmas), y los elementos laterales continúan presentes, aunque son finos y se van separando uno del otro. En el diploteno avanzado los ejes se hacen discontinuos y se van borrando de tal manera que sólo quedan remanentes axiales en las regiones centroméricas y en las quiasmáticas.

Estructura fina de los complejos sinaptonémicos

El complejo sinaptonémico (CS) tiene una estructura general muy conservada a lo largo de la evolución, con pocas variantes. El ancho del complejo es de 2.100Å (210 nm), con dos *elementos laterales* (EL=LE) de aproximadamente 60 nm de ancho y un espacio central de alrededor de 100 nm (fig. 12-8) [13,14]

Los elementos laterales (LE) están constituidos por un material amorfo que se tiñe con sales de plata y el ácido fosfotúngstico, características que dependen de su contenido de proteínas básicas.[15] El principal componente de estos LE es la proteína SYCP3 (véase la próxima sección) Los elementos laterales están localizados exactamente en el espacio donde las dos cromátidas de un cromosoma se asocian, antes de abrirse en amplios lazos de cromatina que se encuentran dispuestos como un halo alrededor de los elementos laterales. Por consiguiente los LE ocupan un espacio donde se encuentra también la cohesina. Aunque los LE están esencialmente formados por proteínas, hay ADN en la base de los lazos de cromatina (figs. 12-8 y 12-9)

La región central del CS está constituida por elementos fibrilares de muy pequeño diámetro (1,6-2 nm),[16,17] los *filamentos transversales*, formados por la proteína SYCP1=Syn1 (véase después) Estos filamentos son rectos e insensibles a la DNasa, pero digeribles por la tripsina, atravie-

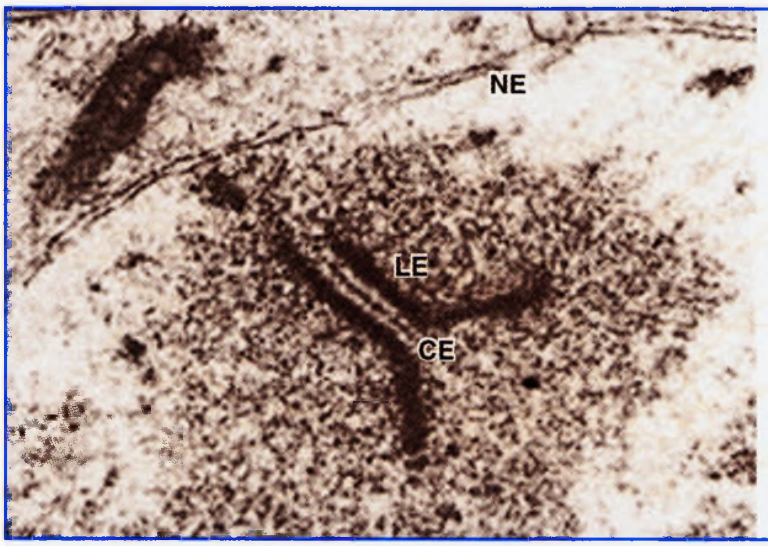


Fig. 12-9. Micrografía electrónica de un complejo sinaptonémico en un corte ultrafino. LE: elemento lateral; CE: elemeno central; NE: envoltura nuclear. (De Solari AJ, 2004.[14])

san el espacio entre el elemento lateral y el central, y por lo menos algunos de ellos se superponen con otros filamentos que provienen del otro elemento lateral. En el medio del espacio central estas fibrillas se asocian con otro material, de tipo globular, y con filamentos del mismo diámetro pero dispuestos longitudinalmente que son los que componen el elemento central), este último contiene al menos dos proteínas, la SYCE1 y la SESC1, que interactúan con la SYCP1 [18] Los filamentos transversales son las unidades más pequeñas, pero se agrupan en haces de tres o más filamentos colocados a la misma altura del elemento lateral. En cortes longitudmales, los filamentos transversales aparecen dispuestos en hileras, frecuentemente seis, dispuestas entre los elementos laterales. En síntesis, los filamentos transversales son el componente estructural más definido del espacio central y tienen características de proteínas arrolladas en espiral (*coiled-coil*) capaces de interactuar lateralmente para constituir haces, como en el caso de los filamentos intermedios.

Síntesis de los componentes del complejo sinaptonémico: proteína Syn1 (SYCP1)

A partir de 1990 se han descodificado, a partir de genotecas de ADNc, la proteína SYCP3 (– Cor1), componente de los elementos laterales, y la SYCP1 (– Syn1), componente del espacio central (esta última representa los filamentos transversales del complejo sinaptonémico) [19,20]

La proteína Syn1 – SYCP1 está conformada por 946 aminoácidos (aa), con un peso molecular de 111 kDa, y presenta similaridad con las (proteínas) láminas nucleares, por un lado, y con la parte fibrilar helicoidal de la miosina, por otro. Esta proteína presenta tres dominios: uno grande (700 aa) y central, que tiene estructura posible de α-hélice y es probablemente una espiral enrollada, uno aminoterminal de 52 aa que es de tipo acídico y con prolinas, y uno carboxiterminal, con características de afinidad por ADN y subdominios básicos (fig. 12-10)

La proteína Syn1 en su dominio central presenta cierta homología con el dominio S2 de la cadena pesada de la miosina (16,5% de homología) y con queratinas, láminas, distrofina y tropomiosina; es decir que es capaz de formar asociaciones diméricas de dos α-hélices, las cuales se asocian por interacción hidrofóbica y tienen un patrón de repetición de siete aminoácidos (héptada), con el N° 1 y el N° 4 hidrofóbicos. Se calcula que este dominio central, filamentoso, tiene una longitud de 100 nm.

El extremo carboxilo presenta el "motivo" S/T P-X X (serina/treonina prolma X X) que es típico de proteínas ligantes al ADN, además posee regiones pronunciadamente básicas. En cambio, el dominio inicial aminoterminal) es más bien de predominio acídico. El gen de Syn1 se transcribe como un ARN de 4,4 kb exclusiva-

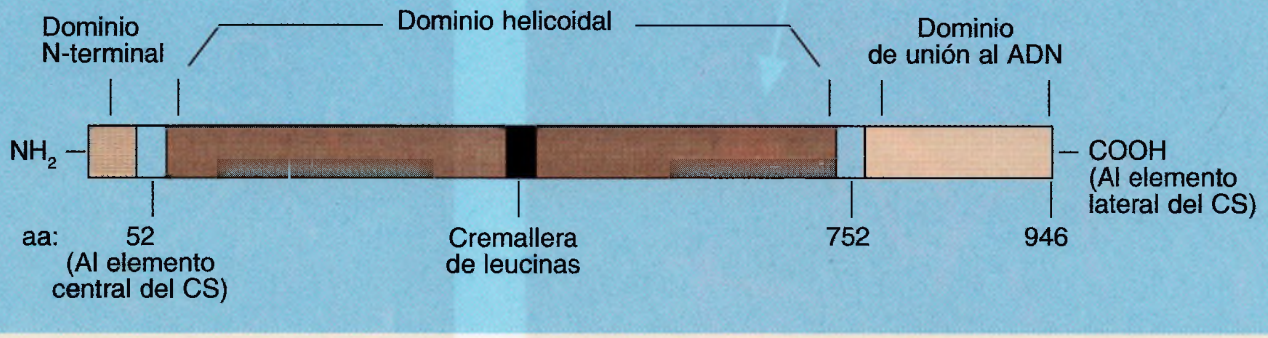


Fig. 12-10. Esquema de la proteína SYCP1 = Syn1

mente en el testículo en los varones y sólo duran te los estadios cigoteno a diploteno,[19] sin que se acumule ARNm. Esto muestra que los componentes del CS no aparecen por una redistribu ción de elementos preexistentes en la estructura nuclear (como la matriz nuclear), sino que son sintetizados específicamente durante la meiosis, y la cromatina se reorganiza sobre estos nuevos constituyentes, adoptando una forma espacial nueva.

La proteína Syn1 se localiza por pruebas inmunohistoquímicas en el espacio central de los CS; en cigoteno da una línea discontinua sobre los bivalentes parcialmente sinapsados; en diploteno también hay líneas discontinuas, mientras que en paquiteno toda la longitud de los bivalen tes contiene Syn1 Además hay evidencia de que la Syn1 se coloca con su extremo carboxilo diri gido hacia los elementos laterales, de modo que este extremo con afinidad por ADN puede interactuar con la cromatina, mientras el extremo aminoterminal se orienta hacia el centro del CS.

Proteína SYCP3 = Cor1 y elementos laterales del complejo

La segunda proteína del CS es la Cor1(SYCP3), localizada en los elementos laterales.[20] Es una proteína compuesta de 234 aminoácidos y aproximadamente 30 kDa, rica en glutamina 12%) especialmente en el extremo carboxilo, con 34% de aa hidrofóbicos y un predominio básico (18/15 Esta proteína es similar a pM1, miembro de una familia de proteínas reguladas por linfocitos y cuyo gen está ligado al cromosoma X. También Cor1 tiene parecido con las proteínas de filamentos intermedios y presenta regiones con repeticiones de tipo héptadas, de modo que podría adoptar la forma espiralada y dimérica de este tipo de filamentos. Cor1 no es el único componente estructural de los elementos laterales; otra proteína, SYCP2, de 190 kDa, tam bién es un constituyente de estas estructuras, además de las proteínas "funcionales", con actividad propia, como la topoisomerasa II, la Rad51 y las "cohesinas" meióticas.

La localización inmunohistoquímica de la Cor1 se encuentra sobre los ejes cromosómicos, desde los ejes simples del leptoteno, pasando por los elementos laterales durante el paquiteno, los ejes diploténicos y, finalmente, el material axial remanente posdiploténico y el filamento visible en la región centromérica en la metafase I.[20]

La identificación de las principales proteínas del CS permitió la producción de anticuerpos específicos para ellas. De esa manera en la actualidad se estudia la meiosis mediante reacciones inmunoquímicas con el microscopio de luz. La meiosis humana en los espermatocitos (que es la más accesible por biopsia testicular) ha mostrado importantes resultados (fig. 12-11)

Conducta del par XY en la meiosis humana

El par de cromosomas X e Y forma un cuerpo especialmente condensado durante la profase meiótica, que fue confundido con un nucléo-

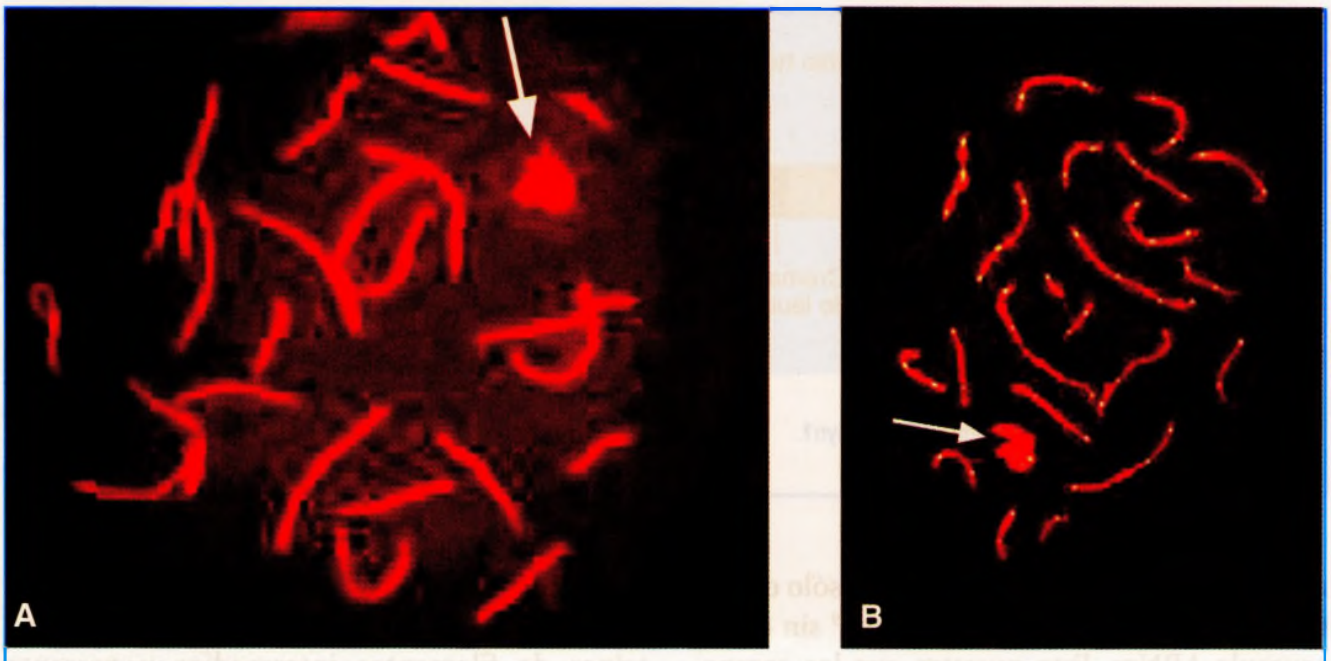


Fig. 12-11 **A.** Micrografía de un espermatocito humano normal marcado con el anticuerpo contra SYCP3 que muestra los CS autosómicos y el par XY condensado (flecha blanca). **B.** Espermatocito humano normal marcado con los anticuerpos contra SYCP3 (complejos sinaptonémicos) y contra la proteína MLH1 (focos de recombinación). El cuerpo XY (flecha blanca) presenta un único foco de MLH1 (De Sciurano RB y Solari AJ, 2008.)

lo y finalmente identificado en la Argentina como el par XY con sinapsis parcial.[21-23] Las regiones diferenciales del cromosoma X y del Y muestran gruesos ejes diferenciados, cuya morfología va cambiando y permite una subdivisión del largo estadio paquiteno, que es de uso general en estudios de meiosis humana.[24] En esos ejes diferenciados puede encontrarse una proteína, denominada XY40 y otra proteína (Xmr) de 25 kDa, que pertenece al grupo de proteínas cuyos genes están ligados al cromosoma X y son regulados en los linfocitos.[25] Posteriormente se detectaron en el cuerpo XY otras proteínas, algunas de las cuales tienen un relevante sentido funcional, como la γH2AX y la BRCA1 (véase más adelante), pero otras proteínas parecen acumularse en este cuerpo XY de una manera pasiva, dada la inactividad transcripcional de este cuerpo de cromatina condensada.[23] Esta ausencia de transcripción en el cuerpo XY es un fenómeno diferente y más antiguo (en el curso de la evolución biológica) que la lionización del segundo cromosoma X, pero este cuerpo está limitado a los mamíferos. En una serie de experimentos en ratones se pudo comprobar que la proteína de reparación del ADN, BRCA1 (véase cap. 8) se encuentra alojada específicamente en el cuerpo XY sobre los ejes diferenciales engrosados, y recluta, por un mecanismo de afinidad aún no aclarado, a la quinasa ATR, capaz de fosforilar ciertas proteínas. Mediante la quinasa ATR se lograría una masiva acumulación de γH2AX en este cuerpo, y esa acumulacion de γH2AX señala su inhibición transcripcional (también denominada con la sigla MSCI, de meiotic sex chromosome inactivation) [26] Esta proteína γH2AX es un notable marcador citológico, porque señala los lugares donde se han producido fracturas de ADN A este respecto debe señalarse que la γH2AX no rotula la fractura en sí misma sino la remodelación de la cromatina adyacente a la fractura (alrededor de varias megabases), y que es inactiva para la transcripción. La marcación se produce muy rápidamente (minutos) luego de una fractura y permanece hasta que ésta sea reparada. En el cuerpo XY esta variedad fosforilada en la serina 139 de la H2AX (γH2AX) es marcadora de un empaquetamiento especial de la cromatina en el cuerpo XY.

En la formación del cuerpo XY hay entonces varios procesos involucrados: por un lado, los cromosomas X e Y se sinapsan solamente por una pequeña región, que comprende la región seudoautosómica (RPA, véase cap. 10), de modo que la mayor parte de ambos cromosomas queda en estado "asináptico"[21-23] En segundo lugar, las regiones axiales asinápticas del X y del Y acumulan la proteína BRCA1; esta proteína recluta la quinasa ATR, que fosforila la histona H2AX convirtiéndola en la γH2AX, y toda esta región forma un subdominio intranuclear donde no hay transcripción y la cromatina se ordena de una manera especial, condensada y muy regular.

El cuerpo XY es un indicador sensible de la existencia de anormalidades meióticas; esto ha llevado recientemente a subrayar su utilidad en el diagnóstico de esterilidad de causa genética.[27]

Cariotipos de complejos sinaptonémicos. Citogenética ultraestructurol

Dado que un complejo sinaptonémico está asociado con cada par de cromosomas homólogos durante el paquiteno (como fue demostrado por Wettstein y Sotelo)[28] y que las longitudes de los ejes (o de los elementos laterales) están relacionadas con las longitudes de los cromosomas meióticos,[24] cabe la posibilidad de realizar *cariotipos de complejos sinaptonémicos*. En el varón esto es realizable por una pequeña biopsia testicular y microextendidos de espermatocitos.[24] El ordenamiento en el cariotipo se realiza por las longitudes relativas de los complejos respecto de la suma del total de las longitudes y por la posición de los cinetocoros, que son visibles como densidades ovaladas colocadas en los elementos laterales (fig. 12-12)

La relación entre las longitudes relativas de los complejos y las de los cromosomas mitóticos es de 1 a 1, aunque las longitudes absolutas de los complejos son siempre mayores que las de los cromosomas respectivos (p. ej., el complejo N° 1 mide en promedio 23,9 micrometros, mientras el cromosoma mitótico 1 no pasa generalmente de 12 micrometros de longitud), lo cual refleja la mayor descondensación de los cromosomas durante la profase meiótica. La concordancia entre los cariotipos de complejos y los usuales es muy grande, excepto para las zonas de heterocromatina y las zonas ricas en bandas G (véase cap. 17), que están algo subrepresentadas en los complejos.

La longitud del complemento de complejos es típica de la especie; en el varón mide 258 µm (en la mujer es significativamente mayor), aunque varía durante los subestadios del paquiteno y logra su mínimo durante el paquiteno medio.

El uso de esta técnica está limitado por la necesidad de una biopsia (en la mujer, por ser el paquiteno propio de la época fetal, no es factible sino en necropsia) La utilidad mayor de esta clase de cariotipos estriba en la detección de anomalías estructurales de los cromosomas y en la detección de anomalías de los procesos de la meiosis; son particularmente útiles para investigar causas de infertilidad en varones. La detección de anomalías estructurales (que puede hacerse además por otros métodos, tales como bandeado G y por FISH [véase cap. 17]) se basa en que, durante la sinapsis, las regiones deleccionadas o duplicadas forman lazos en uno de los elementos laterales, y en las translocaciones se forman asociaciones de más de dos elementos laterales. Actualmente para estos estudios se usa sobre todo la inmunofluorescencia con anticuerpos contra las proteínas meióticas.

Las anomalías meióticas detectables son variadas: fallas de la sinapsis, fallas en los ejes, alteraciones en la localización y estructura de los nódulos de recombinación y fallas en la condensación cromosómica.

Quiasmas. Conducta de los ejes durante el diploteno

Durante el paquiteno ocurren los fenómenos de recombinación génica meiótica (véase más adelante), que se manifiestan morfológicamente por los "nódulos de recombinación tardíos" y en el aspecto molecular por la aparición de focos de la proteína MLH1 y por cambios en las moléculas de ADN Estos fenómenos de *recombinación recíproca* se visualizan con el microscopio de luz durante el diploteno y en

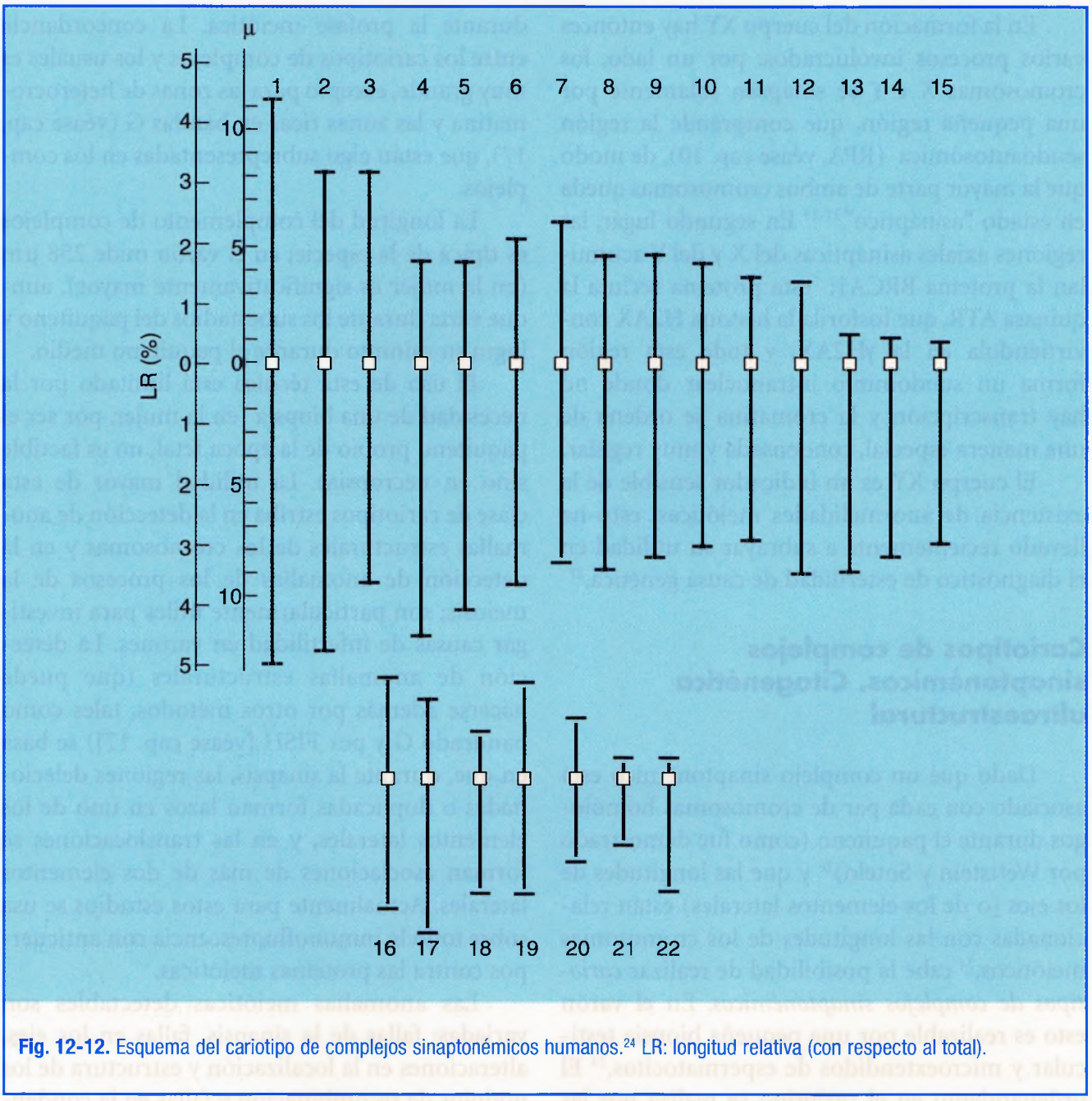


Fig. 12-12. Esquema del cariotipo de complejos sinaptonémicos humanos.[24] LR: longitud relativa (con respecto al total).

estadios posteriores, hasta la metafase I, bajo la forma de "quiasmas" (cruces) Los quiasmas son formas especiales que adoptan los pares de cromosomas homólogos y que delatan la existencia de un fenómeno previo de recombinación a nivel del ADN de dos de las cromátidas (homólogas) de esta pareja cromosómica. Cada quiasma aparece en el diploteno como un entrecruzamiento de dos cromátidas, cada una de las cuales proviene de un cromosoma homólogo, mientras las otras dos cromátidas no intervienen en el proceso (fig. 12-13)

Todo par cromosómico humano presenta al menos un quiasma (incluido el par XY), la presencia de un quiasma (como mínimo) es un requisito para que los cromosomas homólogos puedan segregar (ir a polos diferentes) en forma regular durante la anafase I. Los quiasmas visibles al principio del diploteno cambian de forma durante el avance de este período y hasta la metafase I. La rotación de los quiasmas es una consecuencia de la progresiva separación de los dos cromosomas homólogos que formaban el bivalente en el paquiteno. Cuando se observan los bivalen-

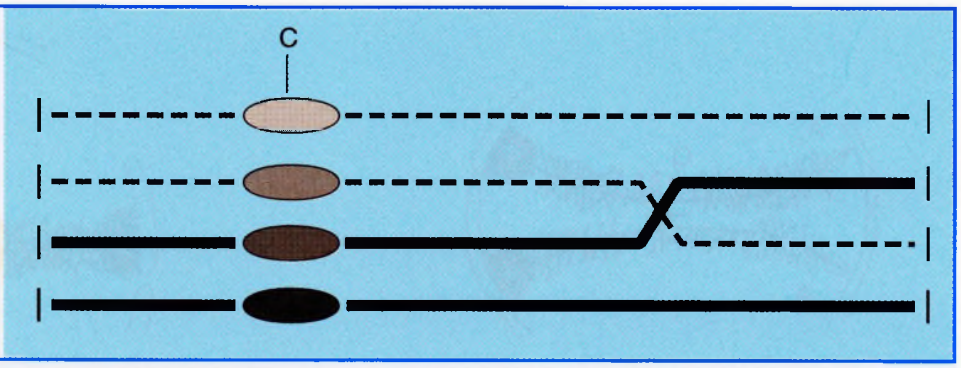


Fig. 12-13. Esquema de un bivalente compuesto por cuatro cromátidas (dos por cada homólogo), con sus cuatro cinetocoros (C) y un único quiasma intersticial en el brazo largo (cruce).

tes del diploteno con microscopia electrónica (o inmunofluorescencia), se ve que los complejos sinaptonémicos se abren, ya que los elementos laterales aparecen separados, excepto en unas pocas regiones que fueron denominadas "regiones de convergencia de los ejes"[29] y que representan los quiasmas. En esas regiones, los ejes permanecen por un tiempo con una apariencia similar a un segmento de CS (fase 1 del quiasma), pero luego el espacio central pierde su estructura original y es invadido por fibras de cromatina (fase 2 del quiasma, puente de cromatina) [29] Esta evolución de los quiasmas es muy visible en espermatocitos de roedores y de otros mamíferos, aunque en el hombre es poco perceptible.

La ultraestructura de los quiasmas reveló que los ejes meióticos (o elementos laterales del CS) no se cruzan, mientras que las dos cromátidas homólogas que intervienen en el quiasma sí lo hacen.[29] Este hecho revela que los ejes proteínicos no pueden ser centrales a una o a las dos cromátidas hermanas, sino que estos ejes están ubicados *en la interfase entre ambas cromátidas hermanas* en cada homólogo y son compartidos por cada par de dichas cromátidas, lo cual coincide con los datos posteriores acerca de la localización de las cohesinas fig. 12-14)

La estructura de los bivalentes, deducida de las observaciones de la microscopia electrónica, se asemeja a la estructura de los cromosomas "plumulados", que con la microscopia de luz se ve en los bivalentes del diploteno avanzado en los ovocitos de muchos vertebrados. En realidad, se considera que la estructura "plumulada" es característica de todos los meiocitos en diploteno y que tiene su origen en la disposición de la cromatina (en lazos que parten de los ejes) en el paquiteno.

El número promedio de quiasmas en los espermatocitos humanos de personas normales oscila entre 45 y 51;[30] su localización a lo largo de un bivalente no es totalmente al azar, ya que hay preferencia por las zonas terminales y escasez en las centroméricas. Las observaciones de quiasmas humanos han sido confirmadas por el recuento de focos de MLH1, que representan sitios de recombinación.[31]

Formación del complejo sinaptanémico y el papel de las cohesinas (REC8P)

Si bien el complejo sinaptonémico es la estructura típica de la profase meiótica en los eucariontes, este complejo proteínico no es el eje básico de los cromosomas, puesto que no aparece en los cromosomas mitóticos o en cualquier fase de la mitosis, sino que es una estructura específica de células germinales en meiosis. Actualmente se sabe que las proteínas SCM intervienen en la estructura cromosómica. Estas proteínas tienen forma de pinza de dos brazos, tienen capacidad de ATPasa y de asociarse por un lado al ADN y por otro a otras proteínas.[32] En la meiosis se le agrega un componente especial, la proteína REC8, presente desde los hongos hasta la especie humana, que forma parte esencial del complejo de cohesinas meióticas.[33] Precisamente esta proteína REC8 se hace presente bajo la forma de hileras de "focos" (acúmulos puntuales visibles por inmunofluorescencia) desde el leptotene,[33] y a partir de esos "focos" se va *reclutando* la proteína principal de los elementos laterales del CS, es decir la SYCP3 = Cor1 Este hecho es observado en la meiosis del ratón y demás mamíferos, cuando se "noquea" o

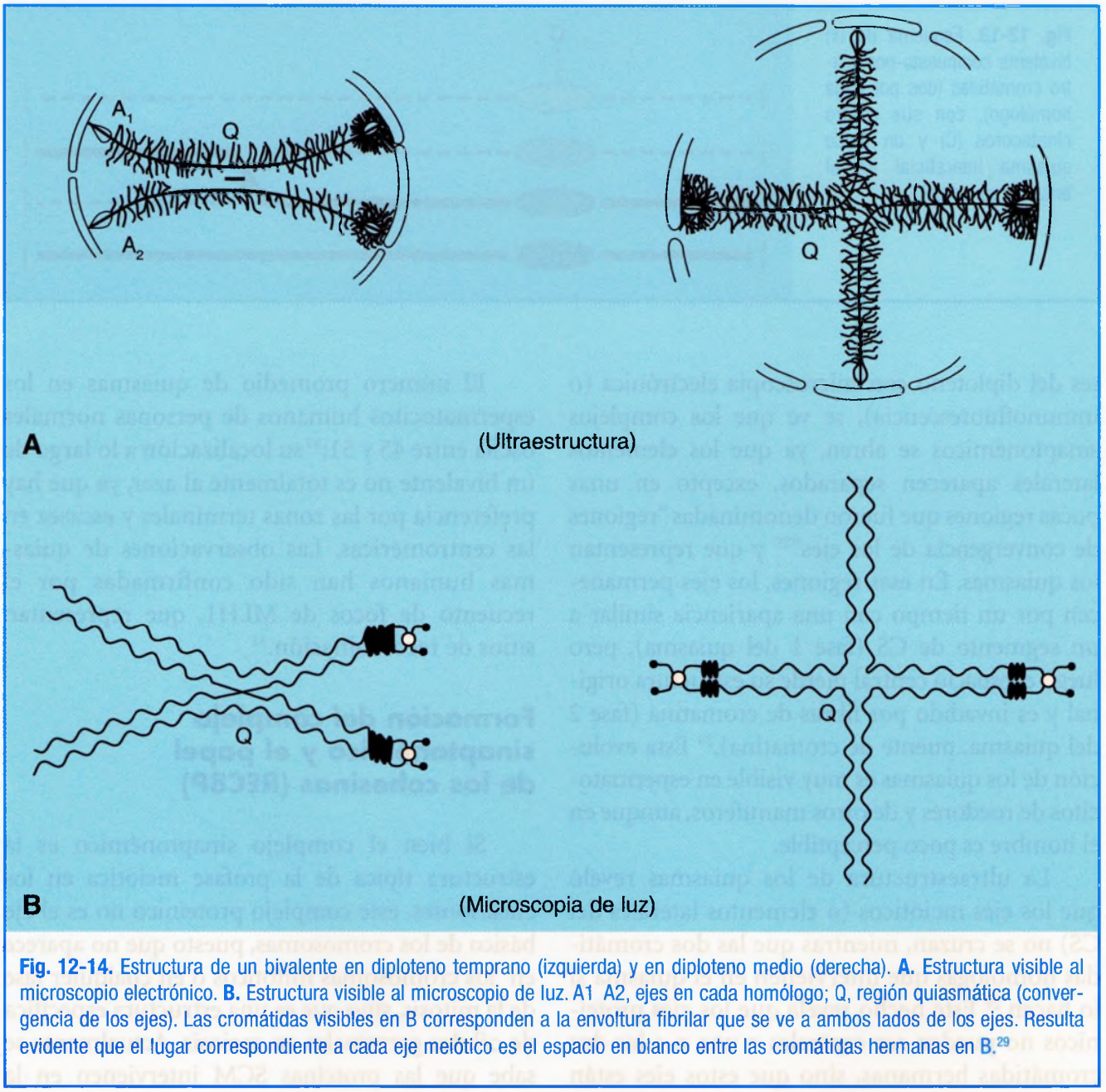


Fig. 12-14. Estructura de un bivalente en diploteno temprano (izquierda) y en diploteno medio (derecha). **A.** Estructura visible al microscopio electrónico. **B.** Estructura visible al microscopio de luz. A1 A2, ejes en cada homólogo; Q, región quiasmática (convergencia de los ejes). Las cromátidas visibles en B corresponden a la envoltura fibrilar que se ve a ambos lados de los ejes. Resulta evidente que el lugar correspondiente a cada eje meiótico es el espacio en blanco entre las cromátidas hermanas en B.[29]

anula parcialmente el gen de la proteína SYCP3. El hecho de que en todos los cromosomas, mitóticos o meióticos tengan un "armazón" de cohesinas, pero que en la meiosis se le adicione una proteína especial (REC8) asociada en el complejo cohesina, unifica el panorama de la estructura cromosómica en general. En la meiosis, la REC8 (y demás componentes del complejo cohesina) reconocen y recolectan la proteína Cor1 para formar los "ejes" (o elementos laterales, LE, del CS) tan visibles en microscopia electrónica (fig. 12-15)

Posteriormente, se van asociando la proteína Syn1 = SCP1 de los filamentos transversales y otras proteínas que intervienen en la profase meiótica. En ciertos organismos inferiores, la proteína REC8 no está presente, o no está en ciertos cromosomas: en estos casos excepcionales, no se forman complejos sinaptonémicos, o si se trata de un par cromosómico especial, no se forman ejes meióticos y el par revierte a una conducta de tipo mitótico.[11]

Recombinación meiótica

La recombinación meiótica consiste en un proceso de ruptura de dos moléculas de ADN homólogas, seguido de un intercambio de fragmentos entre ellas y una reconstitución de dos moléculas que contienen partes intercambiadas.

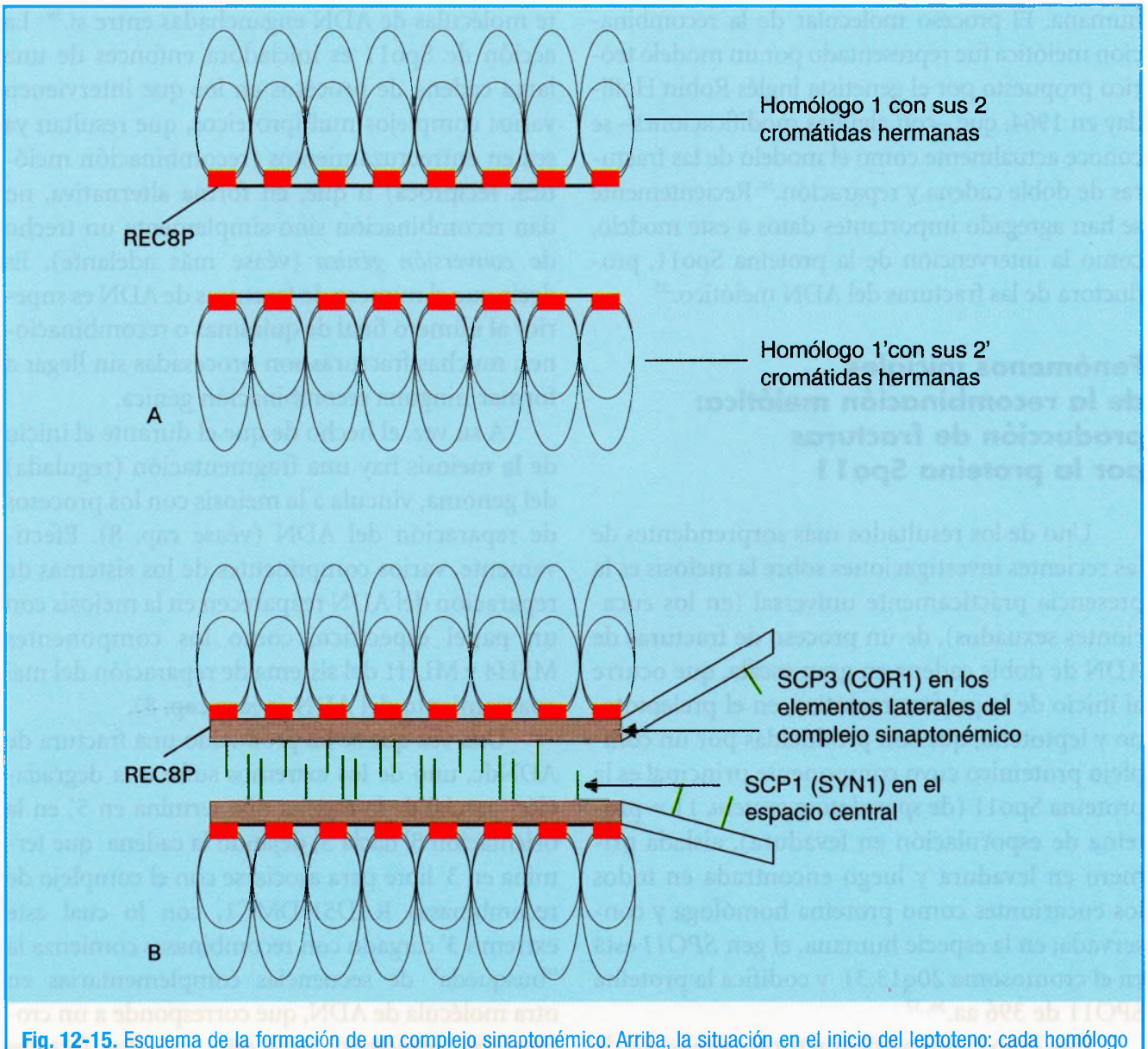


Fig. 12-15. Esquema de la formación de un complejo sinaptonémico. Arriba, la situación en el inicio del leptoteno: cada homólogo presenta sus dos cromátidas hermanas asociadas por el complejo cohesina-REC8P en la región axial (central) pero aún no están formados los ejes meióticos. Abajo: en el cigoteno, la REC8P ha recolectado la proteína SCP3 = Cor1 y se han formado los elementos laterales del complejo. En el espacio central aparece la proteína SCP1 = Syn1 formando los filamentos transversales. Las cromátidas hermanas (elipses) se unen en la región axial.

La recombinación meiótica, por consiguiente, tiene una gran similitud con el proceso artificial de producción de ADN mestizos mediante el uso de las enzimas de restricción (véase cap. 3) Además, tiene un gran valor para la especie desde el punto de vista de la selección natural, puesto que es la principal fuente de variación genética; en cada generación este proceso de recombinación reordena todo el genoma en las células germinales, introduciendo nuevas combinaciones génicas a partir de las moléculas de ADN paterna y materna. Estos reordenamientos se realizan de manera independiente en cada meiocito (espermatocito u ovocito), de modo que cada gameto producido llevará combinaciones diferentes de genes, lo cual determina la mayor parte de las diferencias genéticas entre hermanos.

Los estudios moleculares de la recombinación meiótica son difíciles, por ser un proceso que ocurre en células especializadas y poco aptas para ser cultivadas in vitro. Sin embargo, de estos estudios ha resultado el concepto de que las bases moleculares de la recombinación tienen similitudes en todos los organismos eucariontes, incluida la especie

humana. El proceso molecular de la recombinación meiótica fue representado por un modelo teórico propuesto por el genetista inglés Robin Holliday en 1964, que –con algunas modificaciones– se conoce actualmente como el modelo de las fracturas de doble cadena y reparación.[34] Recientemente se han agregado importantes datos a este modelo, como la intervención de la proteína Spo11, productora de las fracturas del ADN meiótico.[35]

Fenómenos iniciales de la recombinación meiótica: producción de fracturas par la proteína Spo11

Uno de los resultados más sorprendentes de las recientes investigaciones sobre la meiosis es la presencia prácticamente universal (en los eucariontes sexuados), de un proceso de fracturas de ADN de doble cadena en gran escala, que ocurre al inicio de la profase meiótica, en el preleptoteno y leptoteno, que son producidas por un complejo proteínico cuyo componente principal es la proteína Spo11 (de *sporulating protein*, 11 proteína de esporulación en levadura), aislada primero en levadura y luego encontrada en todos los eucariontes como proteína homóloga y conservada, en la especie humana, el gen *SPO11* está en el cromosoma 20q13.31 y codifica la proteína SPO11 de 396 aa.[36, 37]

Esta gran cantidad de fracturas (alrededor de 300 por núcleo[38]) del ADN genómico son inesperadas, porque en cierta medida parecerían conducir a un suicidio o a una apoptosis de las células germinales; pero lo que ocurre es un gran número de fracturas en un entorno muy regulado, en el cual las fracturas están acompañadas de un andamiaje proteínico, que no las conduce a la muerte celular sino a la recombinación meiótica. En realidad, las fracturas del ADN se hacen en un complejo proteínico en el que intervienen por lo menos nueve productos génicos, de modo que no son homologables a la simple acción enzimática de una endonucleasa. En su origen evolutivo también se observa que esta acción está muy regulada, puesto que la Spo11 parece haberse originado de la subunidad A de una topoisomerasa tipo VI de arqueobacterias, que genera *rupturas transitorias* de ADN para desenredar rápida y eficazmente moléculas de ADN enganchadas entre sí.[39] La acción de Spo11 es iniciadora entonces de una larga cadena de procesos en los que intervienen varios complejos multiproteicos, que resultan ya sea en entrecruzamientos (recombinación meiótica, recíproca) o que, en forma alternativa, no dan recombinación sino simplemente un trecho de *conversión génica* (véase más adelante) Es decir que el número de fracturas de ADN es superior al número final de quiasmas o recombinaciones; muchas fracturas son procesadas sin llegar a formar ninguna recombinación génica.

A su vez, el hecho de que el durante el inicio de la meiosis hay una fragmentación (regulada) del genoma, vincula a la meiosis con los procesos de reparación del ADN (véase cap. 8) Efectivamente, varios componentes de los sistemas de reparación del ADN reaparecen en la meiosis con un papel específico, como los componentes MSH4 y MLH1 del sistema de reparación del mal apareamiento del ADN (véase cap. 8)

Una vez que se ha producido una fractura de ADNdc, uno de los extremos sufre una degradación parcial de la cadena que termina en 5', en la orientación 5' hacia 3', dejando la cadena que termina en 3' libre para asociarse con el complejo de recombinasas RAD51 DMC1, con lo cual este extremo 3' cargado con recombinasas comienza la "búsqueda" de secuencias complementarias en otra molécula de ADN, que corresponde a un cromosoma homólogo. Para esto, hay dos factores importantes: primero, la presencia del complejo cohesina-REC8P parece ser inhibitoria de que el extremo invasor 3' se dirija al ADN de la *cromátida hermana*, dejando sólo la posibilidad de invadir el ADN del cromosoma homólogo, y en segundo lugar, el extremo invasor 3' cargado con RAD51 (recombinasa homóloga de RecA de los procariontes, y que interviene también en células somáticas, como se vio en el capítulo 8) y con la proteína DMC1 (de *d*isrupted *m*eiotic *c*DNA – mutante de ADNc meiótico desorganizado) que es específica de la meiosis, puede invadir ADN de doble cadena normal, sin rupturas, por deplazamiento de una de las cadenas del ADN invadido. De esta manera, las fracturas de ADN en un homólogo, generan un extremo 3' invasor que "explora" el ADN del cromosoma homólogo buscando secuencias complementarias (fig. 12-16).[40]

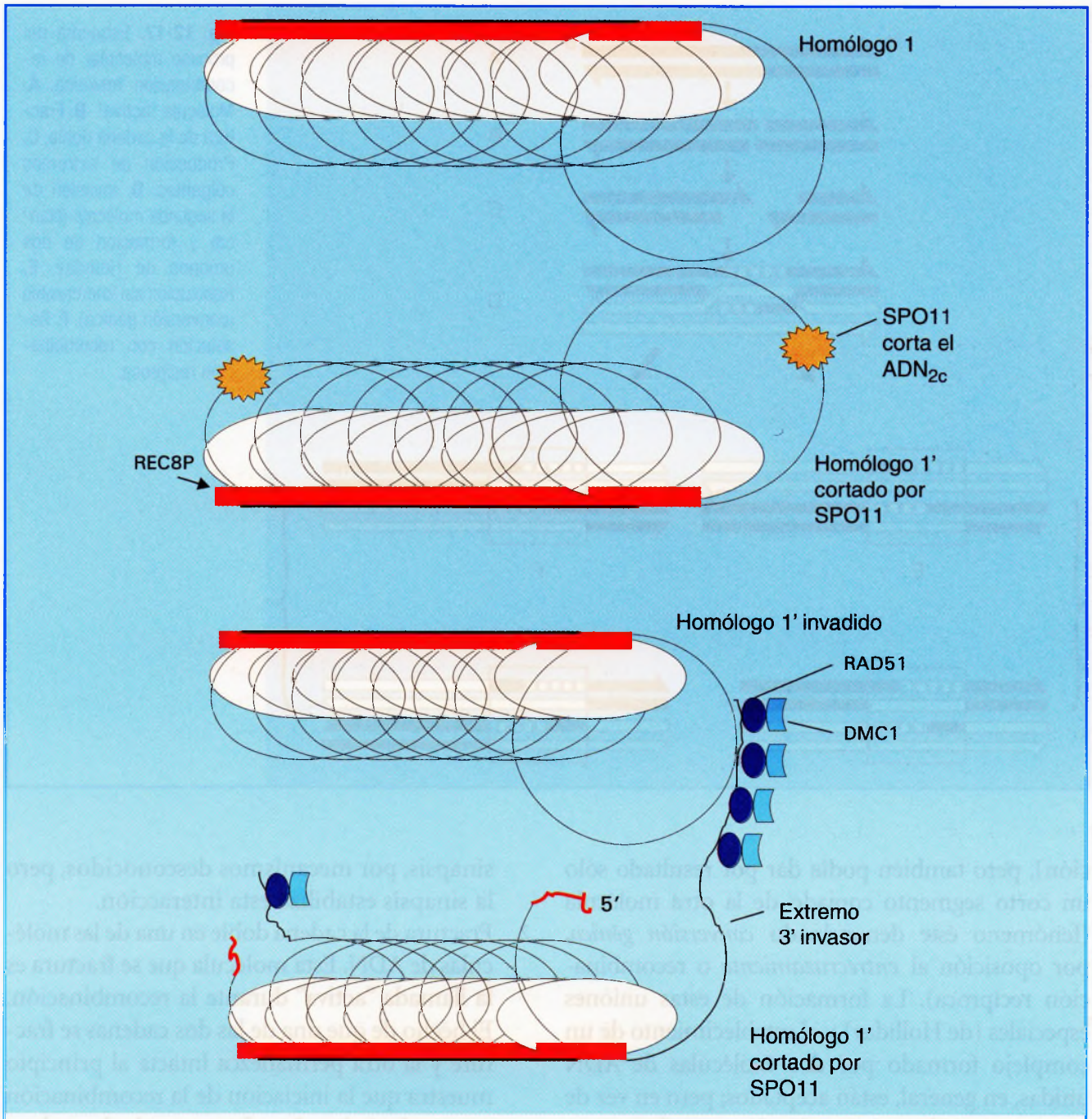


Fig. 12-16. Esquema de las etapas iniciales de la recombinación meiótica. Arriba, la situación en el preleptoteno y el inicio del leptoteno: los homólogos aún no están sinapsados. Se producen las rupturas de ADNdc por parte del complejo proteínico con Spo11 Abajo: una etapa inmediatamente siguiente a la ruptura del ADN, con la formación de "extremos 3' invasores" acoplados con las recombinasas Rad51-DMC1 que empiezan la "búsqueda" de ADN con secuencias complementarias, en el ADN del otro cromosoma homólogo. Se puede observar que estos extremos invasores 3' no pueden dirigirse al ADN de la cromátida hermana (elipses chatas), posiblemente porque comparten la región axial asociada con REC8P

Modelo molecular de lo recombinación

El modelo molecular original de la recombinación (de Holliday) proponía que dos moléculas de ADN, luego de alinearse en registro, sufrían una fractura de cadena simple cada una, y un extremo de la cadena cortada en cada cadena "invadía" la molécula opuesta, formándose un acople entre las dos moléculas, el cual constituía un tipo de unión especial, la unión o intermediario de Holliday, que luego sufría un proceso complejo que terminaba en la producción de dos moléculas que intercambiaban segmentos (*entrecruzamiento* o recombina-

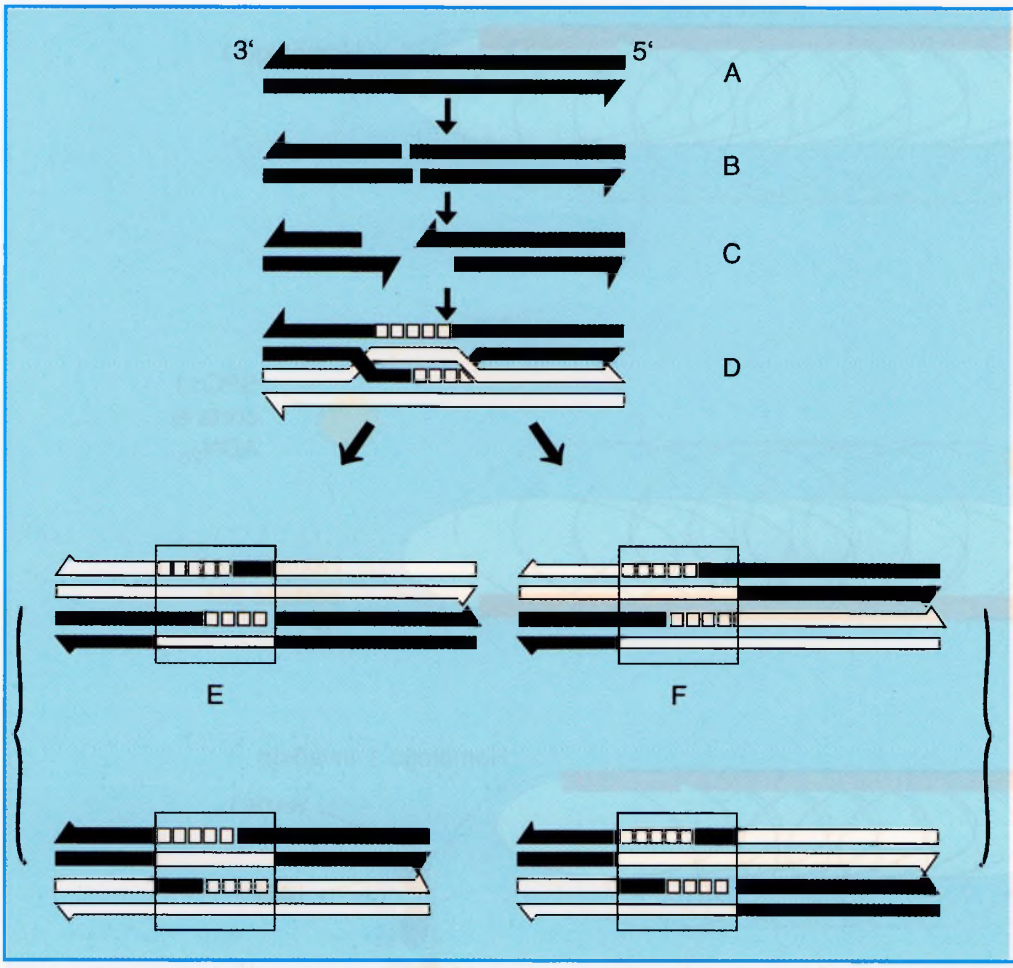


Fig. 12-17 Esquema del proceso molecular de recombinación meiótica. **A.** Molécula "activa" **B.** Fractura de la cadena doble. **C.** Producción de extremos colgantes. **D.** Invasión de la segunda molécula (blanca) y formación de dos uniones de Holliday. **E.** Resolución sin intercambio (conversión génica). **F.** Resolución con recombinación recíproca.

ción), pero también podía dar por resultado sólo un corto segmento copiado de la otra molécula (fenómeno éste denominado *conversión génica*, por oposición al *entrecruzamiento* o recombinación recíproca). La formación de estas uniones especiales (de Holliday) y el establecimiento de un complejo formado por dos moléculas de ADN unidas, en general, están aceptados; pero en vez de las rupturas de cadenas simples, actualmente se asigna un papel fundamental en el inicio de la recombinación a las *fracturas de cadena doble*. Esto, a su vez, se asocia con el reconocimiento de que la meiosis está estrechamente vinculada con el proceso más radical del daño al ADN, su fractura; es decir que la meiosis está íntimamente relacionada con la reparación del ADN

El orden hipotético de los fenómenos en el proceso de la recombinación sería el siguiente fig. 12-17)

1 Alineamiento de las moléculas homólogas de ADN Este alineamiento ocurre antes de la sinapsis, por mecanismos desconocidos, pero la sinapsis estabiliza esta interacción.
2. Fractura de la cadena doble en una de las moléculas de ADN Esta molécula que se fractura es la llamada "activa" durante la recombinación. El hecho de que una de las dos cadenas se fracture y la otra permanezca intacta al principio muestra que la iniciación de la recombinación no es simétrica. Las fracturas de la cadena doble pueden ser físicas (como las inducidas por rayos X) o enzimáticas, por medio de enzimas que atacan las dos cadenas en un sitio especial, tal como lo hacen las enzimas de restricción (véase cap. 3) Éste es el mecanismo usado por la célula, y como se vio más arriba, está integrado por el complejo Spo11
3. Producción de extremos 3' colgantes en la molécula activa. Estos extremos podrían ser producidos ya en la fractura inicial (como con las enzimas de restricción) o aumentados por una exonucleasa 5'-3' Los extremos colgantes probablemente están asociados a un comple-

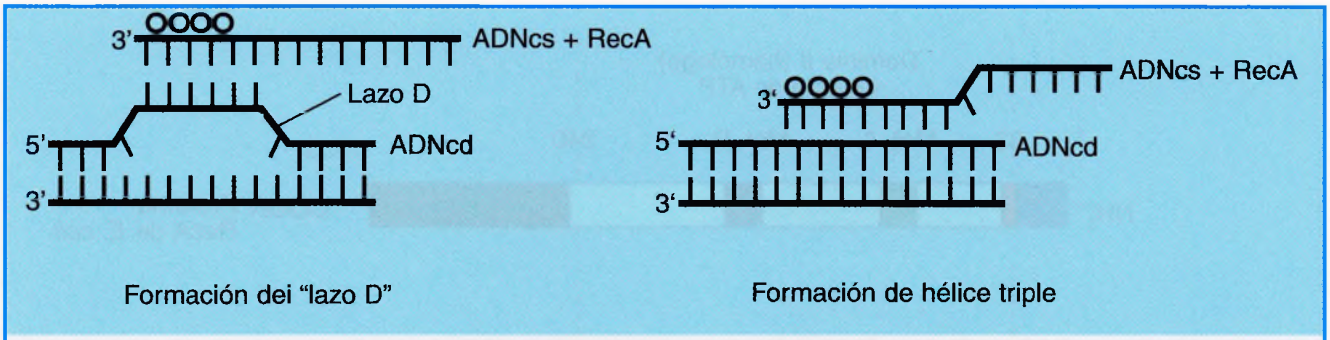


Fig. 12-18. Esquema de las propiedades "invasoras" de una cadena simple de ADN (ADNcs), asociada con RecA, sobre una molécula de ADN de cadena doble (ADNcd) que contiene secuencias de bases homólogas a las del ADNcs.

jo proteínico que mantiene unida la molécula "activa"

4 Producción de extremos "invasores" 3' recubiertos de una proteína recombinasa. En este paso es esencial la intervención de la proteína RecA (recombinasa A) y de las proteínas que le son homólogas en la especie humana (Rad51 y DMC1). Una cadena simple de ADN asociado con RecA es capaz de invadir una molécula intacta de ADN y efectuar una "búsqueda de secuencias homólogas" mediante la formación de una cadena triple de polinucleótido con RecA asociada.[41]

5. Desplazamiento de una cadena del ADN intacto por medio de la cadena 3' invasora. Es decir, formación de un "lazo D" por desplazamiento; este lazo D, a su vez, es usado por la molécula rota, que lo acopla sobre el otro extremo 3'. En ese momento, ambos extremos 3' de la molécula rota están acoplados a cadenas sanas de la molécula homóloga.

6. Síntesis de ADN de tipo reparativo, en los extremos 3' de las cadenas rotas, usando las cadenas sanas como molde. Aquí se produce la "conversión génica" en pequeños segmentos.

7 Desplazamiento de las dos uniones de tipo Holliday a lo largo de la molécula sana. Al "deslizarse" las uniones, los segmentos de cadena simple de una molécula original quedan apareados con la cadena opuesta de la otra molécula ("formación de heterodúplex")

8. Resolución de la estructura intermediaria tetracatenaria. Esta resolución puede hacerse con intercambio de cadenas (recombinación recíproca) o sin él, en cuyo caso sólo resulta un pequeño segmento copiado de la otra molécula (conversión génica). En la resolución intervienen las "resolvasas", entre las cuales se encuentran las RuvA, B y C.

Papel de las recombinasas: RecA en procariontes y RAD51-DMC1 en eucariontes

En los procariontes se han estudiado en detalle algunas proteínas que tienen un papel prominente en los procesos de recombinación. La proteína RecA, aislada de la bacteria *E. coli* en 1976, es una de estas proteínas, que no se encuentra en estado funcional en los mutantes de la bacteria incapaces de sufrir recombinación (las bacterias pueden sufrir recombinación génica mediante fenómenos de "conjugación bacteriana"). La RecA, de aproximadamente 38.000 Da, ha sido intensamente estudiada in vitro y se le conocen varias particularidades: se liga al ADN de cadena simple formando hélices características de 10 nm de diámetro y un paso de hélice de 9,3 nm. Es capaz de desplazar una cadena (cortada) de una molécula de ADN de cadena doble. Asociada a una cadena simple de ADN, es capaz de "invadir" y asociarse a una molécula de ADN (fig. 12-18) así como de asociarse con ATP y sufrir un cambio de conformación.

La "cadena invasora" formada por RecA + ADNcs invade una molécula doble (ADNcd) y reconoce una secuencia homóloga de bases mediante uniones hidrógeno diferentes de las uniones usuales (Watson-Crick).[41]

La proteína RecA de *E. coli* ha resultado ser parte de una familia de proteínas muy conserva-

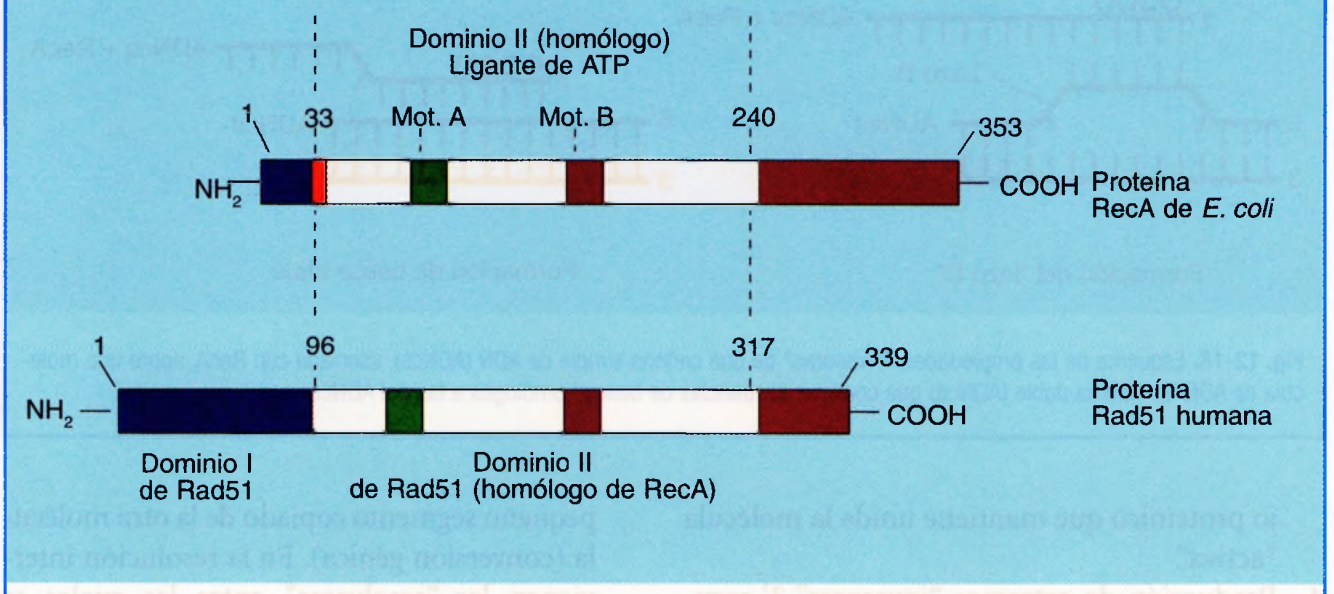


Fig. 12-19. Estructura de las proteínas RecA de *E. coli* y Rad51 humana. Ambas proteínas comparten el dominio II, con los "motivos" A y B, de unión al ATP El dominio y el carboxiterminal son diferentes.

das en el curso de la evolución de los organismos eucariontes: la familia de proteínas similares a RecA, entre ellas está la proteína Rad51 humana (hsRad51), que interviene tanto en la recombinación meiótica como en la reparación del ADN en todo tipo de células. La proteína Rad51 es homóloga a la RecA en su dominio II y se diferencia de ella en su dominio inicial I y en el terminal (C-terminal) (fig. 12-19) [42] Tal como se vio más arriba, en los organismos superiores la proteína DMC1 es también homóloga de RecA, pero está restringida a las células germinales en meiosis.

La proteína Rad51 se puede localizar por métodos histoquímicos: en muchas células humanas, la Rad51 está localizada en forma difusa en el núcleo celular, por ejemplo en la cromatina de los linfocitos. En los espermatocitos meióticos, en cambio, la Rad51 se concentra exclusivamente sobre los ejes meióticos (complejos sinaptonémicos y ejes simples) cuando comienza la profase meiótica. Esta localización parece resultar de su utilización preferencial en la región axial de los pares de cromosomas meióticos, ya sea en la búsqueda de homología o en la reparación de ADN que necesariamente debe ocurrir en los sitios de recombinación.

Nódulos de recombinación tardíos (propios de recombinación)

Si bien los quiasmas son expresiones citológicas de la recombinación recíproca, sólo son visibles con posterioridad al momento en que ésta se ha efectuado; son la expresión de *resultados* de la recombinación. Una expresión morfológica más cercana, cronológicamente, son los nódulos de recombinación tardíos.[43]

Estos nódulos son estructuras asociadas con los complejos sinaptonémicos en el paquiteno, que presentan diversa morfología según las especies. En la especie humana tienen aspecto de "barra", con una longitud de 200 nm y un ancho de 40 nm; están colocados sobre el espacio central de los complejos, generalmente en forma oblicua o transversal a los ejes. El número de nódulos tardíos por núcleo de espermatocito humano es en promedio de 45, muy parecido al número de quiasmas.[24] La distribución de estos nódulos a lo largo de cada bivalente humano presenta una significativa similitud con la distribución de los quiasmas en los respectivos bivalentes, con inclusión de una muy baja frecuencia cerca de los centrómeros y una frecuencia elevada en las regiones terminales (cercanas a los telómeros) [43]

En mutantes de la mosca *Drosophila melanogaster* se ha comprobado un paralelismo entre las alteraciones del número y la morfología de estos nódulos y la reducción de la recombinación meiótica propia de estos mutantes. Además, se ha comprobado que sobre los nódulos de recombinación se localiza preferencialmente un tipo de síntesis reparativa de ADN, específica para el estadio paquiteno, de modo que los territorios circundantes a un nódulo de recombinación se pueden rotular con timidina tritiada.

Los nódulos de recombinación tardíos son probablemente la expresión morfológica de un complejo de proteínas, muchas de ellas enzimas y sus sustratos, concentrado en la región donde ocurre un fenómeno de recombinación génica. En la actualidad, se usa la detección inmunofluorescente de una de las proteínas de los nódulos, la MLH1, cuya localización y número coincide con los nódulos (véase fig 12-11 B, un espermatocito humano rotulado para MLH1)

Segregación de homólogos: disyunción normal

La metafase de la primera división meiótica difiere de la mitosis en una característica esencial: en cada par de cromosomas homólogos se separan entre sí los dos homólogos, yendo uno a cada polo, con sus dos cromátidas hermanas cada uno. Es decir que, en vez de separarse cromátidas hermanas, se separan homólogos enteros (debe recordarse que como todo par tiene al menos un quiasma y en cada quiasma hay un intercambio de cromátidas homólogas, estos segmentos intercambiados separan segmentos de cromátidas hermanas)

Esta diferencia entre la metafase I y la mitosis está basada precisamente en la existencia de un aparato proteínico formado por las cohesinas, y en el fenómeno de recombinación que ocurre siempre, por lo menos una vez en los bivalentes meióticos.

Por un lado, como se vio antes, los ejes de cada homólogo son estructuras proteínicas colocadas en la interfase común a las dos cromátidas hermanas de cada homólogo. Esto significa que en la región central de cada homólogo las dos cromátidas hermanas están asociadas por ese material proteínico que contiene REC8. El estudio posterior de mutantes para la segregación ha confirmado que el aparato proteínico de los ejes es necesario para la segregación normal (separación de los homólogos sin separación de las cromátidas hermanas, véase sección sobre cohesinas). No todas las regiones de los ejes son de igual importancia para mantener esta *cohesión de cromátidas hermanas*; en realidad, el papel principal parece residir en las regiones de los ejes que atraviesan las zonas centroméricas. En estas zonas de los homólogos humanos y de otras especies, se encuentra un material denso, con la forma de un filamento central, en la metafase meiótica I, este filamento no existe en las divisiones mitóticas.[44] La identificación bioquímica de este material ha sido recientemente definida como cohesina meiótica (véase arriba), pero al menos la proteína Cor1(= SYCP1) también está presente en la región de este filamento centromérico. La localización centromérica de este material probablemente indica que está asociado con un tipo especial de secuencias de ADN centromérico, y estas secuencias también serían necesarias para mantener la cohesión de las cromátidas hermanas.

El otro fenómeno esencial para la segregación normal es la existencia de un quiasma (al menos uno), entre los homólogos. En los casos anormales, en los cuales un bivalente no tiene ningún quiasma y tampoco existe otro mecanismo de asociación entre homólogos, el bivalente no puede orientarse correctamente en el huso de la primera división meiótica; los dos homólogos finalmente se separan, pero migran irregularmente, yendo en una proporción importante al mismo polo del huso divisional; esto es, provocando una *no disyunción* o no segregación. El establecimiento de la asociación normal en el huso meiótico requiere la presencia de una *resistencia* contraria a la tracción de los microtúbulos del huso asociados con los centrómeros. Normalmente, uno o más quiasmas establecidos entre dos homólogos constituyen la resistencia a las fuerzas del huso divisional. Por ello, la disminución o la abolición de los quiasmas lleva ya sea a la no disyunción de un par cromosómico o, si es más extensa, a la degeneración y muerte de la célula meiótica en la misma división meiótica.

No disyunción en la meiosis humana[45]

Cuando falla la segregación de los dos homólogos en la anafase I de la meiosis, ambos homólogos pueden ir al mismo polo, mientras el polo opuesto queda privado de cualquiera de los dos; esto se denomina la no disyunción en la meiosis I. Por extensión, cuando dos cromátidas hermanas no se separan en la anafase de la meiosis II, se produce la no disyunción de la división II, y, en forma similar, a la falta de separación de dos cromátidas hermanas en una mitosis se le da el nombre de no disyunción mitótica. En todas estas circunstancias, el resultado de una no disyunción es la producción de aneuploidía. La aneuploidía (presencia de un número cromosómico anormal, véase cap. 17) está presente en alrededor del 0,3% de los recién nacidos; en tales casos se presenta generalmente como cuadros graves de trisomía de un autosoma (#21, #13, #18) o como una anomalía numérica de los cromosomas sexuales (XXY, X0, XXX y otras) Sin embargo, la presencia de aneuploidía en el momento de la fertilización es mucho mayor, pero queda oculta por la inviabilidad de gran parte de los embriones; así, se observó que el 35% de los abortos espontáneos son aneuploides.[46] El uso extendido de la reproducción asistida permitió comprobar que el 56,5% de los cigotos por usarse eran aneuploides (Kovalevsky G, Patricio P 2005), por lo cual el porcentaje de aneuploidía podría ser mayor del 50%.

Si bien las trisomías más conocidas afectan a unos pocos cromosomas (sexuales, #21, #13 y #18), los datos actuales muestran que todos los cromosomas pueden ser afectados por no disyunción, dando origen a las aneuploidías (panel 12-1) Esto se ha demostrado mediante el análisis de un gran número de espermatozoides mediante HISYF (= FISH, véase cap. 17) en 165.330 espermatozoides observados, las tasas de presencia por duplicado fueron similares para los autosomas 1, 3, 7, 10, 11, 12, 16, 17 y 18 (alrededor del 0,1%), mientras que para los sexuales es cuatro veces mayor (0,43%) [47] Si bien, como se resumió anteriormente, los factores importantes y conocidos para la disyunción normal son los materiales axiales y la presencia de quiasmas, los mecanismos subyacentes a la no disyunción en la especie humana no son bien conocidos. Se sabe que un número importante (pero no el total) de las no disyunciones está relacionado con la edad de la madre. Esta relación con la edad materna es clara, ya que el riesgo aumenta cerca de cuarenta veces desde los 20 a los 45 años de edad. La relación entre no disyunción y edad materna ha tratado de ser explicada por dos hipótesis: 1) la hipótesis de la línea de montaje de los ovocitos y 2 la hipótesis de la depleción progresiva de ovocitos. La primera presume que los ovocitos así como van entrando secuencialmente en profase meiótica en el feto, también salen de la meiosis y participan en una ovulación en el mismo orden secuencial, es decir que los más tardíos en ingresar (que poseerían menos probabilidades de tener quiasmas) serían ovulados en edades avanzadas. La segunda hipótesis, que es la más favorecida por la evidencia actual, sostiene que a medida que avanza la edad, hay menos ovocitos disponibles para ovular y, por lo tanto, se incrementa la probabilidad de emplear ovocitos defectuosos, con pocos quiasmas. Cualquiera que sea el mecanismo real, hay diferencias entre la no disyunción materna y la paterna. Mientras la materna es la causa predominante de aneuploidía autosómica (#21, #13 y #18) y de la producción de trisómicos 47, XXX (90% del total es de origen materno),[48] la no disyunción paterna es la predominante en el origen de la monosomía 45,X0 (80%) y de la condición XYY (100%) y constituye cerca del 50% del origen de la aneuploidía XXY.[48] Esta diferencia de la no disyunción entre los sexos está relacionada con la presencia del par XY en el varón, con una región seudoautosómica corta que restringe la posibilidad de quiasmas y predispone a la no disyunción de los cromosomas sexuales, sin tener relación alguna con la edad. En el examen de un número de casos de aneuplodía de origen materno, se ha deducido que hay cinco tipos de mecanismos involucrados, tres de los cuales dependen de una alteración previa de la recombinación meiótica. a) no disyunción aquiasmá

Panel 12-1 Detección de aneuploidía en los espermatozoides humanos: aplicación de las técnicas de HISYF (FISH)

Panel

La aplicación de técnicas de "hibridación in situ y fluorescencia" (HISYF = FISH, véase cap. 14) permite actualmente detectar la frecuencia de errores meióticos en cada individuo del sexo masculino mediante el examen de sus espermatozoides en un frotis sobre un portaobjetos, lo cual hace posible el examen de un gran número de espermatozoides y, por consiguiente, determina una gran sensibilidad para la detección de aneuploidía en estos gametos. Los espermatozoides se tratan con ditiotreitol o con álcali para descondensar la cromatina de la cabeza, con el fin de lograr una mayor resolución de las señales, y se realiza la hibridación con sondas centroméricas específicas, que se detectan con fluorocromos de distintos colores. El dato de mayor significación es la frecuencia de disomía, es decir, la presencia de dos cromosomas homólogos, lo cual implica una no disyunción. Para distinguir entre disomía y un espermatozoide anormal y diploide (por fusión de dos espermátidas o una meiosis frustrada), siempre se usan dos sondas con dos colores diferentes para dos cromosomas; si ambos colores dan dos señales, es diploide; si sólo hay una señal doble de un color, es disómico para ese cromosoma. En el caso de los cromosomas sexuales, se usan tres sondas y tres colores, para poder distinguir entre dos señales del X y dos señales del Y, además de la señal para distinguir diploidía. Mediante esta HISYF de múltiples colores, en el examen de 418.931 espermatozoides de dadores sanos, se constató una frecuencia de disomía cercana al 0,1% para los cromosomas #1, #2, #4, #15, #16, #18 y #20, una frecuencia de disomía del 0,29% para el #21 y una del 0,43% para los cromosomas sexuales.[47] También es de especial importancia la posibilidad de examinar los espermatozoides de un varón portador de una aberración cromosómica, con el propósito de determinar directamente el riesgo de su transmisión. Mediante esta técnica se pudo identificar que en ciertos varones con la condición XYY (véase cap. 14) existe un riesgo aumentado de transmitir una aneuploidía sexual,[49] lo cual ha sido plenamente corroborado por el estudio de complejos sinaptonémicos.[50]

tica del par involucrado, b) con exceso de intercambios en la región centromérica, c) normoquiasmática, d) no disyunción en la división II con alteración de la distribución de intercambios y e) no disyunción mitótica (poscigótica, relativamente rara)

De lo anterior, se deduce que una parte importante de la no disyunción en ovocitos está originada en una falla previa en la recombinación, ya sea por defecto o por mala localización de los intercambios.

Infertilidad humana masculina. Causas genéticas

Alrededor del 8% de los varones adultos son infértiles debido a varias causas. Descartando las razones infecciosas, traumáticas y otras bien definidas, queda un número importante de varones cuya infertilidad no obedece a ninguna causa conocida. En este grupo, el origen genético de la infertilidad debe ser sospechado. El factor genético en la infertilidad masculina se clasifica en dos grandes rubros: a) factores cromosómicos y b) alteraciones génicas. El primer rubro, a su vez, comprende variados tipos de anomalías, tanto de cromosomas sexuales como autosómicos, cuyos efectos son observables mediante el análisis de la conducta de los complejos sinaptonémicos durante la meiosis.[27] Las aneuploidías, en especial las que afectan a los cromosomas sexuales, repercuten desfavorablemente en la espermatogénesis. La presencia de más de un cromosoma X más el cromosoma Y (síndrome de Klinefelter) lleva a la depleción de las células germinales en el varón. Existe una incompatibilidad entre la presencia de más de un cromosoma X y el microambiente testicular en la etapa embrionaria, la secreción de hormona antimülleriana por parte de las células de Sertoli es perjudicial para las células germinales con XX o XXY; posteriormente, ninguna célula germinal XXY inicia una meiosis normal, sino que degeneran y mueren. Lo mismo sucede con los raros pacientes varones

con cromosomas XX. Por su parte, los varones con síndrome de Down (trisomía 21) presentan hipoespermatogénesis, la cual está vinculada con el hecho de que el cromosoma 21 excedente se asocia frecuentemente con el par XY, formando un conjunto anormal que lleva a la muerte del espermatocito. Muchos reordenamientos cromosómicos son nocivos para el espermatocito mediante un mecanismo similar· los segmentos cromosómicos incompletamente apareados pueden asociarse con el cuerpo XY; este tipo de asociación perturba el avance normal de la profase meiótica y lleva a la degeneración del espermatocito. De esta manera, translocaciones robertsonianas, translocaciones recíprocas, inversiones, duplicaciones y deleciones de heterocromatina, con frecuencia acarrean la degeneración del espermatocito, mediante la asociación anormal de segmentos asinápticos con el par XY. Otras aberraciones que afectan directamente al cromosoma X o al Y, tales como translocaciones Y autosoma o X-autosoma, o aberraciones estructurales del Y como un isocromosoma Y, también conducen a la degeneración del espermatocito. Así, la espermatogénesis se revela como más vulnerable que la ovogénesis frente a aberraciones cromosómicas (panel 12-2)

Aunque es mucho menos conocido, el factor génico propiamente dicho (no cromosómico) también interviene en la infertilidad masculina. Las deleciones (pérdidas de la región del brazo largo del cromosoma Y humano, que contacta con la zona de heterocromatina distal, se acompañan de azoospermia; además, desde hace tiempo se sospechaba que esta región estaba relacionada con la espermatogénesis. Se ha estudiado el ADN de la región que incluye a este factor, AZF ("factor de azoospermia", localizado en Yq11.23. Estas secuencias están alteradas o con deleciones en pacientes que presentan azoospermia (véase cap. 18)

Impronta génica. Síndromes de Prader-Willi y de Angelman

Se ha visto en el capítulo 11 que la formación inicial del corpúsculo de Barr en el trofoblasto embrionario es un ejemplo del fenómeno de "impronta" genómica ("imprinting") porque el gen *XIST* de un cromosoma X proveniente del padre está desmetilado desde la meiosis paterna y de esa manera está preparado para expresarse inmediatamente en el trofoblasto del embrión. La "impronta" o impresión génica no está restringida a los genes del cromosoma X, sino que se puede encontrar en variados sitios de todo el genoma. La impronta génica, en general, es la diferente expresión de genes, ya sea a un nivel cromosómico (conjuntos de genes ligados) o simplemente a nivel de genes aislados, según provengan de un gameto femenino o uno masculino. Se considera que la impronta génica se debe a las diferencias en el proceso de metilación que sufren partes del genoma durante la espermatogénesis y la ovogénesis; más especialmente, estas diferencias se introducirían en la profase meiótica, y en particular en el paquiteno. Se piensa que durante el paquiteno ocurren cambios especiales, haciendo una generalización a partir de la observación de que el gen *XIST* es desmetilado específicamente en ese estadio en los espermatocitos, pero en realidad los mecanismos moleculares de la impronta génica durante la meiosis son poco conocidos. Es razonable que la impresión génica difiera en la espermatogénesis y en la ovogénesis: el estadio de paquiteno es de distinta duración, la longitud de los complejos sinaptonémicos y el mapa de ligamiento son diferentes; no hay formación de cuerpo sexual o XY en ovocitos y los fenómenos posteriores al paquiteno son muy distintos en los ovocitos. Por ello se supone que el estado de metilación de las citosinas es diferente en el ADN de los gametos femeninos y masculinos en los mismos genes.

El resultado de la impronta génica es que si bien teóricamente el espermatozoide y el óvulo pueden transmitir los mismos genes, el *estado de actividad* de los genes que han sufrido impronta será distinto: unos serán activos y otros inactivos, simulando que el espermatozoide y el ovocito están transmitiendo alelos diferentes.

Este fenómeno ha tenido repercusión en biología de la reproducción y en ciertas enfermedades hereditarias. Respecto de lo primero, el embrión normal *requiere* un genoma haploi-

Panel 12-2. Avances en estudios de infertilidad genética humana

Panel

En 2006 se publicó el primer caso de una mutación de la recombinación meiótica en la especie humana.[51] Esto fue posible gracias a los trabajos previos hechos en ratones, en los cuales se inactivaron varios genes específicos de la meiosis y se analizaron sus resultados.

En el caso citado, el paciente mostraba un bloqueo total de la espermatogénesis a nivel de espermatocito, con falta de sinapsis, de recombinación y del cuerpo XY normal. La falla de la sinapsis no se debía a una carencia de las proteínas del CS, sino a un déficit molecular más complejo, lo cual fue corroborado con otros pacientes con el mismo cuadro analizados posteriormente (fig. 1).

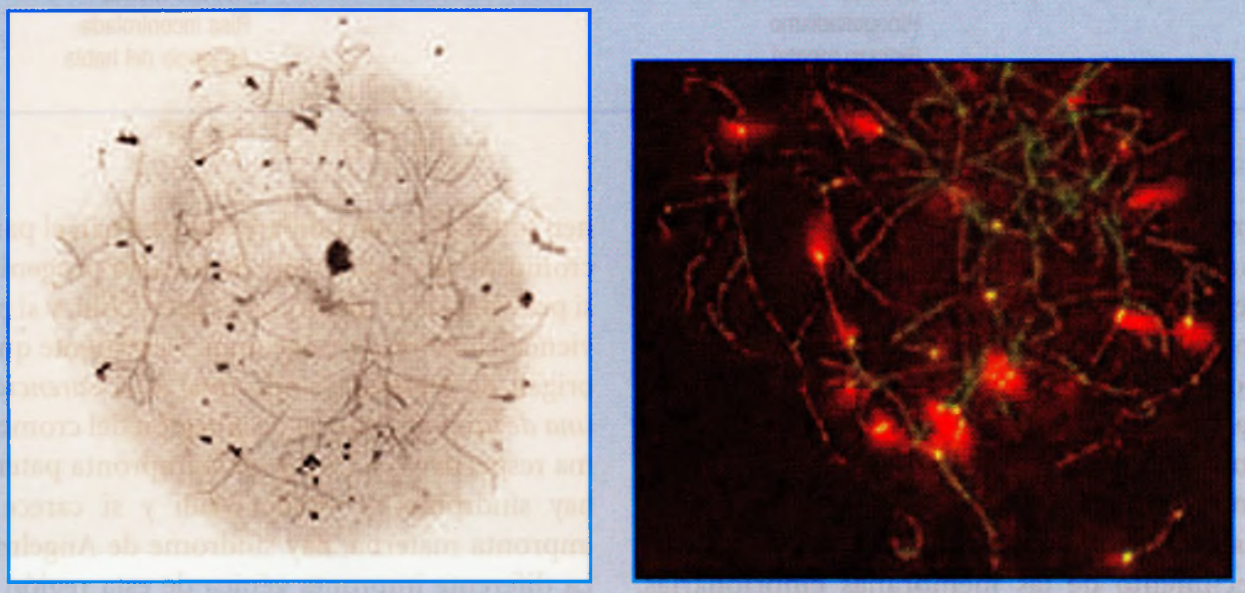


Fig. 1. Espermatocitos del primer paciente con una mutación de la recombinación meiótica. A la izquierda, micrografía electrónica que muestra ausencia de complejos sinápticos (asinapsis) y del cuerpo XY. A la derecha, inmunofluorescencia que muestra los ejes simples rotulados con BRCA1 (verde) y parches de rotulación con gamma H2AX (rojo) que demuestran la falta de reparación de las fracturas del ADN originadas por SPO11 (de Sciurano, et al., 2006).[51]

Si alguno de los genes codificantes de las varias proteínas meióticas está mutado, esa mutación no será heredada puesto que se bloquea la meiosis. En el caso presentado se trata de uno de los genes del camino de la reparación de las fracturas originadas por SPO11. Otros casos similares podrían explicar un porcentaje significativo de esterilidad masculina humana de origen genético. Por otra parte, las aberraciones cromosómicas tienen efectos dañinos de intensidad variable sobre la espermatogénesis humana. Nuevamente, mediante el uso de anticuerpos contra proteínas meióticas se ha podido dilucidar el mecanismo de este tipo de daño. En las translocaciones, deleciones y monosomías o trisomías, en los espermatocitos se produce una situación de asinapsis de ciertos segmentos cromosómicos redundantes o reordenados. Esos segmentos cromosómicos son inactivados para la transcripción génica, como lo muestra su rotulación con γH2AX y su asociación con el cuerpo XY, que se ve modificasdo en esas patologías.[52]

de con impronta paterna y otro con impronta materna, si falta *una* de las dos improntas, aunque el conjunto cromosómico parezca perfectamente normal, se produce una detención del desarrollo, con características diferentes según falte la impronta paterna o materna. Por ejemplo, un cigoto diándrico, con un conjunto cromosómico diploide aparentemente normal

Cuadro 12-1. Características de los síndromes de Prader-Willi y de Angelman

Síndrome de Prader-Willi		**Síndrome de Angelman**	
Con cariotipo anormal:	del (15q11-q13); 50% de casos; el cromosoma es paterno	Con cariotipo anormal:	del (15q11-q13); alrededor del 50%; el cromosoma es materno
Cariotipo normal:	Disomía uniparental, origen materno	Cariotipo normal:	Disomía uniparental, origen paterno
Clínica:	Hipotonía neonatal Retraso de desarrollo Hiperfagia y obesidad (infantil) Hipogonadismo Retraso mental	Clínica:	Ataxia Hiperactividad, epilepsia Facies de títere Retraso mental Risa incontrolada Ausencia del habla

pero derivado únicamente del padre, desarrolla una *mola hidatidiforme*, en la que progresan las membranas embrionarias sin desarrollo del embrión propiamente dicho. Esta mola es abortada y a veces puede producir un tumor maligno. El cigoto digínico contiene un conjunto diploide de origen exclusivamente femenino y también conduce a una detención del desarrollo con un embrión anormal con escaso crecimiento de las membranas embrionarias. En ocasiones, uno solo de los pares de cromosomas deriva exclusivamente de uno de los progenitores y provoca la denominada *disomía uniparental.*

Con respecto a los síndromes hereditarios, la impronta génica se demuestra en los síndromes de Prader-Willi y de Angelman, y en otras enfermedades como el tumor de Wilms.[53,54] Los síndromes de Prader-Willi y de Angelman parecían ser enfermedades hereditarias totalmente independientes hasta que se descubrieron sus mecanismos de impronta génica (cuadro 12-1)

La deleción del cromosoma 15 en la zona proximal del brazo largo, que se observa en cerca de la mitad de los pacientes en ambos síndromes, da un fenotipo distinto según el origen del cromosoma delecionado: si proviene del padre, da Prader-Willi, si proviene de la madre, da Angelman. Los casos sin anomalía cariotípica tienen todos disomía uniparental, es decir, el par de cromosomas 15 proviene de un solo progenitor; si proviene de la madre, da Prader-Willi, y si proviene del padre, da Angelman. Es evidente que el origen de estos dos síndromes es la *carencia de una de las improntas* (o de la región del cromosoma respectivo)· si carece de la impronta paterna, hay síndrome de Prader-Willi y si carece de impronta materna, hay síndrome de Angelman. La diferente impronta génica de esta región del cromosoma 15 en la espermatogénesis y en la ovogénesis no sólo implica una diferencia en la metilación de esta región, sino también la presencia funcional de genes controladores del tipo de impronta, distintos para la espermatogénesis y la ovogénesis. En el síndrome de Prader-Willi hay obesidad patológica con apetito insaciable, hipogonadismo, retraso mental moderado, corta estatura y otras malformaciones.[54] En el síndrome de Angelman, por el contrario, los niños no son obesos, hay retraso mental con hiperquinesis y ánimo alegre (son llamados "títeres alegres") y estatura normal. El sector del cromosoma 15 responsable de estos síndromes es complejo, contiene genes que son activos por impronta materna y otros que se activan por impronta paterna, además este segmento es propenso a sufrir deleciones que pueden ser detectadas con sondas específicas y FISH y también por otros métodos.

RESUMEN

La meiosis es la contrapartida de la fertilización; reduce el número cromosómico de diploide a haploide, y también introduce nuevas combinaciones de genes maternos y paternos en cada generación. La meiosis ocurre en circunstancias muy distintas según el sexo: en la mujer la profase meiótica ocurre en la época fetal y toda la meiosis dura entre una y cuatro décadas; en el varón dura dos semanas y ocurre desde la pubertad.

Los fenómenos esenciales de la meiosis son tres: sinapsis de los homólogos, recombinación meiótica y segregación o disyunción; los tres ocurren en la primera división meiótica, y los dos primeros en la profase, que es la etapa más importante. La sinapsis cromosómica está determinada por la organización de un aparato proteínico, que constituye los ejes meióticos de los cromosomas en el ieptoteno y los complejos sinaptonémicos durante el cigoteno y el paquiteno. Los complejos sinaptonémicos (CS) tienen dos elementos laterales (EL) de 60 nm de ancho y un espacio central de 100 nm. Los EL son proteínicos, argirófilos, contienen poco ADN axial y a los costados tienen amplios lazos de cromatina, que tienen su base de implantación en los propios EL. En el espacio central están los filamentos transversales muy finos (1,6-2 nm), proteínicos, que representan dos α-hélices. La proteína SYCP1 = Syn1, de 946 aminoácidos y 111 kDa de peso molecular es el principal componente de los filamentos transversales; su dominio central es una α-hélice capaz de formar asociaciones diméricas como en los filamentos intermedios; su extremo carboxilo puede unirse a ADN y está orientado hacia el EL en el espacio central, mientras su extremo aminoterminal está orientado hacia el elemento central. La proteína SYCP3 = Cor1, de 234 aa y 30 kDa, es el principal componente conocido de los EL; además, se encuentran SCP2, de 190 kDa, y proteínas "funcionales" como la topoisomerasa II y la Rad51. En los ejes engrosados del par XY se encuentra la proteína BRCA1 y en la cromatina adyacente la variante histónica γH2AX. Se pueden realizar cariotipos de CS sobre la base de su longitud relativa y de la posición del cinetocoro; estos cariotipos son similares a los mitóticos; cada uno corresponde a un par cromosómico, son más largos que los cromosomas mitóticos y tienen una longitud total de 258 μm. Estos cariotipos de CS son útiles para detectar anomalías cromosómicas y meióticas. Los quiasmas son la visualización con microscopio de luz, en el diploteno, de los fenómenos de recombinación recíproca. En cada quiasma se entrecruzan dos cromátidas homólogas de las cuatro que forman un bivalente del diploteno. La ultraestructura de los quiasmas muestra que tienen dos fases: la fase en que muestran un segmento de CS en la región de convergencia de los ejes y la fase del puente de cromatina que invade el espacio central. Además, se muestra que los ejes no se cruzan en los quiasmas, de lo que se deduce que cada eje está colocado entre las dos cromátidas hermanas en la región axial. Los ejes contienen un complejo de cohesina, una de cuyas unidades propias de la meiosis es la proteína REC8. En los espermatocitos humanos hay entre 45 y 51 quiasmas en total; en ovocitos su número es mayor. La recombinación meiótica es la ruptura de dos moléculas de ADN de dos homólogos, con intercambio recíproco de fragmentos y reunificación de los extremos. La recombinación se inicia con una fractura de la cadena doble de una molécula de ADN (inducida por SPO11) alineada a otra molécula homóloga; luego un extremo 3' de cadena simple, asociado con la proteína RecA, constituye un filamento "invasor" que se asocia y explora la otra molécula (indemne) de ADN buscando una secuencia homóloga de bases. También hay síntesis de ADN de tipo reparativo en los extremos 3', formación de un lazo D y desplazamiento de las uniones de tipo Holliday a lo largo de las cadenas. La resolución de la estructura de cuatro cadenas en dos moléculas bicatenarias requiere las enzimas RuvA, B y C, así como ligasas para ADN. La proteína RecA que se une preferencialmente a ADN está representada en los mamíferos por la pareja Rad51 y DMC1. La asociación entre el filamento "invasor" y una molécula de ADN se hace en la forma de una triple hélice, en la cual las bases del filamento invasor hacen uniones diferentes de las de Watson-Crick con las bases de la molécula invadida. La proteína Rad51, de 339 aa, es homólo-

ga de la RecA bacteriana y su dominio central es muy similar al de la RecA, pero ambas se diferencian en los dominios inicial y final. La Rad51 interviene en la reparación de fracturas de ADN en todas las células, y en las meióticas participa en la recombinación, acumulándose preferencialmente sobre los ejes meióticos. Los nódulos de recombinación tardíos son estructuras densas en forma de barra, de 200 nm de largo y 40 de ancho, colocadas sobre el espacio central de los CS, en número total de 45 por espermatocito; guardan una estrecha correlación con la localización y el número de los quiasmas, y representan un conjunto de proteínas, de las cuales es representante la MLH1, y sustratos involucrados en los procesos de la recombinación. La segregación o separación de los dos homólogos en la anafase I depende de que los cuatro cinetocoros se comporten funcionalmente sólo como dos, yendo a polos diferentes. Para la segregación normal se requieren tanto los ejes meióticos como la presencia de, por lo menos, un quiasma por bivalente.

La cohesión entre cromátidas hermanas en la división meiótica I se atribuye al material proteínico de los ejes meióticos, localizado en los centrómeros, visible como un filamento centromérico e identificable como cohesina meiótica-REC8P y proteína Cor1. La presencia de un mínimo de un quiasma es el otro requisito para una disyunción normal, porque es necesaria la resistencia provista por un quiasma para permitir la orientación de los dos pares de cinetocoros hacia polos diferentes. La no disyunción es la falla de la segregación y produce aneuploidía en los gametos; ocurre en el 0,3% de los recién nacidos y en el 35% de los abortos espontáneos. La no disyunción en la ovogénesis es la principal responsable de las trisomías autosómicas y de los casos de 47,XXX; la no disyunción en la espermatogénesis es la principal responsable de los casos de 45,X0, de 47,XYY y de la mitad de los casos de 47,XXY. El par XY forma el cuerpo XY, inactivo para la transcripción, durante el paquiteno. Este cuerpo se asocia con autosomas en variados casos de anomalías de cromosomas somáticos, ocasionando la degeneración de espermatocitos, responsable de la infertilidad masculina en casos de aberraciones cromosómicas somáticas. Otros mecanismos de infertilidad genética masculina involucran el factor de azoospermia (AZF), cuya región presenta deleciones o se halla alterada en casos de azoospermia. La impronta génica es la diferente expresión de los genes según hayan pasado por una gametogénesis masculina o femenina. Se debe a diferencias en la metilación del ADN durante la espermatogénesis y la ovogénesis. Los síndromes de Prader-Willi y de Angelman ocurren por la carencia de la impronta paterna (o del segmento) en el cromosoma 15 (Prader-Willi) o de la materna (o del segmento) (Angelman) en el mismo cromosoma.

REFERENCIAS

1 Maynard Smith J. The evolution of sex. Cambridge: Cambridge, University Press; 1978.

2. Solari AJ. Sex chromosome pairing and fertility in the heterogametic sex of mammals and birds. In: Gillies CD (ed). Chromosome pairing and fertility, Boca Raton: CRC Press; 1989.
3. Ohno S, Klinger HP Atkin NB. Human oogenesis. Cytogenetics 1962; 1:42-51
4. Kurilo LF Oogenesis in antenatal development in Man. Hum Genet 1981 57:86-92.
5. Heller CG, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. Rec Progr Hormone Res 1964; 20:545-575.
6. McHugh B, Heck MMS. Regulation of chromosome condensation and segregation. Curr Op Genet Develop 2003;13:185-190.

7 Hudson DF Marshall KM, Earnshaw WC. Condensin: architect of mitotic chromosomes. Chrom Res 2009;17:131 144.

8. Nasmyth K. Disseminating the genome: joining, resolving and separating sister chromatids during mitosis and meioss. Ann Rev Genet 2001;35:673-745.
9. Peters JM, Tedeschi A, Schmitz J. The cohesin complex and its roles in chromosome biology. Genes Develop 2008;22:3089-3114.
10. Sakuno T, Watanabe Y. Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions. Chrom Res 2009;17:239-249.

11 Pigozzi MI, Solari AJ. Differential immunolocalization of a putative Rec8p in meiotic autosomes and sex chromosomes of triatomine bugs. Chromosoma 2003;112:38-47

12. Stern H. Initiation of meiosis in iiiy and mouse: some molecular considerations. Arch Anat Micr Morphol Exp 1985;74:10-13.

13. von Wettstein D, Rasmussen SW, Holm PB. The synaptonemal complex in genetic segregation. Ann Rev Genet 1984;18:331-413.

14. Solari AJ.Meiotic chromosomes and meiotic mechanism. In: Chromosomes Today, vol. 14. Schmid M, Nanda I (eds.), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2004. p. 103-118.

15. Tandier CJ, Solari AJ. Methanol-acetil anhydride: an efficient blocking agent for electron microscope cytochemistry. Its application to mouse testis and other tissues. Histochemistry 1982;76:351-361

16. Solari AJ, Moses MJ. The structure of the central region in the synaptonemal complexes of hamster and cricket spermatocytes. J Cell Biol 1973;56:145-152.

17 Schmekel K, Skoglund U, Daneholt B. The three-dimensional structure of the central region in a synaptonemal complex: a comparison between rat and two insect species, Drosophila melanogaster and Blaps cribosa. Chromosoma 1993;102: 682-692.

18. CostaY, Speed R, Ollinger R, et al. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1 are at the centre of meiosis. J Cell Sci 2005;118:2755-2762.

19. Meuwissen RLJ, Offenberg HH, Dietrich AJJ, Riesewijk A, van Lersel M, Heyting C. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. EMBO J 1992; 11:5091-5100

20. Dobson MJ, Pearlman RE, Karaiskakis A, Spyropoulos B, Moens PB. Synaptonemal complex proteins: ocurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. J Cell Sci 1994; 107:2749-2760.

21 Solari AJ. The behaviour of the XY pair in mammals. Int Rev Cytol 1974; 38:273-317

22. Solari AJ. Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates. Boca Raton: CRC Press; 1993.

23. Handel MA. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. Exp Cell Res 2004;296:57-63.

24. Solari AJ. Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. Chromosoma 1980;81:315-337

25. Smith A, Benavente R. An Mr 51.000 protein of mammaiian spermatogenic cells that is common to the whole XY body and centromeric heterochromatin of autosomes. Chromosoma 1995;103:591-596.

26. Turner JMA. Meiotic sex chromosome inactivation. Development 2007·134:1823-1831

27 Sciurano RB, Solari AJ. Nuevas perspectivas en el estudio de los bloqueos meióticos en varones infértiles. Rev Arg Androl 2009;18:31-39.

28. Wettstein R, Sotelo JR. Electron microscope serial reconstruction of the spermatocyte I nuclei at pachytene. J Microscop 1967· 6:557-576.

29. Solari AJ. The behavior of chromosomal axes during male meiotic prophase. In: Segal SJ, Crozier R, Corfman PA, Condiiffe PG (eds.), The Regulation of Mammaiian Reproduction Springfield: C Thomas Publisher· 1973. p. 91-99.

30. Fang JS, Jagiello GM. An analysis of the chromomere map and chiasmata characteristics of human diplotene spermatocytes. Cytogenet Cell Genet 1988;47:52-57

31 Hassold T, Judis L, Chan ER, et al. Cytological studies of meiotic recombination in human males. Cytogenet Genome Res 2004;107:249-255.

32. Hirano T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. Genes & Develop 2002;16:399-414.

33. Pelttari J, Hoja M-R, Yuan L, et al. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammaiian meiotic cells. Mol Cell Biol 2001;21:5667-5677.

34. Stahl FW. The Holliday junction on its thirtieth anniversary. Genetics 1994;138:241-246.

35. Nichols MD, DeAngelis K, Keck JL, Berger JM. Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11 EMBO J 1999;18:6177-6188.

36. Lichten M. Breaking the genome to save it. Current Biol 2001·11:R253-R256.

37 Keeney, S. Spo11 and the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. In: Egel R, Lankenau DH (eds.), Recombination and Meiosis. Beriin: Springer-Veriag; 2007 p. 81 123.

38. Baudat F de Massy B. Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non crossover during mammalian meiosis. Chrom Res 2007·15:565-577

39. Solari AJ. Primitive forms of meiosis: the possible evoiution of meiosis. Biocell 2002;26:1 13.

40. de Massy B. Distribution of meiotic recombination sites. Trends in Genet 2003;19:514-521

41 Rao BJ, Radding CM. Rec A protein mediates homologous recognition via non-Watson-Crick bonds in base triplets. Phil Trans R Soc London B 1995;347:5-12.

42. Heyer WD. The search for the right partner· homologous palring and DNA strand exchange proteins in eukaryotes. Experientia 1994;50:223-233.
43. Solari AJ. Recombinatlon bars in human synaptonemal complexes spread with sodium dodecyl sulphate. Micr Electron Biol Cel 1983;7·1 11
44. Solari AJ, Tandler CJ. Presence of a centromeric filament during meiosis. Genome 1991;34:888-894.
45. Kokotas H, Grigorladou M, Petersen MB. Meiotic non-disjunctlon- The major cause of trisomy 21 In: Egel R, Lankenau DH (eds.) Recombination and Meiosis. Berlin: Springer-Verlag; 2007 p. 245-278.
46. Hassoid TJ. Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. Trends in Genet 1986;2:105-110.
47 Sprlggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: results of two- and three-color fiuorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes 1 12, 15, 18, X and Y. Cytogenet Cell Genet 1995;71:47-53.
48. MacDonaid M, Hassoid T, Harvey J, Wang LH, Morton NE, Jacobs P The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombinatlon. Human Mol Genet 1994;3:1365-1371
49. Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelietier R, et al. Meiotic behaviour of sex chromosomes Investigated by three-colour FISH on 35.142 sperm nuclei from two 47,XYY males. Hum Genet 1997;99:407-412.
50. Solari AJ, Rey Valzacchi G. Prevalence of a YY synaptonemal complex over XY palring in an XYY man with exclusive XYY spermatocytes. Chromosome Res 1997;5:467-474.
51 Sciurano RB, Rahn Mi, Pigozzi MI, Brugo Olmedo S, Solari AJ. An azoospermic man with a double-strand DNA break processing deficiency in the spermatocyte nuclel. Hum Reprod 2006;21·1194-1203.
52. Sciurano RB, Rahn MI, Rey Valzacchi G, Solari AJ. The asynaptic chromatin in spermatocytes of translocation carriers contains the histone variant γH2AX and associates with the XY body. Hum Reprod 2007;22:142-150.
53. Nicholls RD. New insights reveal compiex mechanisms involved in genomic imprinting. Am J Hum Genet 1994;54:733-740.
54. Cassidy SB, Driscoll DJ. Prader-Wiiii syndrome. Europ J Hum Genet 2009;17:3-13.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Turner JMA. Meiosis 2007 Where have we got to and where ae we going? Chromosome Res 2007 Speclal Issue: Meiosis 2007·15:517-521

Kovalevsky G, Patrizio P High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. Fertil Sterll 2005; 84:325-330.

Capítulo 13

Enfermedades de herencia multifactorial, enfermedades de origen complejo y otros tipos de herencia

La herencia multifactorial tiene componentes poligénicos. Correlación entre parientes y riesgo en familias. La disección genética de las enfermedades poligénicas identifica a cada uno de los genes implicados. Los estudios de amplitud genómica de asociaciones con enfermedades. Diabetes mellitus. Diabetes tipo 1 Diabetes del tipo MODY Diabetes tipo 2. Hipertensión arterial: formas mendelianas y forma esencial. Malformaciones congénitas. Enfermedad de Alzheimer· genes de presenilinas. Herencia mitocondrial y enfermedades asociadas

INTRODUCCIÓN

Como se describió en el capítulo 1, los caracteres cuantitativos o métricos, que son heredables, son el resultado de la acción de varios genes. Estos genes que actúan sobre un mismo rasgo, lo pueden hacer en forma igualitaria y aditiva, es decir, mediante aportes pequeños e iguales de cada uno, que se suman para dar el rasgo completo (estatura, presión arterial) o, alternativamente, los aportes de cada gen pueden ser desiguales, sobresaliendo un gen sobre los demás. En general, la herencia cuantitativa o multifactorial se refiere al primer caso (efecto igualitario y aditivo, sin dominancia) En esta circunstancia, si se toma una población o un número grande de personas con ese rasgo o enfermedad, la intensidad del rasgo o patología se distribuye según la curva normal (o de Gauss) (fig. 13-1A) En cambio, si el aporte de los genes no es igualitario y alguno sobresale sobre los demás, la curva no será normal y podrá presentar picos secundarios, "hombros" o desviaciones (fig. 13-1B) De ese modo, las curvas de distribución de intensidad de un rasgo métrico pueden dar una indicación inmediata del tipo de factor genético implicado en ese rasgo.

La razón de que los caracteres regulados por genes aditivos se distribuyan en una curva normal es simple: la probabilidad de que una persona reciba una cantidad N de genes que actúan en el mismo sentido, está dada por una distribución binomial, que cuando el número de genes es suficientemente grande (o es complementada por factores ambientales al azar) tiende a hacerse una distribución gaussiana.

Por otro lado, una distribución continua de la intensidad de un rasgo puede dar lugar a la aparición de un carácter discreto, como la presencia de enfermedad, cuando se traspasa un determinado "umbral" de intensidad; ese umbral separa la distribución en dos partes que han devenido en entidades distintas; por ejemplo, la distribución de la presión arterial en personas

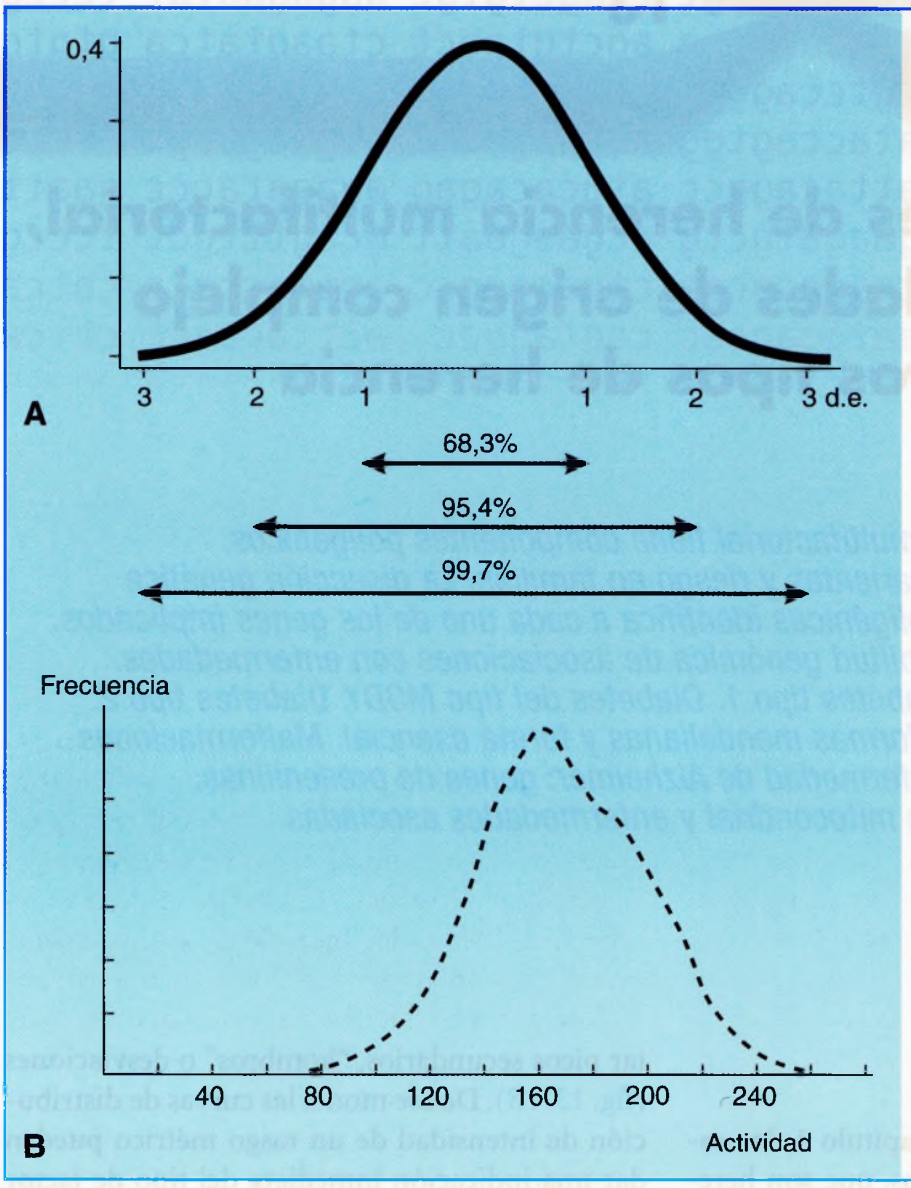


Fig. 13-1 **A.** Curva normal (de Gauss) a la cual corresponden las distribuciones de estaturas de adultos de un sexo y otros caracteres métricos; se señalan los límites que corresponden a una o más desviaciones estándar de la media de la distribución normal. **B.** Distribución no gaussiana, asimétrica, de la actividad de la fosfatasa ácida eritrocitaria en una población inglesa (H. Harris, The principles of human biochemical genetics, Amsterdam, 1970.)

normales y la distribución en personas hipertensas, en la cual el umbral es un valor medio de presión diastólica determinado.

La hipótesis de un umbral determinante de la aparición de una enfermedad discreta permite explicar un número de enfermedades importantes con componente genético no mendeliano y con factores ambientales superpuestos. Estas enfermedades "multifactoriales" también son analizables por los métodos de la Genética Molecular, que tratan de realizar una "disección" genética, demostrando uno por uno los genes concretos que intervienen en la producción de la enfermedad. Para que una enfermedad sea correctamente considerada "multifactorial", es necesario que su distribución tenga ciertas características (véase después), y siempre es posible en estas enfermedades que algún gen mayor tenga un papel más considerable que otros, por lo cual la disección genética reviste gran importancia.

La disección genética de las enfermedades multifactoriales y de otras enfermedades de origen complejo ha comenzado a suministrar la identidad de genes parcialmente responsables de enfermedades importantes, como la diabetes mellitus más común, la hipertensión arterial y la enfermedad de Alzheimer (véase más adelante)

La correlación entre parientes: crestas dérmicas

La incidencia en parientes tiene importancia en las enfermedades multifactoriales, como se verá después, por lo cual resulta útil disponer de

Cuadro 13-1. Coeficiente de correlación entre parientes, medido en el recuento total de crestas dérmicas[1]

Parentesco	Coeficiente medido	Coeficiente teórico
Padre/hijo	0,49 ± 0,04	0,50
Madre/hijo	0,48 ± 0,04	0,50
Hermano/hermano	0,50 ± 0,04	0,50
Gemelos monocigóticos	0,95 ± 0,01	1
Mellizos (dicigóticos)	0,49 ± 0,08	0,50
Esposos	0,05 ± 0,07	0

un índice de la similitud genética entre parientes normales. El índice más útil en este sentido es el coeficiente de correlación de un rasgo cuantitativo, tal como el recuento total de crestas dérmicas (véase cap. 2) Como se ha visto en el primer capítulo, el recuento de crestas es un carácter estrictamente cuantitativo (debido a varios genes que actúan aditivamente), inmodificable por la edad y los factores ambientales, que en cierta forma representa al genoma de un individuo. Cuando se compara un gran número de parejas formadas por pares de personas emparentadas del mismo modo (p. ej., padre e hijo), el recuen to de crestas dérmicas en cada miembro de la pareja permite inferir cuál es el grado de similitud genómica entre parientes (p. ej., el grado de simi litud de los genomas de los hijos respecto de los padres) Para ello se utiliza el "coeficiente de correlación" entre las medidas de padres y de hijos. De esta manera se ha medido la similitud genómica entre parientes (cuadro 13-1) Esta similitud medida se asemeja muy estrechamente a la similitud teórica que debería haber entre hijos y padres, por ejemplo: dado que el hijo recibe la mitad de los cromosomas del padre (el otro 50% proviene de la madre), la similitud teórica de sus genomas es el 50%, y la medición de crestas revela un coeficiente de correlación de 0,49, es decir, una similitud del 49%. Por consiguiente, los coeficientes de correlación del cuadro 13-1 pueden usarse como las medidas de similitud del genoma entre parientes de distinto grado.

Se debe recordar que estos coeficientes son medidas estadísticas y que los casos individuales pueden alejarse de estas cifras.

Hipótesis de la herencia multifactorial

Los especialistas en Genética Cuantitativa han considerado que algunas enfermedades están determinadas por múltiples genes y además por factores ambientales, de tal modo que pueden tratarse como un carácter métrico que, pasado un cierto umbral, provoca una disconti nuidad. la enfermedad. Los factores predisponentes a la enfermedad (genéticos y ambientales) han sido reunidos bajo el nombre de intensidad de compromiso (*liability*); es esta *intensidad de compromiso* la que en toda la población se distribuye como una curva normal, en cuyo ex tremo, luego de un umbral de compromiso, se encuentran los afectados por la enfermedad (fig. 13-2) [2,3]

Un ejemplo demostrativo de enfermedad multifactorial es el paladar hendido. Esta mal formación se debe a la falta de cierre de los procesos palatinos en la etapa embrionaria; dicho cierre se produce normalmente mediante una serie de pasos, que incluyen una reorientación de los procesos palatinos, su crecimiento hacia la línea media y su fusión, mientras simultáneamente se produce el crecimiento de la cabeza que puede interferir con el cierre. Se conocen varias sustancias (como los corticoides) que inducen la falta de cierre en animales de experi mentación, de tal modo que este cierre se halla expuesto a errores genéticos y a factores ambien tales que lo alteran. En la especie humana, la heredabilidad del paladar hendido completo (labio y paladar) se estima en alrededor del 70%,

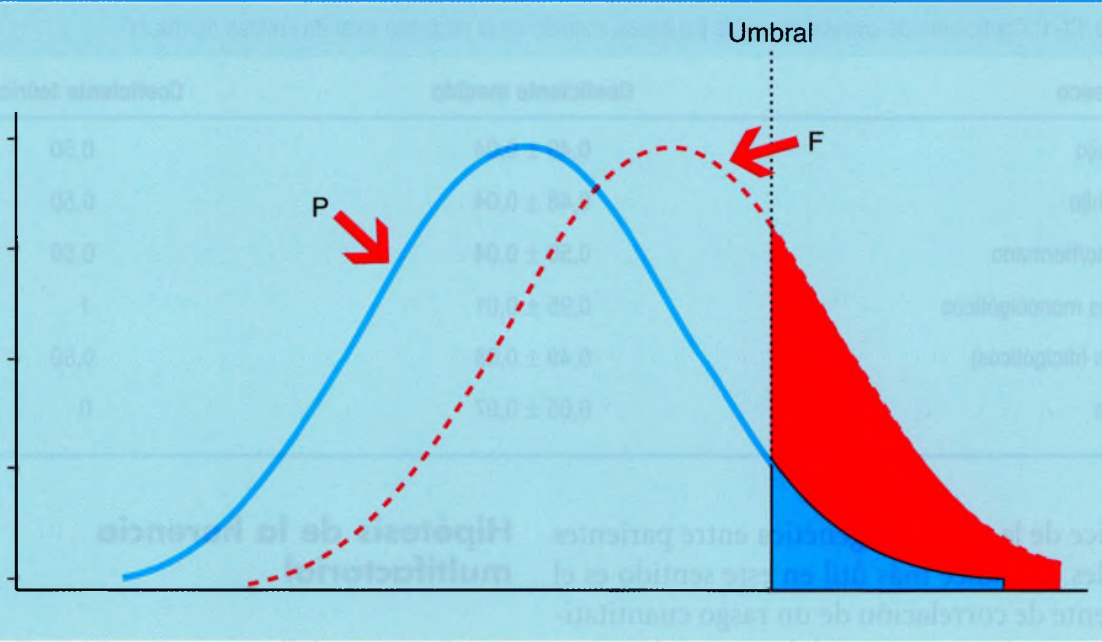


Fig. 13-2. Curva de la distribución de la intensidad de compromiso para una enfermedad multifactorial en una población, tal como el paladar hendido. Se señala el umbral a partir del cual se hallan los enfermos. P: población general; F: familiares.

pero la incidencia en hermanos de un afectado no pasa del 5%, lo cual muestra un tipo de herencia no mendeliano. Algunas de las características distintivas de este tipo de enfermedades se refieren a los riesgos de recurrencia en familiares de un afectado.

Características del riesgo para familiares de un afectado

Una de las características se refiere a la frecuencia relativa de recurrencia en un pariente de un afectado; esta frecuencia es mayor cuanto más rara es la enfermedad en la población general. Si en la población general la frecuencia de la enfermedad es F, la frecuencia de recurrencia en parientes de primer grado de un afectado es aproximadamente $\sqrt{F}$, y la relación entre recurrencia en parientes e incidencia en la población general ($\sqrt{F}/F$) se hace mayor cuanto menor es F, es decir, cuanto más rara es la enfermedad.

Una segunda característica de la recurrencia entre parientes está relacionada con el grado de severidad de la enfermedad. cuanto más grave es la enfermedad en el afectado, mayor es el riesgo de recurrencia en un pariente. Esto se debe a que al ser su base poligénica, a mayor gravedad le corresponde un mayor número de genes alterado, y por consiguiente, el pariente, que comparte un número de sus genes, tiene mayor riesgo que si la forma clínica es leve.

Una tercera característica es el incremento del riesgo estimado de recurrencia con el aumento del número de hermanos afectados; esto quiere decir que si un matrimonio tiene dos hijos afectados, el riesgo estimado de incidencia para un tercer hijo aumenta en vez de permanecer constante, a diferencia de lo que ocurre en la herencia mendeliana. Nuevamente, la explicación se basa en que la enfermedad es causada por un número de genes, y la estimación del número de genes afectados en los padres crece con el número de hijos afectados.

Por último, cuando la enfermedad tiene una incidencia diferencial entre los dos sexos, el riesgo de recurrencia es mayor cuando el sexo del probando (paciente) corresponde al sexo menos afectado en la población general. Esto se explica porque para haberse afectado una persona de ese sexo, se requiere, en teoría, un mayor número de

genes alterados, lo cual incrementa el riesgo en sus parientes.

Estas reglas tienen un valor relativo en la práctica, pero han servido para definir cuáles podrían ser las enfermedades multifactoriales. En la actualidad, la investigación de estas enfermedades se centra en identificar los genes responsables de la "intensidad de compromiso" definida con anterioridad.

Recientemente se ha logrado una comprobación experimental de que las reglas precedentemente descritas son aplicables a una enfermedad multifactorial típica. el paladar hendido y labio leporino.[4] En este estudio se analizaron 6.776 enfermos y 54.229 de sus parientes, para establecer con métodos estadísticos rigurosos el riesgo de incidencia entre parientes de los afectados. Se verificó que el riesgo de incidencia para parientes de primer grado era 3,5%, para parientes de segundo grado era sólo 0,8% (correspondiendo a una menor concentración de genes alterados), y si el defecto era muy severo (hendidura bilateral) los riesgos de recurrencia eran mayores en los hermanos y en los descendientes, con un riesgo de 4,6%, pero si el defecto era unilateral (más leve) el riesgo era menor· 2,5%.

Es probable que las enfermedades estrictamente poligénicas o multifactoriales sean sólo una parte de las actualmente consideradas como tales, y que los fenómenos de heterogeneidad genética y de factores ambientales poco conocidos simulen el carácter multifactorial en un número de casos. Las verdaderas enfermedades poligénicas deberían ser causadas por familias génicas, como las familias *HOX*, por lo cual su ámbito más probable es el de las malformaciones.

Los estudios de amplitud genómica de asociaciones de marcadores con enfermedades

En años recientes se ha producido un cambio de enfoque en el estudio de las enfermedades comunes de tipo multifactorial o de "origen complejo" Este cambio se ha debido a que los métodos clásicos usados para descubrir los genes alterados causantes de enfermedades monogénicas o mendelianas dieron muy escasos resultados cuando se aplicaron al estudio de las enfermedades comunes poligénicas.[5,6]

La aparición de métodos rápidos y eficaces para la secuenciación completa del genoma humano y la disponibilidad de herramientas apropiadas para el análisis de cantidades muy grandes de datos, permitieron la aparición de los así llamados "estudios de amplitud genómica de asociaciones con enfermedades" (Genome Wide Association Studies o GWAS en inglés)

Estos estudios genómicos, en vez de comenzar con la hipótesis de un gen candidato para la enfermedad, estudian la totalidad (o casi totalidad) de las variantes polimórficas de mononucleótidos, llamadas SNP (*single nucleotide polymorphisms*) o *snips* (como se pronuncia su denominación coloquial en inglés), que existen en el genoma de dos grupos, compuestos de varios miles o decenas de miles de individuos: el grupo que tiene la enfermedad y el grupo control, de individuos sanos. Hay aproximadamente diez millones de snips en el genoma humano y por definición son polimorfismos, es decir que las variaciones de cada uno de ellos se encuentran en al menos el 1% de los individuos en las poblaciones humanas.

En su expresión más sencilla, estos estudios analizan la frecuencia de ciertos snips en el grupo de enfermos y en el grupo control, y cuando se encuentra que la frecuencia de algunos snips en el grupo de enfermos excede (en un límite muy preciso) el de los presentes en el grupo control, se considera que dichos snips son sospechosos de ser un factor para la enfermedad, o más precisamente, que esos snips están muy cerca de un factor de la enfermedad, es decir, señala un *locus* de un factor de la enfermedad. Para determinar el nivel de significación estadística de esta diferencia se usan criterios muy estrictos: la probabilidad de que sea por azar es muy pequeña ($p < 5 \times 10^{-7}$) tal como fue determinada por varios autores.[6]

Los snips pueden estar localizados en cualquier sitio del genoma, en genes (exones o intrones) o en el espacio intergénico. Gran parte de estos snips no forman parte de genes, aunque se

ha sugerido que pueden corresponder a regiones reguladoras de la expresión de genes cercanos o lejanos, y de esa forma interferir con su función.

Los snips que estén formando parte de genes pueden corresponder a mutaciones de sustitución de un nucleótido que ya eran conocidas para enfermedades monogénicas. Sin embargo, la utilidad de los estudios de amplitud genómica (GWAS) está radicada en las enfermedades comunes y frecuentes; es muy difícil aplicar este tipo de estudio a las enfermedades monogénicas debido a su baja frecuencia mutacional (generalmente inferior a 1×10^{-5}) Las ventajas del método GWAS son. no requieren una hipótesis previa, los datos pueden ser utilizados para otras búsquedas futuras; permite descartar asociaciones espurias; provee datos de origen ancestral de los individuos; aporta detalles de secuencias y de "variación en número de copias" (CNV), y facilita la verificación de vías bioquímicas patogenéticas. Sus desventajas y las precauciones para tener en cuenta son. sólo descubren alelos relativamente comunes (> 5%) y con efectos importantes; tienen poco valor predictivo; requieren gran número de muestras de afectados y controles (del orden de decenas de miles), utilizan "chips" de 100.000 o más SNP; lo que se ubica son loci y no genes, y requieren realizar réplicas en otros grandes grupos poblacionales, para verificar la validez de los datos.[5]

Estos estudios, aunque en 2009 aún estaban en su infancia, proveen grandes cantidades de datos sobre genes de susceptibilidad a ciertas enfermedades comunes, entre las que se citan las diversas formas de diabetes, la obesidad patológica, la degeneración macular retiniana) de la edad madura, la enfermedad de Crohn, el cáncer de próstata, el infarto de miocardio y la hipertensión arterial.[6] Los efectos adversos de algunos medicamentos se basan muchas veces en un componente genético propio del paciente. Este hecho da lugar a un campo, el de la "Farmacogenética" que está progresando rápidamente mediante los estudios genómicos, los cuales permitirían predecir si el paciente reaccionará en forma anormal a ciertas medicinas, de tal forma que se anticipa que este campo será el micio de una práctica médica personalizada.

"Disección genética" en la diabetes mellitus

La diabetes mellitus (o azucarada, para distinguirla de la diabetes insípida, de diferente origen), es un grupo muy heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por la elevación del nivel de la glucosa sanguínea y un conjunto de alteraciones metabólicas acompañadas de un progresivo deterioro de funciones en diversos órganos y sistemas, incluido el sistema cardiovascular, el nervioso, el renal y la retina.

Habitualmente se distinguen en la diabetes dos tipos principales y fenotípicamente diferentes: la diabetes tipo 1, de sigla DM1 (antes denominada insulinodependiente o infantojuvenil), y la del tipo 2, de sigla DM2 (no insulinodependiente o del adulto) Desde hace varios años a estos dos grupos debe añadirse al menos un tercer tipo, llamado MODY (diabetes de tipo adulto de comienzo en juventud, del inglés: *m*aturity *o*nset *d*iabetes of the *y*oung) Desde el punto de vista genético, los tipos 1 y 2 se tratan como de herencia multifactorial y poligénica, pero el tipo MODY es distinto puesto que es transmitido en forma mendeliana dominante. Se analizarán aquí conjuntamente todas ellas aun cuando la forma MODY no es poligénica.

La frecuencia poblacional y los riesgos de recurrencia en hermanos se expresan en el cuadro 13-2.

Aparte de los tres tipos generales de diabetes mencionados (tipos 1, 2 y MODY) debe advertirse que existen otros tipos de casos y síndromes hereditarios que tienen a la diabetes como una parte de sus manifestaciones. Por consiguiente, un listado de diabetes por enfermedades monogénicas incluye: los seis MODY (véase más adelante) y varios síndromes adicionales de mucho menor frecuencia.

Diabetes tipo 1

La DM1 es una enfermedad de origen inmunológico que afecta a niños y jóvenes y que da

Cuadro 13-2. Frecuencia de los dos tipos principales de diabetes y sus riesgos de recurrencia en parientes. (De Florez JC, et al.[7])

	Incidencia en población	Riesgo de recurrencia en hermano	Riesgo de recurrencia en gemelo
DM1	0,4%	6%	21 70%
DM2	7%	30-40%	63%

por resultado la destrucción de las células beta de los islotes pacreáticos. Esta enfermedad comienza a manifestarse en la niñez o juventud, en general antes de la edad de 20 años. Sus "picos" de incidencia suelen coincidir con los períodos de crecimiento (primeros años de vida) o con el desarrollo sexual puberal.

Este tipo de diabetes es básicamente una enfermedad autoinmunitaria, y su característica distintiva es la presencia de anticuerpos específicos contra componentes de sus propias células de los islotes de Langerhans. Los principales autoanticuerpos que se desarrollan en la DM1 y que sirven para su diagnóstico de laboratorio son. 1) el anticuerpo contra la descarboxilasa del ácido glutámico, GADA, una enzima importante para la función de las células beta (se utiliza específicamente el dosaje del autoanticuerpo contra la isoforma de esta proteína, la GAD 65), 2) el anticuerpo contra el antígeno citoplasmático de los islotes (ICA 512, de inglés *islet cell antigen* 512), que se une a una proteína (IA-2) importante en el transporte intracelular de los gránulos de secreción de la célula beta y 3) el anticuerpo antiinsulina (IA) La presencia de estos anticuerpos en los pacientes es predictiva del desarrollo de la enfermedad, y a estos anticuerpos se les atribuye la paulatina destrucción de las células beta (productoras de la insulina) de los islotes pancreáticos.

En una alta proporción de los pacientes existe una asociación de la diabetes DM1 con determinados alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH, grupo II, localizado en el cromosoma 6p21 más específicamente el DQβ 0302 (asociado a DR4) y el DQβ 0201 (asociado a DR3) Por el contrario, en la población en general estos alelos están en una proporción mucho más baja.[8] Es decir, existe un condicionamiento para el desarrollo de la DM1 dado en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, que se presenta en al menos el 50% de los pacientes.

Un 10% de los casos de DM1 están relacionados con un polimorfismo del minisatélite de ADN (repetición en tándem de un oligonucleótido de 14 bases, y rotulado como factor IDDM2 predisponente a la diabetes DM1) ubicado en la región proximal (hacia 5') del gen de la insulina en el cromosoma 11p15 (fig.13-3)

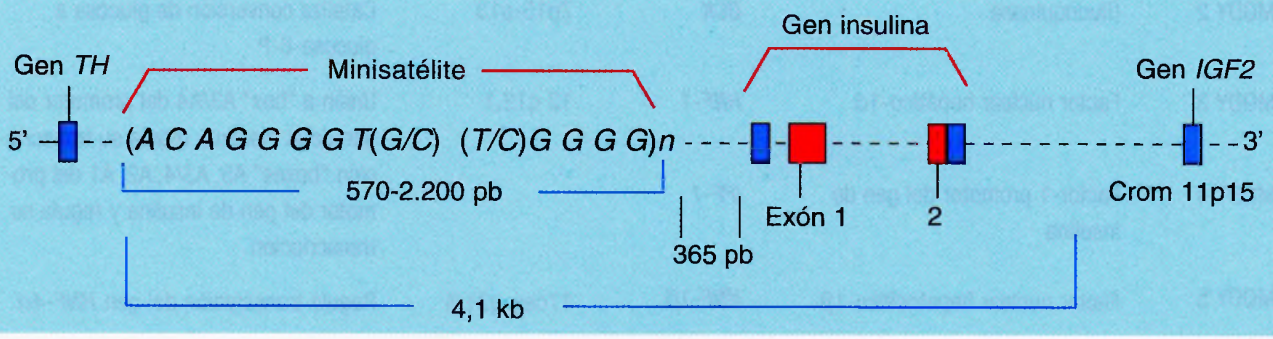


Fig. 13-3. Ubicación del minisatélite regulador del gen de la insulina, identificado como el factor IDDM2 de susceptibilidad a la diabetes 1 TH: final del gen de la tirosinahidroxilasa; IGF2: comienzo del gen del factor de crecimiento seudoinsulínico. El sector de 4,1 kb comprende el gen de la insulina y la región previa que contiene el minisatélite regulador.

En la literatura se mencionan varios alelos polimórficos más asociados al desarrollo de la DM1, rotulados con los números IDDM 3 al 17;[9] adicionalmente un estudio reciente de asociación genómica halló más de 40 loci alélicos, incluidos algunos para la codificación de las citocinas inmunorreguladoras *IL10*, *IL19*, *IL20*, *IL27*, y otro para la codificación del inmunorregulador CD69 En consecuencia, la DM1 se ajusta al modelo de una enfermedad multifactorial, en la que hay múltiples genes de susceptibilidad al desarrollo de una reacción autoinmunitaria contra las células productoras de insulina.

En el estudio de gemelos monocigóticos se observó una concordancia de 50% en presentar ambos diabetes tipo 1 Sin embargo, esta concordancia se hace mayor aún a la edad de 60 años (la concordancia fue del 65%) y, si se incluía la presencia de anticuerpos específicos en forma persistente, se llegaba a una concordancia de 78%; es decir, la presencia de factores genéticos es mucho más prevalente que la de los ambientales. El hallazgo, entre los parientes de pacientes con DM1, de la presencia de dos o más anticuerpos característicos (GAD, ICA ó IA) tiene un valor predictivo para el desarrollo de la DM1, mayor de 90%.

No obstante las evidencias fuertes de un factor genético predisponente para la DM1, también se han realizado estudios sobre factores ambientales y se halló cierta evidencia para un efecto de infecciones enterovirales y parotiditis viral que facilitaría el desarrollo de la DM1.

Otras alteraciones autoinmunitarias acompañan con frecuencia la presencia de la diabetes tipo 1 la tiroiditis autoinmunitaria de Hashimoto), la enfermedad de Addison (insuficiencia corticosuprarrenal) autoinmunitaria, el vitiligo, la anemia perniciosa y la enfermedad celíaca.[10] Estos síndromes han sido llamados "síndromes autoinmunitarios poliendocrinos" y se han distinguido sobre todo 2. el tipo I (APC-I, autosómico recesivo y raro, con diabetes tipo 1 en el 20%), y el tipo II o síndrome de Schmidt, más frecuente y muy variado en su presentación.

Diabetes del tipo adulto de comienzo en juventud (MODY): diabetes monogénico

Éste es un grupo de diabetes monogénicas, autosómicas dominantes, de pronóstico relativamente benigno y cuyo defecto primario es una disfunción de la célula beta del páncreas debida a una mutación de uno de seis genes identificados (cuadro 13-3

Cuadro 13-3. Formas de diabetes MODY [12]

MODY	Proteína mutada	Gen	Locus	Función en la célula β
MODY 1	Factor nuclear hepático-4α	*HNF-4α*	20q12-q13,1	Unión a *HNF-4α* y al promotor de *IPF-1*· regula su transcripción
MODY 2	Glucoquinasa	*GCK*	7p15-p13	Cataliza conversión de glucosa a glucosa-6-P
MODY 3	Factor nuclear hepático-1α	*HNF-1*	12 q12,1	Unión a "box" A3/A4 del promotor del gen de la insulina; regula su transcripción "boxes" A5, A3/4, A2, A1 del promotor del gen de insulina y regula su transcripción
MODY 4	Factor-1 promotor del gen de insulina	*IPF-1*		
MODY 5	Factor nuclear hepatocítico-1β	*HNF-1β*	17cen-q21,3	Regula transcipción del gen *HNF-4α*
MODY 6	Neuro Fact.. 1/transactivador 2	*NEUROD1/ BETA2*	2q32	Regula la función de célula beta al unirse al "box" E2 de su promotor

Este grupo de alteraciones metabólicas se caracteriza por el cuadro de casos repetidos familiares, con un patrón de herencia dominante y alta penetrancia, aunque se admite una cierta influencia de factores ambientales. Su comienzo suele producirse antes de los 25 años, y suelen responder a tratamientos dietéticos y medicamentosos sin necesidad de usar insulina. Aunque tienen poca tendencia a cetoacidosis, se han descrito las complicaciones crónicas microvasculares y macrovasculares que afectan el sistema nervioso, la retina, el sistema cardiovascular y los riñones. El subtipo más frecuente es el tipo 3, seguido por el tipo 2.

Los genes involucrados corresponden a *factores de transcripción*, reguladores de la función de la célula β, del páncreas, en cinco de las seis variantes MODY; la Nº 2 codifica la enzima glucoquinasa.[11]

El tipo MODY es responsable de un 1 a un 5% de todos los pacientes diabéticos.[12] En los años recientes se han descrito otros posibles tipos de MODY adicionales; sin embargo, su inclusión definitiva en este grupo MODY aún no está aceptada.

La patogenia de la diabetes tipo MODY se explica porque los cinco factores de transcripción involucrados en los MODY, así como la enzima glucoquinasa (MODY 2), intervienen activamente en la función de la célula beta, y una mutación en esos genes altera esa función. La mayoría de esos mismos factores de transcripción se expresan en el hígado (donde fueron descubiertos y de ahí sus nombres), pero en las células beta se cree que regulan la expresión del gen de la insulina. La intervención del gen de la glucoquinasa es la más estudiada (fig. 13-4) Se han encontrado más de 130 mutaciones del gen de la glucoquinasa asociadas al tipo MODY 2.[12] Es importante señalar que un 50% de las mujeres portadoras de estas mutaciones del gen de la glucoquinasa pueden tener la complicación del embarazo conocida como "diabetes gestacional" En la patogenia de este síndrome MODY 2 se ha sugerido que hay una reducción de la sensibilidad de las células beta para el nivel de glucosa y un defecto de síntesis de glucógeno en el hepatocito, que operan conjuntamente para elevar el nivel de glucemia, aunque en forma que puede ser compensada por el organismo.[12]

Análisis genético en la diabetes tipo 2

La diabetes del tipo 2 es la forma más frecuente en la población. Su frecuencia ha ido en aumento constante y actualmente se acerca al 10% en algunos países. La DM2 comienza habitualmente después de los 20 años de edad, tiene un desarrollo gradual y frecuentemente asociación con sobrepeso u obesidad, con la resistencia a la insulina y poca tendencia a presentar cetoacidosis. La DM2 puede presentar un conjunto de signos a los que se ha propuesto llamar "síndrome metabólico", aunque su definición no está universalmente aceptada. Los signos de este síndrome son la obesidad y la resistencia a la insulina, la hipertensión arterial, la hiperlipoproteinemia y la hiperisulinemia. Las complicaciones a largo plazo son similares a las microvasculares de la DM1 (retinopatía, nefropatía) y la neuropatía; además se agregan las complicaciones macrovasculares (en las arterias coronarias, carótidas y sus ramas, y las de los miembros inferiores)

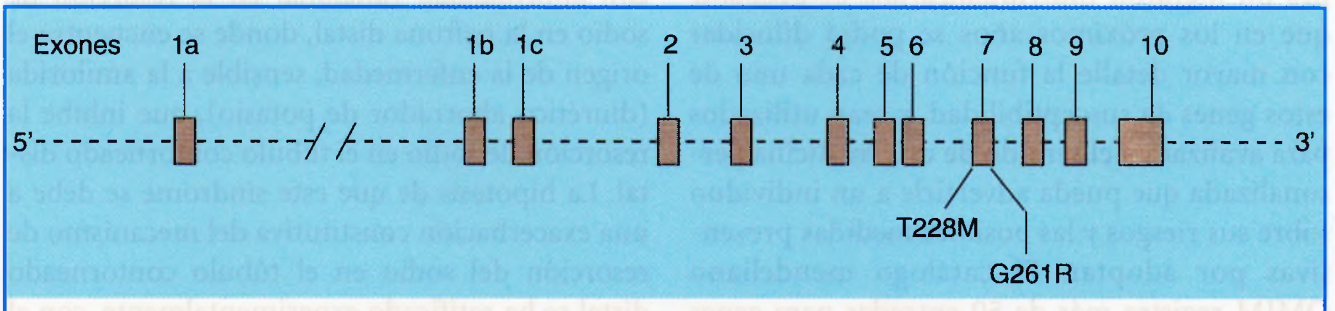


Fig. 13-4. Esquema del gen de la glucoquinasa humana (GCK) y algunas de sus mutaciones.

La aplicación de los métodos clásicos para la búsqueda de alelos de susceptibilidad a esta enfermedad de tipo poligénico, en la cual cada alelo tiene un efecto (aditivo) relativamente pequeño, resultó muy poco útil. Fue sólo desde que el Proyecto Genoma Humano (véase cap. 1) permitió que se accediera a los polimorfismos de mononucleótidos (SNP) en las bases de datos públicas, cuando se comenzaron a realizar los estudios de asociación genómicos amplios (véase apartado anterior) y en los recientes años han aportado datos de interés. La diabetes tipo 2 fue una de las alteraciones más intensamente analizadas, tanto por la importancia clínica de la enfermedad en sí, como por su frecuencia y sus complicaciones graves. Luego de haberse hallado un gen con elevada probabilidad de ser uno de los genes buscados, en el año 2000 (*PPARG*, del inglés *peroxisome proliferative activated receptor* receptor gamma de activadores de proliferación de peroxisomas y uno más en 2003 (*KCNJ11* canal de potasio, elemento 11 de la familia J), fue justamente a partir de 2006 cuando se han detectado varios genes más, que en la actualidad suman un total de 17 [13] Sin embargo, uno solo (el *TCF7L. factor de transcripción símil del 7, número 2*, alelo T) posee un efecto considerable por sí solo; los demás 16 son de menor efecto. Esto significa que hasta ahora, en todos estos estudios, se ha logrado explicar apenas un 5-10% aproximadamente de la base genética de la diabetes tipo 2. Sin duda existen muchos más genes cuyos alelos de susceptibilidad tienen un efecto aislado aún menor que los ya descubiertos; o bien existen algunos alelos de efecto elevado pero poco frecuentes, por lo cual estos estudios en grandes poblaciones no lograron individualizarlos. Es probable que en los próximos años se podrá dilucidar con mayor detalle la función de cada uno de estos genes de susceptibilidad, y sean utilizados para avanzar en el sentido de una medicina personalizada que pueda advertirle a un individuo sobre sus riesgos y las posibles medidas preventivas por adoptar El catálogo mendeliano OMIM registra más de 50 entradas para genes posiblemente relacionados con la diabetes tipo 2 (OMIM #125853)

Disección genética de la hipertensión esencial

La hipertensión arterial afecta a alrededor del 20% de la población adulta en los países industrializados. El primer problema es la gran heterogeneidad de causas, tanto genéticas como ambientales, que conducen a este cuadro y que llevan, en primer lugar, a distinguir las hipertensiones secundarias a otro problema originario, de las hipertensiones primarias.[14] Así, las hipertensiones derivadas de un feocromocitoma o de un síndrome de Cushing, son evidentemente secundarias a una patología seria y concreta, la secreción de catecolaminas del feocromocitoma o la hipersecreción de aldosterona, desde el punto de vista de la genética, deben ser claramente separadas de la hipertensión primaria o esencial. A su vez, en la hipertensión esencial por lo general intervienen varias causas, de tipo genético y ambiental, incluidas las predisposiciones genéticas a otras patologías, como la diabetes y la obesidad, que repercuten favoreciendo la hipertensión. Dentro de la genética de la hipertensión esencial se distinguen algunos tipos minoritarios de hipertensión con un cuadro *mendeliano*; por otro lado, la mayor parte de los casos son de características *multifactoriales.*

Hipertensión mendeliana: síndrome de Liddle (panel 13-1)

Este síndrome se hereda con características de autosómico dominante. El síndrome de Liddle (o seudoaldosteronismo) muestra hipertensión severa con hipopotasemia, bajo nivel de aldosterona y nivel nulo de renina plasmática, con anormalidad funcional en la resorción de sodio en la nefrona distal, donde se encuentra el origen de la enfermedad, sensible a la amilorida (diurético ahorrador de potasio), que inhibe la resorción de sodio en el túbulo contorneado distal. La hipótesis de que este síndrome se debe a una exacerbación constitutiva del mecanismo de resorción del sodio en el túbulo contorneado distal se ha ratificado experimentalmente, con el análisis del gen del canal de sodio del epitelio tubular, denominado subunidad β del canal epi

Panel 13-1. El defecto en el síndrome de Liddle: el canal epitelial de sodio anormal en el túbulo contorneado distal

A pesar de que este síndrome representa una forma poco frecuente de hipertensión, los rápidos adelantos en el conocimiento de sus mecanismos genéticos esclarecen varios aspectos generales de la hipertensión. Esta hipertensión es de origen renal y, más específicamente, se debe a defectos genéticos del canal epitelial de sodio, que afectan ya sea la subunidad α o la subunidad β, como ha sido demostrado.[15] Este canal de la membrana de las células epiteliales del túbulo contorneado distal consta de tres subunidades de estructura similar, la α, la β y la γ (fig. 1). Cada subunidad es una proteína codificada por genes diferentes, aunque similares, que forman parte de una familia génica. Estas proteínas tienen dos porciones intramembranosas, una región intersticial extracelular y sus extremos amino y carboxilo son intracitoplasmáticos. Justamente, las mutaciones que afectan la región cercana al extremo carboxilo, especialmente las que dejan trunco este extremo, provocan la actividad permanente de estos canales, con incapacidad de la célula para removerlos de la membrana, por lo cual se incrementa de manera constante la resorción del catión sodio y esto determina el aumento de la volemia y la hipertensión.[16,17] Por otra parte, mutaciones en las subunidades α o β, pero en otra región muy distinta, cerca del extremo amino, causan un síndrome opuesto, de hipotensión congénita, hereditaria y recesiva, el seudohipoaldosteronismo de tipo "I".[16] Otro tipo mendeliano de hipertensión, el aldosteronismo remediable por glucocorticoides (autosómico dominante) también ha sido esclarecido.[16]

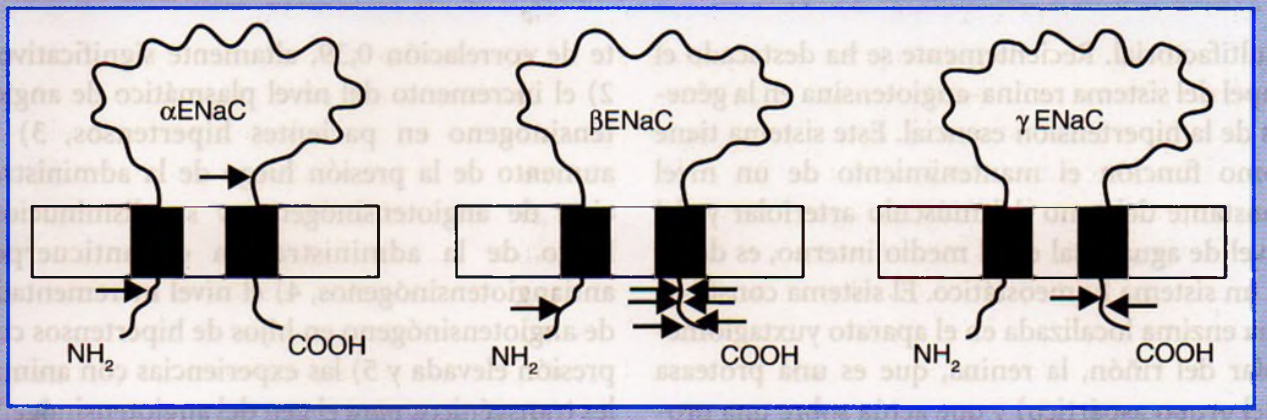


Fig. 1. Subunidades α, β y γ del canal epitelial de sodio del túbulo contorneado distal (ENaC). Las flechas señalan la ubicación de los defectos en el síndrome de Liddle.

telial de sodio ("βENaC").[15] Este gen está localizado en el cromosoma 16p. En los enfermos de este síndrome se encontró en el codón para arginina-564 una mutación C → T que introduce un codón de terminación en este lugar, por lo cual se pierden los últimos 75 aminoácidos de la proteína del canal, determinando la desaparición de la cola carboxilada citoplasmática de la proteína; también se encontraron otras mutaciones de esta proteína en otros pacientes con el síndrome.

La característica común de todas estas mutaciones es la de afectar la parte terminal de la subunidad β del canal, por lo cual se ha sugerido que dicha porción de la proteína es reguladora del canal. También se ha sugerido que este tipo de mutaciones puede ser frecuente en hipertensiones secundarias.[15]

Hipertensión esencial. Papel del gen del angiotensinógeno

La hipertensión primaria o esencial comprende alrededor del 95% de los pacientes con hipertensión y se cataloga como una enfermedad

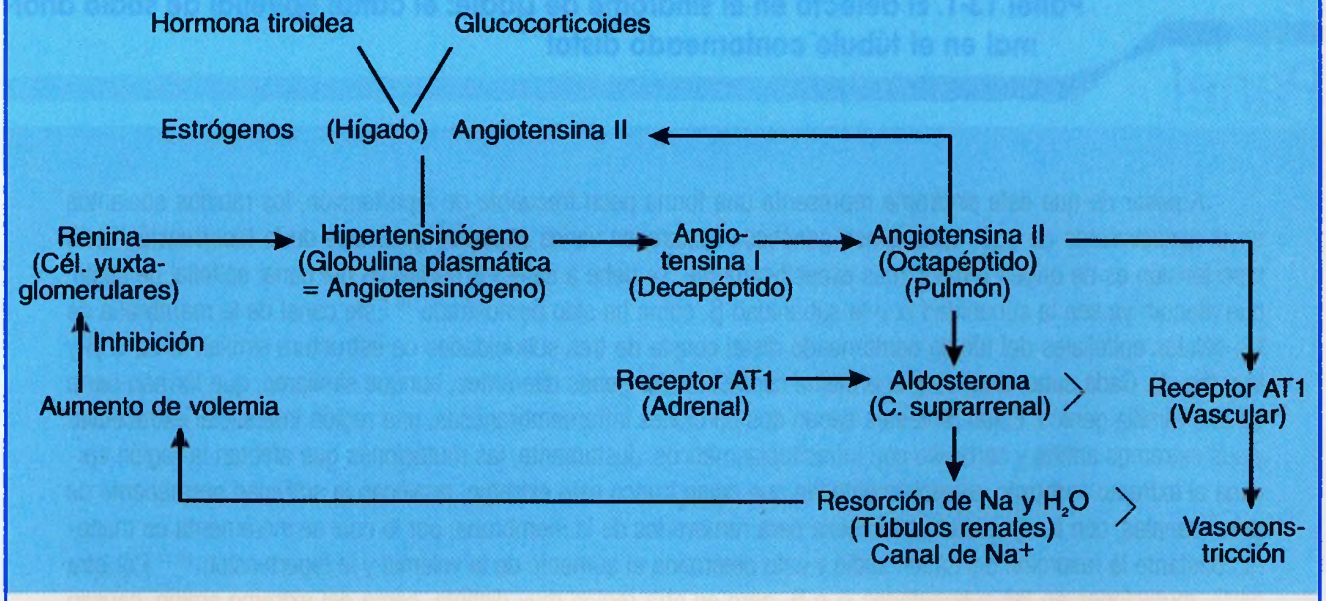


Fig. 13-5. Esquema del sistema renina-angiotensina de homeostasis del tono vascular y del nivel de agua y sal. Hipertensinógeno = angiotensinógeno.

multifactorial. Recientemente se ha destacado el papel del sistema renina-angiotensina en la génesis de la hipertensión esencial. Este sistema tiene como función el mantenimiento de un nivel constante del tono del músculo arteriolar y del nivel de agua y sal en el medio interno, es decir, es un sistema homeostático. El sistema consta de una enzima localizada en el aparato yuxtaglomerular del riñón, la renina, que es una proteasa (del grupo aspártico) y que actúa sobre una proteína plasmática, el angiotensinógeno, el cual es sintetizado en el hígado bajo el control de estrógenos, glucocorticoides, hormona tiroidea y angiotensina II. La renina corta el segmento aminoterminal del angiotensinógeno, produciendo la prohormona angiotensina I (decapéptido), la cual es convertida en la sustancia activa, la angiotensina II (octapéptido), por una dipeptidil-carboxipeptidasa (fig. 13-5).

El factor limitante en el sistema renina-angiotensina es la tasa de corte del angiotensinógeno por la renina, de modo que una alteración de esta tasa puede afectar el sistema entero. Hay una serie de argumentos que apoyan la idea de una relación entre este sistema y la hipertensión esencial: 1) la relación entre el nivel sanguíneo de angiotensinógeno y la presión arterial (coeficiente de correlación 0,39, altamente significativo), 2) el incremento del nivel plasmático de angiotensinógeno en pacientes hipertensos, 3) el aumento de la presión luego de la administración de angiotensinógeno, y su disminución, luego de la administración de anticuerpos antiangiotensinógenos, 4) el nivel incrementado de angiotensinógeno en hijos de hipertensos con presión elevada y 5) las experiencias con animales transgénicos para el gen del angiotensinógeno (*AGT*), que muestran que una superexpresión del gen se acompaña de elevación de la presión. En un estudio reciente se ha constatado el ligamiento (o correlación) entre el gen del angiotensinógeno y ciertas mutaciones suyas, y la hipertensión esencial.[18]

El gen del angiotensinógeno (*AGT*) consta de cinco exones y está precedido por una región reguladora compleja, en la cual se han localizado como mínimo 13 regiones de reconocimiento para proteínas o factores de transcripción (fig. 13-6).[18,19]

Luego de examinar un grupo de 379 pares de pacientes, se pudo afirmar un ligamiento entre la región del gen *AGT* y la hipertensión esencial. Entre los pacientes se distinguieron dos mutaciones (M235T y T174M) que mostra-

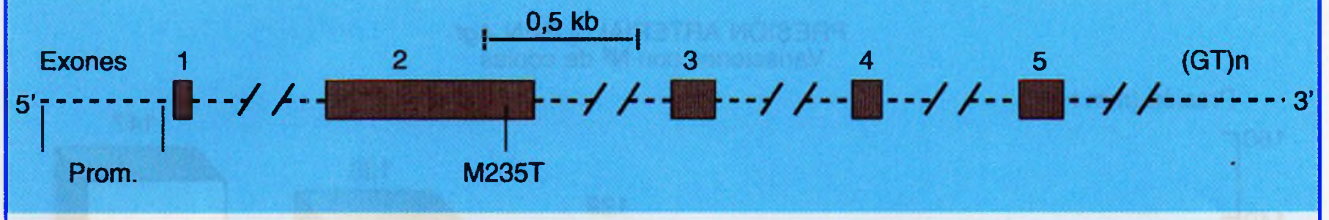


Fig. 13-6. Esquema del gen del angiotensinógeno humano (*AGT*). Prom: región promotora compleja, con 13 sitios de reconocimiento; M235T: variante mutacional ligada a hipertensión; (GT)n: repetición de dinucleótido.

ron una asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de hipertensión. Más concretamente, los pacientes con la mutación M235T tienen cantidades incrementadas de angiotensinógeno en plasma, y es concebible que un aumento de la línea basal del angiotensinógeno pueda llevar a una hiperactividad de todo el sistema renina-angiotensina. Se postula que este aumento del nivel plasmático en las personas con la mutación M235T puede deberse a un aumento en su producción o a una modificación de la tasa de reacción con la renina, por la cual el sustrato continúa más tiempo en circulación. En cualquiera de los casos, se modifica el sistema y existe la posibilidad de que la línea de base de la homeostasis se altere permanentemente y lleve a una hiperactividad de todo el sistema.

Esta hipótesis está apoyada por experiencias con ratones, en los cuales se ha modificado el número de genes de angiotensinógeno normal del ratón (*Agt*), sin modificar su localización normal, mediante duplicaciones en tándem.[20] Los niveles plasmáticos de angiotensinógeno se incrementan progresivamente con el número de copias del gen, hasta un 145% por encima del nivel normal en los ratones que tienen cuatro copias del gen. En estos mismos ratones, la presión arterial aumenta casi linealmente, 8 mm Hg por cada copia excedente del gen *Agt* (fig. 13-7).

Otras experiencias de anulación experimental de genes apoyan la idea de que las alteraciones del sistema renina-angiotensina son importantes en la hipertensión esencial; los niveles plasmáticos de renina se acomodan automáticamente a un incremento del 150% cuando se elimina uno de los genes *Agt*.[21]

Recientemente se han realizado estudios de amplitud genómica (GWAS) sobre la hipertensión esencial. Un estudio (Levy D, et al.[22]) halló asociación de 10 loci con hipertensión; pero sólo dos de estos loci coinciden con los hallados en estudios anteriores. La asociación de mayor efecto sobre la presión arterial en este estudio, es con el gen *ATP2B1*, de una ATPasa del tipo Ca^{++}/calmodulina que es activa en el endotelio vascular y confiere un 17% de aumento del riesgo de hipertensión en heterocigosis y 37% en homocigosis. Los autores estiman que los genes involucrados en la hipertensión arterial esencial poligénica (multifactorial) podrían contarse por decenas.

Además de estos estudios del tipo genómico amplio, hay algunos informes recientes que apuntan a alelos de marcadores específicos que podrían contribuir a la susceptibilidad a la hipertensión. Newhouse et al. [23] han estudiado el gen *WNK1*, con locus en 12p13 y que codifica una serina/treonina quinasa, y cuyo alelo A del SNP marcador ubicado en su intrón 1 muestra un efecto en el aumento de la presión sistólica de 3,14 mm Hg y sobre la diastólica de 1,9 mm Hg. En otro estudio hecho por Wang y cols.,[24] el gen involucrado es de otra serina/treonina quinasa, *STK1*, con locus en el cromosoma 2, estudiado en la población endocriada de los amish y en otros grupos poblacionales. Los alelos de mayor riesgo hipertensivo tenían frecuencias en la población de > 0,09 y se asociaban con incrementos tensionales de 3,3/1,3 mm Hg en presión sistólica y diastólica, respectivamente. Ambas serina/treonina quinasas interactúan a nivel celular en el organismo. Un tercer estudio[25] halló una asociación con un SNP ubicado en dirección

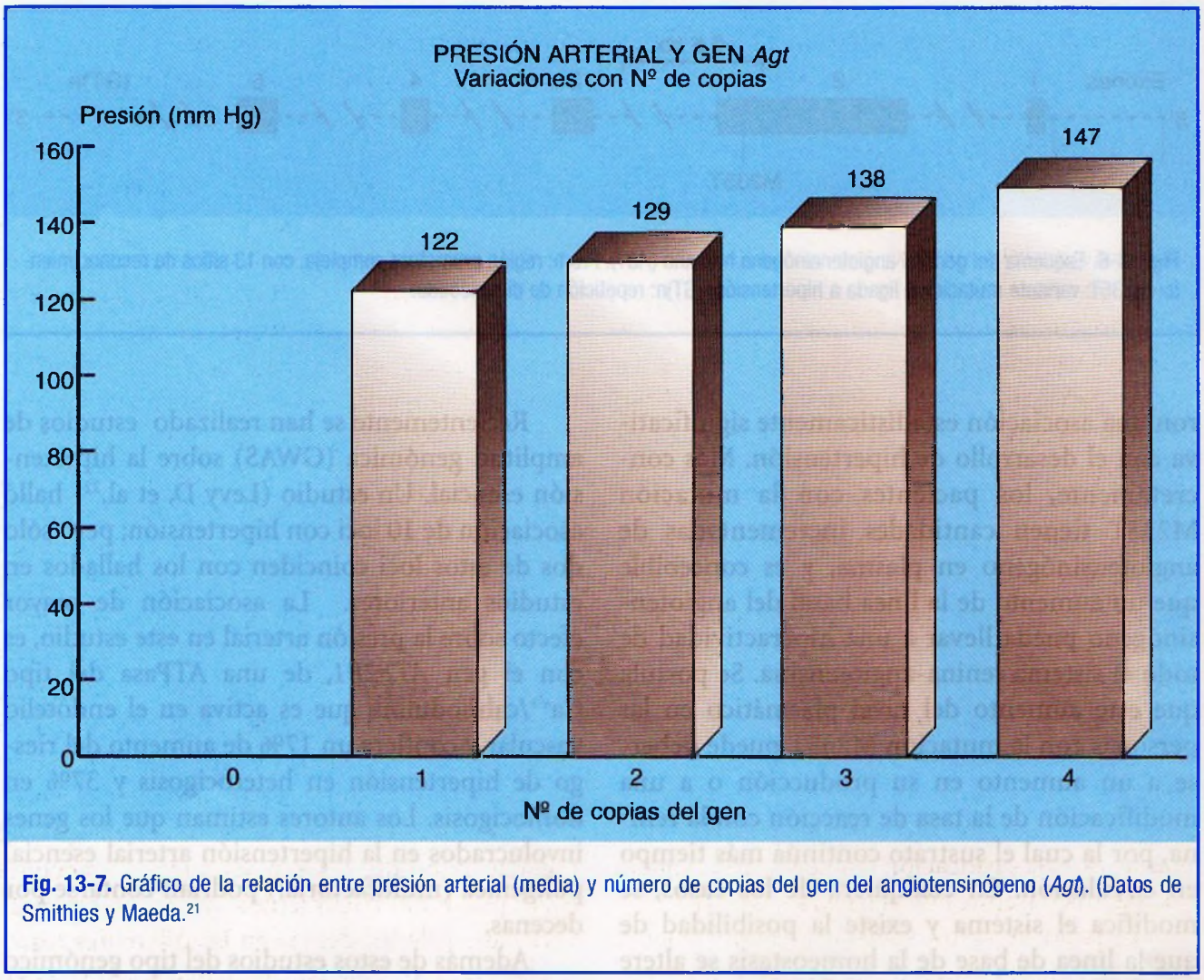


Fig. 13-7. Gráfico de la relación entre presión arterial (media) y número de copias del gen del angiotensinógeno (*Agt*). (Datos de Smithies y Maeda.[21]

a 5' del gen *CDH13*, con locus en 16q23,3. La proteína es una glucoproteína adhesiva, T-cadherina, reguladora de remodelado de la pared vascular y angiogénesis.

Las malformaciones congénitas como enfermedades multifactoriales

En este grupo de enfermedades, la disección genética no ha avanzado tanto como en la hipertensión o la diabetes a causa de dificultades metodológicas, dado que la investigación del mecanismo de las malformaciones humanas es difícil por el momento en que ocurre su determinación y por la complejidad de los factores involucrados. Sin embargo, es posible separar las malformaciones en dos grupos: a) aquellas en las cuales el factor genético no es claramente el prevaleciente y, si lo es, no es claramente poligénico o multifactorial, sino que encubre heterogeneidad de causas, y b) aquellas malformaciones en las que hay una alta probabilidad de factor genético importante y de tipo multifactorial. Como ejemplo del primer grupo tenemos los *defectos de cierre del tubo neural*, grupo que comprende desde las anencefalias (falta de desarrollo del cerebro y cubiertas, incluida la piel) hasta defectos leves de la columna vertebral, con espina bífida o sin ella (defecto de cierre del canal vertebral o sus cubiertas).

Las razones que sugieren la ausencia de herencia poligénica en los defectos de cierre son: 1) variaciones notables en la incidencia de anencefalia según la localización geográfica;[26] esta variabilidad tiene una amplitud de hasta 10 veces, de modo que no hay una incidencia media relevante (a pesar de ello, se menciona una incidencia media de 3 por 1.000 nacimientos); 2) hay

indicios de correlación entre la incidencia de anencefalia y pobreza o desnutrición, lo cual sugiere la importancia de factores ambientales; 3) hay correlaciones temporales, primero, de estacionalidad e incidencia; y segundo, de una lenta declinación de la incidencia en el último medio siglo; esto sugiere nuevamente la importancia de factores ambientales y no genéticos, que son mucho más constantes en períodos tan cortos; 4) el efecto protector de suplementos dietéticos con ácido fólico sugiere un defecto dietario; 5) la proporción de sexos, si bien está desviada hacia un exceso de pacientes mujeres, no está muy alterada, como es característico en los defectos genéticos. Finalmente, es razonable esperar que si hubiera un factor poligénico determinante de tan graves anomalías, tendería a ser eliminado por la selección natural y sólo se verían casos esporádicos raros, lo cual no ocurre con los defectos de cierre del tubo neural.

En el segundo grupo (factor poligénico probable) se encuentran el paladar hendido con labio leporino o sin él, la estenosis pilórica, el pie equinovaro, la dislocación congénita de la cadera y la necrosis aséptica de la cabeza femoral.

El labio leporino solo (LL) o con paladar hendido (LL/PH) aparece en un número grande de anomalías congénitas múltiples (más de un centenar de síndromes); una de las más características es la trisomía del cromosoma 13 (síndrome de Patau; véase cap. 17), en la que el 70% de los pacientes presentan LL/PH. Cuando el paladar hendido forma parte de un síndrome, el riesgo de recurrencia y la etiología u origen son muy distintos que cuando es una malformación aislada; el riesgo de recurrencia para hermanos en caso de haber malformaciones múltiples es menor (2%) que cuando ocurre aisladamente (4%). El proceso de cierre del paladar primario y el del secundario parecen ser afectados por muchos otros desequilibrios durante el desarrollo embrionario. Los estudios de recurrencia en familiares de pacientes han mostrado ser compatibles con un origen que reconoce la acción de unos pocos genes (cuatro), sin descartar que alguno de ellos pueda tener efectos mayores que los otros. Este modelo oligogénico con un posible "gen mayor" incluye también factores ambientales, de modo que se corresponde con el modelo multifactorial.[3] Entre otros, se ha señalado el uso de drogas antiepilépticas, del tipo de las fenilhidantoínas, como un factor que incrementa el riesgo de PH. El labio leporino, con PH o sin él, ocurre en 1 cada 1.000 nacimientos en las razas caucásicas; esta frecuencia es mayor en los orientales (1 en 700) y menor en las razas negras (1 en 2.500). La hendidura puede ser completa o incompleta en el labio superior; puede prolongarse hacia atrás en el paladar óseo y el blando (PH), y puede ser unilateral o bilateral. El recién nacido con este defecto (PH) tiene dificultades para alimentarse, otitis y posible aspiración de alimentos; la corrección quirúrgica da muy buenos resultados. La relación de sexos en los pacientes está alterada, con preponderancia masculina (1,6), que se acentúa cuanto más grave es el defecto. El riesgo de recurrencia en familiares es mayor si el afectado es mujer (como la frecuencia en mujeres es menor, debe haber acumulados más factores para producir el defecto y, por consiguiente, aumenta el riesgo). El paladar hendido aislado es menos frecuente (0,45 por 1.000 nacimientos) y casi no presenta variaciones de incidencia en las diferentes razas; al contrario del LL/PH, hay mayor incidencia en mujeres, por lo cual el riesgo de recurrencia en familiares es mayor cuando el afectado es varón. Las malformaciones craneofaciales están comenzando a ser estudiadas con métodos de Genética Molecular, con el fin de distinguir los posibles genes participantes en ellas; son blancos probables los genes involucrados en el desarrollo de los arcos branquiales.

La hipótesis multifactorial en otras enfermedades

Los datos de incidencia en gemelos monocigóticos y las estadísticas de frecuencia intrafamiliar han sugerido que un número de importantes enfermedades psiquiátricas, como la esquizofrenia y la enfermedad bipolar (maniacodepresiva), tienen un importante componente genético. Sin embargo, los intentos de individualizar genes responsables de estas enfermedades han sido frustrantes y contradictorios,[27] por lo cual tanto

en el área de la psiquiatría como en la de los rasgos psicológicos se ha impuesto la cautela. De la misma manera, hay fuertes presunciones de que enfermedades generales, como la artritis reumatoidea, tienen un componente genético muy relevante[28] pero aún no identificado.

Enfermedades complejas: disección genética de la enfermedad de Alzheimer

Si bien la enfermedad de Alzheimer no es una enfermedad multifactorial, la complejidad de causas que la provocan ha determinado que se la estudie con el método de la "disección genética" y los resultados de esta disección son parecidos a los de los estudios hechos sobre la diabetes o la hipertensión, es decir, se van descubriendo formas clínicas mendelianas y genes "mayores" de predisposición para las formas no mendelianas. Este patrón de resultados parece predecir que muchas de las enfermedades multifactoriales y otras enfermedades de origen complejo tienen un componente genético formado por unos pocos genes "mayores" que contribuyen, junto al factor ambiental, al desarrollo de la enfermedad. La enfermedad de Alzheimer es la principal causante de demencia senil y lleva a la muerte en un plazo de 5 a 10 años. Se reconocen dos grandes grupos dentro de esta enfermedad: a) las formas familiares, que son de herencia autosómica dominante, con penetrancia variable (con la edad) y que son minoritarias (10%) y b) las formas esporádicas, cuyo factor génico es predisponente y que son mayoritarias (80-90%).

La sintomatología, en las formas esporádicas, comienza usualmente alrededor de los 60 años o después de esa edad, con pérdida de la memoria de nombres, palabras y hechos recientes, que se va intensificando progresivamente, junto con errores en cálculo aritmético, cambios en el lenguaje y en la personalidad, la cual se torna agresiva con frecuencia. El deterioro mental progresa, con signos motores; la marcha se hace vacilante, los movimientos voluntarios se reducen, hay signos de primitivismo (reflejo de succión), aparece incontinencia y el paciente se ve reducido a estar en cama y generalmente termina con una infección generalizada. Se deben descartar los fenómenos focales (enfermedad cerebrovascular) con hemiplejías, pérdidas sensoriales, etc., que son propios de otras patologías. Las tomografías y las imágenes por resonancia magnética sólo muestran atrofia cerebral o agrandamiento ventricular, o ambos. El diagnóstico absoluto sólo es posible por biopsia o en la autopsia, por la histopatología cerebral. La incidencia depende de la edad del grupo considerado: entre los 40 y 60 años es sólo de 0,024 por 1.000; luego de los 60 años es mayor del 1 por 1.000; encima de los 65 años es del 2 al 6% de la población.

Los hallazgos histopatológicos son decisivos para el diagnóstico. Dos son signos estructurales: las *placas neuríticas* y los *ovillos neurofibrilares*; un tercero es histoquímico, la acumulación de un péptido, β-*amiloide*.[29]

Patología de la enfermedad de Alzheimer

Las placas neuríticas son un elemento esencial de la enfermedad. Estas placas son elementos extracelulares, que se tiñen con el colorante "rojo Congo" y con tioflavina-plata por su contenido en β-amiloide. Esta sustancia es un péptido de 39-43 aminoácidos que se produce en el organismo por el clivaje de una proteína, la *proteína precursora de amiloide* (PPA). Sin embargo, la β-amiloide no es la única sustancia acumulada en esta estructura: las placas contienen, además, *apolipoproteína E* (apoE), PPA, inmunoglobulina (IgG), proteínas del complemento y glucosaminoglucanos. De esta manera, las placas son de composición heterogénea, a pesar de la predominancia de β-amiloide. Por otra parte, se pueden hallar placas neuríticas similares en otras enfermedades, por lo que el diagnóstico de Alzheimer requiere una determinada densidad de placas por campo microscópico.

La otra estructura patológica es el ovillo neurofibrilar. Estos ovillos están constituidos por manojos de filamentos largos, de 10 nm de ancho (filamentos intermedios), situados en el citoplasma de las neuronas. Los filamentos están constituidos por dos componentes arrollados en

hélice uno con respecto al otro y pueden ser tan abundantes como para desplazar el núcleo de las neuronas. Los filamentos consisten esencialmente en una proteína asociada a los microtúbulos ("MAP"), llamada τ ("tau"), que normalmente estimula la polimerización de la tubulina. A su vez, los microtúbulos son elementos esenciales para el funcionamiento neuronal, especialmente el transporte axonal en ambos sentidos. En la enfermedad de Alzheimer la proteína τ está anormalmente fosforilada y se autoensambla en forma de filamentos en los ovillos neurofibrilares. Resulta obvio que el depósito de estos ovillos filamentosos es un signo de daño celular, pero su formación no es conocida. Recientemente se ha observado in vitro una asociación fuerte entre la proteína τ y el producto de uno de los alelos de la apoE, la apoE2, y se ha sugerido que esta interacción estabiliza los microtúbulos neuronales e inhibe la formación de filamentos y ovillos; esta estabilización no ocurre con el producto de otro alelo de apoE, la apoE4, que se considera predisponente para la enfermedad de Alzheimer.[29] La desorganización microtubular, con liberación de la proteína τ, retracción dendrítica, pérdida de sinapsis, formación de ovillos y de placas neuríticas, podría ser el mecanismo de formación de las lesiones.

Por otro lado, la acumulación de β-amiloide interviene en el desarrollo de la enfermedad. La hipótesis del papel de esta sustancia se apoya sobre todo en el hallazgo de las mutaciones del gen de la PPA, localizado en el cromosoma 21, que provocan una minoría de casos de enfermedad de Alzheimer de desarrollo temprano, en forma dominante. En condiciones normales, la PPA es transportada en vesículas hasta la membrana citoplasmática y allí es cortada enzimáticamente en la región de la mitad de la β-amiloide, de modo que esta última no puede acumularse. Sin embargo, si la PPA entra en los lisosòmas, es cortada de tal manera que libera β-amiloide, de modo que los cambios en la secuencia de la PPA o en su transporte normal pueden ocasionar un aumento de formación de β-amiloide, el cual a su vez determina el depósito en placas neuríticas.

Formas mendelianas de la enfermedad de Alzheimer

En la actualidad, se conocen cuatro genes involucrados en formas de la enfermedad de Alzheimer, de los cuales tres corresponden a formas de herencia mendeliana (cuadro 13-4).[30]

El primero de los genes relacionados con la enfermedad fue el de la proteína precursora de la β-amiloide (PPA, en 1991), que está localizado en el cromosoma 21, en la región cuya trisomía produce el síndrome de Down; debe recordarse que los pacientes con este síndrome se afectan tempranamente de placas amiloides en el encéfalo (cap. 17). Se ha sugerido que algunas mutaciones de este gen, al modificar la susceptibilidad de la proteína al clivaje enzimático, dan como resultado una mayor producción de β-amiloide; sin embargo, los pacientes con alteración de este gen son menos del 1% del total; estas mutaciones se heredan en forma dominante.

El segundo y el tercer gen que afectan las formas familiares de la enfermedad de Alzheimer fueron descubiertos en 1995; ambos se heredan en forma dominante y cubren prácticamente todos

Cuadro 13-4. Genes involucrados en las formas familiares y esporádicas de la enfermedad de Alzheimer

Gen	Sitio cromosómico	Herencia	Proteína	Frecuencia en pacientes (% del total)
PPA	#21q22	Dominante	PPA (precursora de β-amiloide	< 1%
PS1 (S182)	#14	Dominante	PS1 (467 aa)	5-10%
PS2 (STM2)	#1q31	Dominante	PS2 (448 aa)	2-3%
APOE4	#19	No hay (esporádica)	ApoE4	40-50%

Panel 13-2. Papel de las presenilinas en las formas mendelianas y en la patogenia general de la enfermedad de Alzheimer

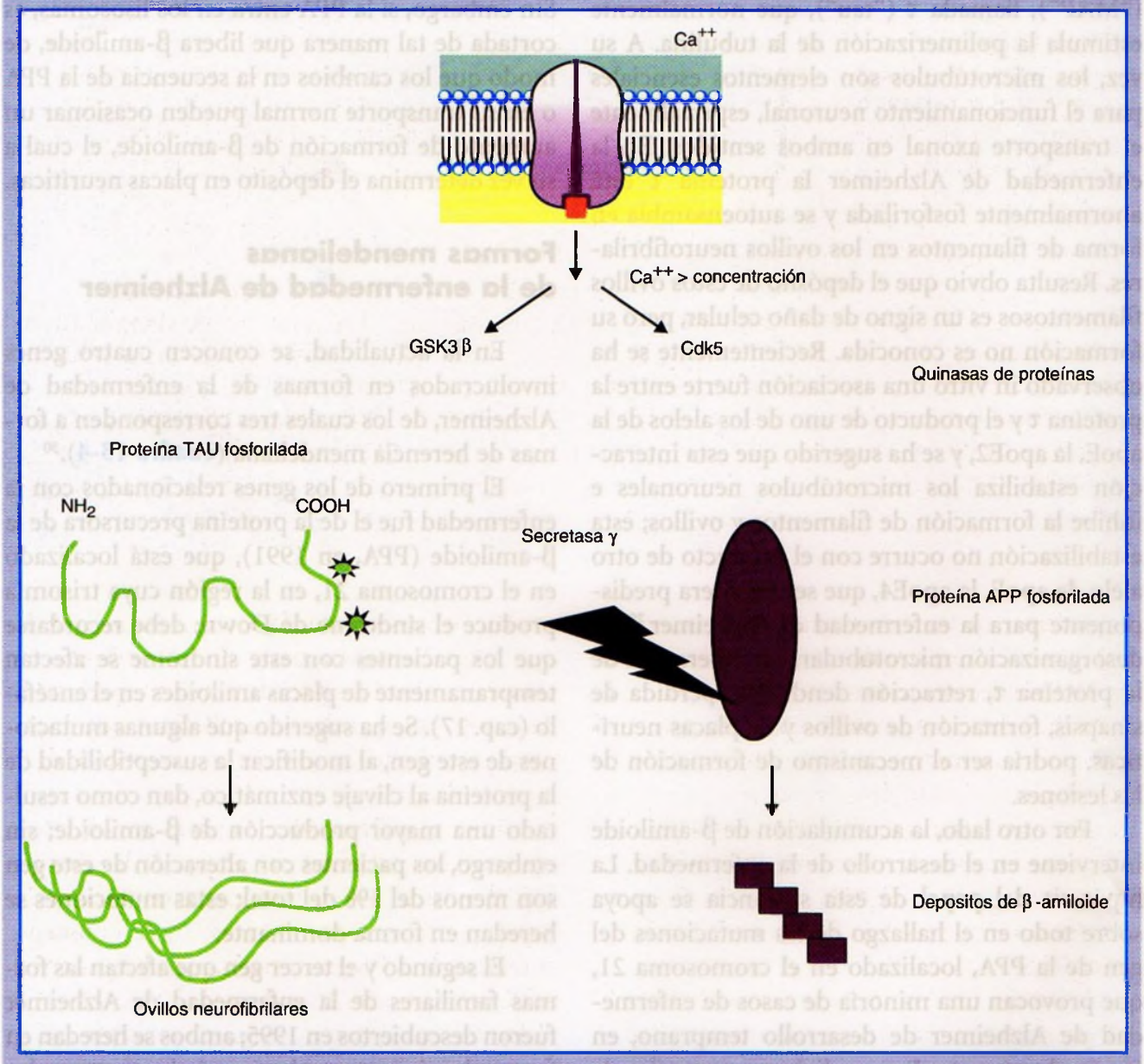


Fig. 1. Esquema de la patogenia en la enfermedad de Alzheimer. El proceso de envejecimiento celular contribuye a debilitar la regulación de la homeostasis del ión calcio intracelular. El aumento del calcio activa las quinasas GSK3β y Cdk5, las que fosforilan la proteína Tau, que lleva a formar ovillos neurofibrilares y a la secretasa γ, la cual corta la proteína APP, y produce depósitos de amiloide.

Las dos presenilinas PS1 y PS2 son proteínas de membrana que están codificadas por genes parecidos, ambos de 10 exones. Las presenilinas se encuentran en las membranas del retículo endoplasmático y también, en menor grado, en las membranas del aparato de Golgi; en estas membranas las presenilinas están relacionadas con el tráfico intracelular de proteínas. Las presenilinas presentan ocho dominios intramembranosos y los extremos amino y carboxilo están del lado citoplasmático (citosol), mientras que dan lazos hacia la luz de las cisternas (véase fig. 10-8). La anulación (o "noqueo") del gen *Ps1* en el ratón da como resultado la muerte del embrión por desorganización de los somitas y de los tejidos derivados, en especial el cartílago. Se ha sugerido que las presenilinas

intervienen en la señalización del tráfico intracelular de proteínas y recientemente se logró relacionar estas proteínas con la enfermedad de Alzheimer, puesto que se demostró que intervienen en una proteasa, llamada γ-secretasa, formada por un complejo multiproteico uno de cuyos componentes es una presenilina. Esta γ-secretasa corta la proteína precursora (PPA) en un sitio que produce justamente el péptido β-amiloide. La presenilina PS1 está mutada en alrededor del 50% de los casos de Alzheimer de tipo mendeliano (dominante) y prácticamente el total de estas mutaciones es de cambio de sentido. La mayor parte de las mutaciones se acumula en las regiones intramembranosas o cerca de ellas. Por otro lado, la reducción experimental de la expresión de PS1 lleva a un incremento en la producción de β-amiloide, en particular la forma de 42 aa, que es la más proclive a formar placas. Se ha sugerido que las mutaciones de PS1 provocan por insuficiencia haploide un defecto del procesamiento intracelular de la proteína precursora, PPA, de modo tal que esta proteína cuando está plegada de manera incorrecta, en vez de ser destruida en la forma habitual, es cortada erróneamente, liberando β-amiloide de 42 aa, y este polipéptido se deposita e inicia la formación de placas.[31,32,33]

Por otra parte se ha observado que tanto para el clivaje de la proteína precursora PPA como para la formación de los ovillos neurofibrilares compuestos por la proteína Tau, es necesario que exista una hiperfosforilación de las proteínas precursoras (PPA y Tau) (véase fig. 1). Esta hiperfosforilación puede ser provocada por al menos dos tipos de quinasas, cuya actividad podría estar vinculada a un aumento del ión Ca^{++} intracelular. Por consiguiente, en la actualidad se investiga la forma de prevenir la acción anormal de la γ-secretasa, y por otro lado se estudia la forma de regular la hiperfosforilación que daría lugar a las modificaciones proteínicas que inician la enfermedad.[34]

los pacientes de las formas familiares (mendelianas) (panel 13-2). Estos dos genes, el de la presenilina 1 (*PS1*) del cromosoma 14 y el de la presenilina 2 (*PS2*) del cromosoma 1, codifican proteínas de membrana muy parecidas entre sí (67% de homología; casi completa en las regiones intramembranosas). Estas proteínas de membrana tienen ocho segmentos intramembranosos, un dominio NH_2 y uno COOH citoplasmático, con lazos fuera y dentro de la célula, y alrededor de 450 aminoácidos en total (fig. 13-8).[33]

Los sitios de las mutaciones en *PS1* y *PS2* son parecidos, puesto que están principalmente alrededor de los dominios intramembranosos. Dado que las células con mutaciones del gen *PS1* producen cantidades incrementadas y anormales de β-amiloide, se supone que estas mutaciones actúan por medio de tal mecanismo, posiblemente alterando el transporte y el clivaje de la proteína precursora (PPA).

Forma esporádica de la enfermedad de Alzheimer

Si bien los avances en el conocimiento de las formas familiares de esta enfermedad han sido rápidos, estas formas sólo son una minoría de los pacientes. La mayor parte de los pacientes no muestran ningún signo de herencia, pero se ha detectado un gen de *susceptibilidad* que incrementa el riesgo de comienzo temprano de la enfermedad.

El gen *APOE* codifica la parte proteica de la lipoproteína principal del grupo de las de muy baja densidad, que se encuentran elevadas en las hiperlipoproteinemias de tipo III, con aumento conjunto de colesterol y triglicéridos. Se conocen varios alelos o variantes del gen: E2, E3 y E4. Los alelos E4 aumentan el riesgo de enfermedad de Alzheimer, mientras que los E2 lo disminuyen. La capacidad de estos alelos para influir sobre la enfermedad es tal que puede significar una precocidad de 20 años en el inicio de la enfermedad.[29] El alelo E4 se encuentra aumentado en un 150% entre los pacientes de Alzheimer, comparado con la población no afectada.[29] El mecanismo por el cual actuaría este alelo no se conoce, pero –como se expresó antes– se ha sugerido que el producto apoE4 no es capaz de estabilizar la unión de la tubulina y la proteína τ en las neuronas y predispone a una falla en los microtúbulos que desencadenaría la enfermedad.

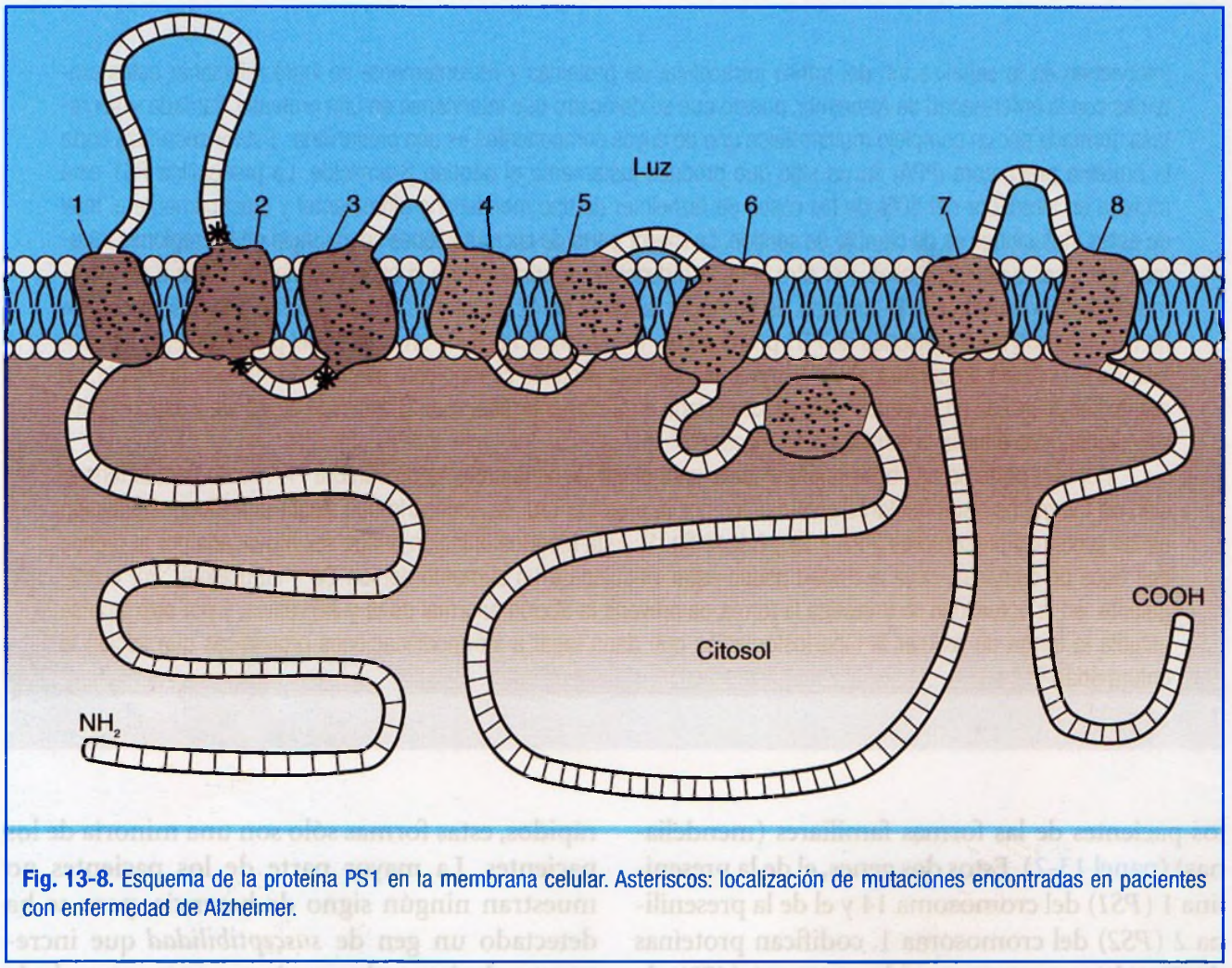


Fig. 13-8. Esquema de la proteína PS1 en la membrana celular. Asteriscos: localización de mutaciones encontradas en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Herencia mitocondrial

Todos los tipos de herencia estudiados hasta aquí correspondieron a segmentos del ADN nuclear y se guían por las reglas de Mendel o por las de la herencia multifactorial. Sin embargo, las células poseen numerosas mitocondrias, cada una de las cuales posee un diminuto genoma de ADN.

Cualquier expresión de genes mitocondriales se atiene a pautas claramente diferentes de las reglas de los genes nucleares. En primer lugar, los gametos no aportan igualitariamente genes mitocondriales al cigoto, ya que la porción intermedia del espermatozoide que lleva las mitocondrias, degenera sin aportarlas al huevo. En cambio, el ovocito presenta gran cantidad de mitocondrias, que son exclusivamente las que tendrá el cigoto. Por consiguiente, la "herencia mitocondrial" se debe seguir exclusivamente por la línea materna. En segundo lugar, no se aporta un solo genoma mitocondrial, sino varios millares, aunque no todos son iguales, dada la gran frecuencia de mutación en dicho genoma. Esta particularidad se ha denominado "heteroplasmia": la heterogeneidad de los genomas mitocondriales contenidos en las células de un mismo organismo. A medida que se desarrolla el organismo y aumenta su número de células, las mitocondrias pueden ir cambiando su genoma en diferentes tejidos y a distintas edades. Por consiguiente, la población de mitocondrias en un momento dado puede ser diferente en diversos tejidos, y la identificación de mutaciones en el genoma mitocondrial debe referirse a una edad y a un sitio determinados. Se considera que la tasa de mutación del ADN mitocondrial es 10 veces más elevada que la del ADN nuclear, debido a que los sistemas de reparación de errores en la replicación del ADN son mucho menos sofisticados en la mitocondria.

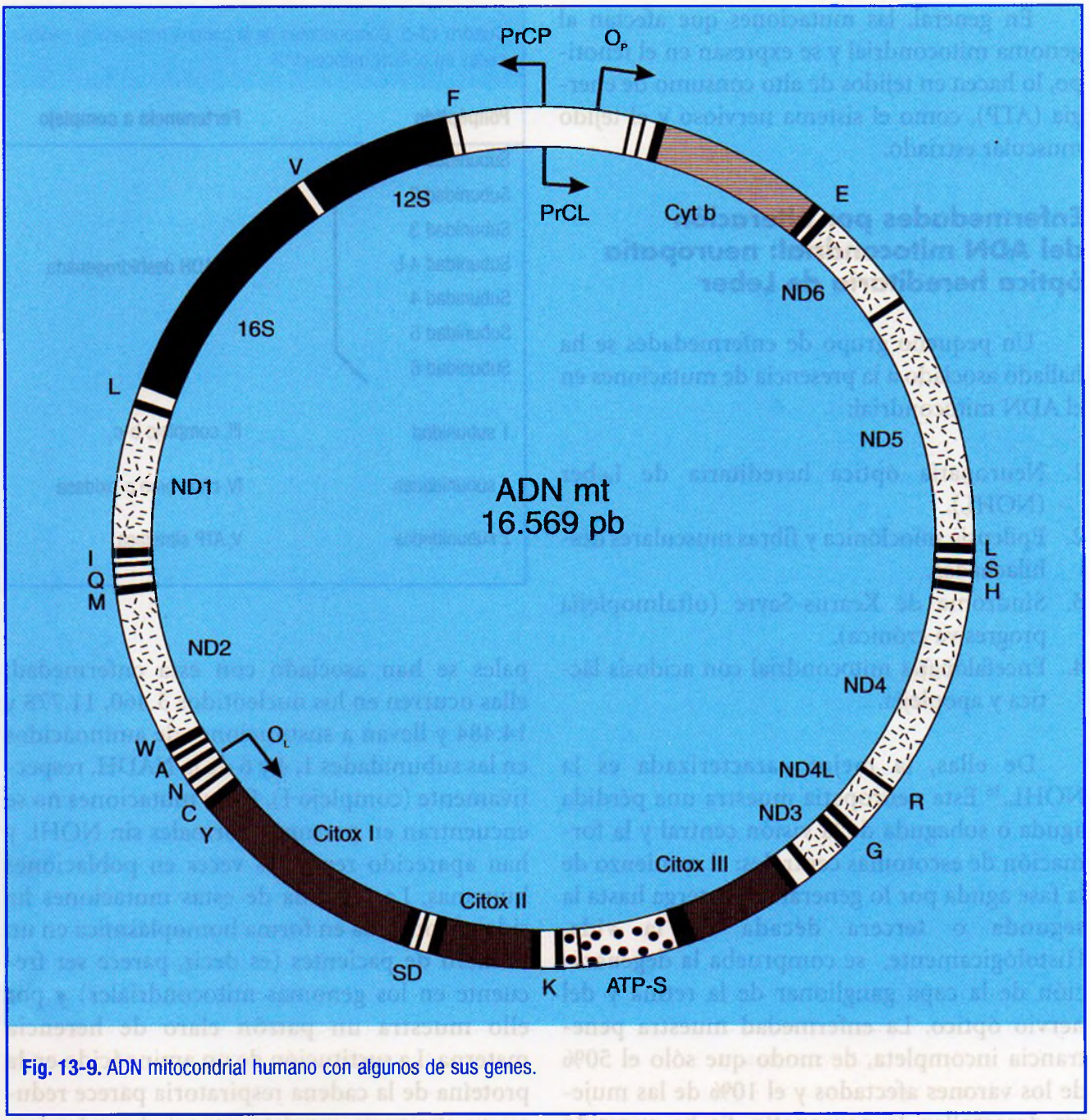


Fig. 13-9. ADN mitocondrial humano con algunos de sus genes.

El ADN mitocondrial humano forma círculos de unos pocos micrones de largo que contienen 16.569 nucleótidos. Este ADN codifica en sus dos cadenas dos ARN ribosómicos (16S y 12S), 22 ARNt de tipo mitocondrial y sólo 13 polipéptidos (fig. 13-9). Estos polipéptidos forman una parte de las proteínas de la cadena respiratoria (cuadro 13-3), mientras otra parte es codificada en el núcleo.

Las dos cadenas de este ADN circular se identifican como pesada (P = H: *heavy*) y liviana (L = *light*), por tener la cadena P una mayor concentración de G + T comparada con la cadena L, por lo cual la cadena P presenta una mayor densidad de flotación en gradientes de cloruro de cesio. Ambas cadenas son codificantes porque en ellas hay un promotor para la asociación de una ARN polimerasa específica (que es de origen nuclear, no mitocondrial). Los promotores de ambas cadenas y uno de los orígenes de replicación (el de la cadena P) están en una pequeña región reguladora llamada "lazo D" Esta región ha sido especialmente útil en estudios de evolución humana.

En general, las mutaciones que afectan al genoma mitocondrial y se expresan en el fenotipo, lo hacen en tejidos de alto consumo de energía (ATP), como el sistema nervioso y el tejido muscular estriado.

Enfermedades por alteración del ADN mitocondrial: neuropatía óptica hereditaria de Leber

Un pequeño grupo de enfermedades se ha hallado asociado a la presencia de mutaciones en el ADN mitocondrial:

1. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL).
2. Epilepsia mioclónica y fibras musculares deshilachadas.
3. Síndrome de Kearns-Sayre (oftalmoplejía progresiva crónica).
4. Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y apoplejía.

De ellas, la mejor caracterizada es la NOHL.[36] Esta neuropatía muestra una pérdida aguda o subaguda de la visión central y la formación de escotomas centrales; el comienzo de la fase aguda por lo general se posterga hasta la segunda o tercera década de la vida. Histológicamente, se comprueba la degeneración de la capa ganglionar de la retina y del nervio óptico. La enfermedad muestra penetrancia incompleta, de modo que sólo el 50% de los varones afectados y el 10% de las mujeres desarrollan la neuropatía. Se ha sugerido que si bien el factor decisivo es la mutación mitocondrial, intervienen otros factores, como la edad, la raza y otros. Tres mutaciones principales se han asociado con esta enfermedad: ellas ocurren en los nucleótidos 3.460, 11.778 y 14.484 y llevan a sustituciones de aminoácidos en las subunidades 1, 4 y 6 de la NADH, respectivamente (complejo I). Estas mutaciones no se encuentran en personas normales sin NOHL y han aparecido repetidas veces en poblaciones humanas. La segunda de estas mutaciones ha sido encontrada en forma homoplásmica en un número de pacientes (es decir, parece ser frecuente en los genomas mitocondriales) y por ello muestra un patrón claro de herencia materna. La sustitución de un aminoácido en la proteína de la cadena respiratoria parece reducir su eficiencia como transportadora de electrones, de modo tal que puede llevar a la degeneración óptica en la tercera década de la vida (cuadro 13-5).

Cuadro 13-5. Componentes de la cadena respiratoria codificados en el ADN mitocondrial

Polipéptido	Pertenencia a complejo
Subunidad 1	I, NADH deshidrogenada
Subunidad 2	
Subunidad 3	
Subunidad 4 L	
Subunidad 4	
Subunidad 5	
Subunidad 6	
1 subunidad	III, complejo b-c_1
3 subunidades	IV, citocromo c-oxidasa
2 subunidades	V, ATP sintetasa

RESUMEN

En principio, las enfermedades multifactoriales son originadas por la acción de varios genes que actúan sobre el mismo rasgo en forma igualitaria y que además tienen un factor ambiental agregado. Los rasgos originados de este modo tienen una intensidad variable, que se distribuye de acuerdo con la curva normal o de Gauss. Sin embargo, en la práctica, estas enfermedades y otras de origen complejo pueden mostrar uno o más genes que por su acción son predominantes sobre los demás. La "disección genética" de una enfermedad es el análisis de cada uno de los genes que intervienen en su producción. Esta "disección" es el procedimiento más importante que actualmente revela los orígenes concretos de enfermedades como la diabetes, la hipertensión y la enfermedad de Alzheimer. La hipótesis "multifactorial" consiste en proponer que existe un "umbral" de intensidad de un rasgo, a partir del cual se considera que existe la enfermedad; es decir que la distribución gaussiana, a partir del umbral, señala la aparición de la enfermedad. La incidencia familiar suministra características importantes de las enfermedades multifactoriales. El *coeficiente de correlación* de un rasgo cuantitativo (como el recuento de crestas dérmicas) medido entre parientes, suministra un índice de la similaridad del genoma entre esos dos parientes. Este coeficiente es de 0,5 (o 50%) entre padres e hijos y entre hermanos, y es de 1 entre gemelos monocigóticos. La "intensidad de compromiso" (o predisposición) es el rasgo que se mide en las enfermedades multifactoriales. La frecuencia de recurrencia en parientes de un enfermo es proporcional a $\sqrt{F}$ (F: frecuencia en la población); otras estimaciones de recurrencia en parientes caracterizan a estas enfermedades.

En años recientes se han desarrollado los estudios de amplitud genómica de asociación con enfermedades, cuya sigla en inglés es GWAS, para la detección de genes implicados en enfermedades comunes y de tipo multifactorial. En estos estudios se analiza la asociación de cualquier polimorfismo de tipo SNP con la enfermedad por estudiar, usando grupos numerosos de pacientes y controles. Estos estudios están produciendo grandes cantidades de datos estadísticos, que probablemente ayudarán a una medicina de tipo personalizada con cada paciente.

Para la forma insulinodependiente (DM1) de la diabetes mellitus, que es básicamente una enfermedad autoinmunitaria, hay genes mayores involucrados y algunos genes menores; los mayores son: a) parte del complejo mayor de histocompatibilidad (en el cromosoma 6p21) y b) la región del gen de la insulina (gen *IDDM2* en el cromosoma 11p15). El factor IDDM2 es un ADN minisatélite polimórfico localizado antes del gen de la insulina; tiene una unidad de repetición de 14 nucleótidos y se encuentra a 365 nucleótidos de distancia del origen de transcripción; los alelos con mayor grado de repetición (clase III) son predisponentes para esta forma de diabetes, posiblemente por provocar una modificación de la tasa de transcripción del gen de la insulina. Hay además numerosos factores menores para la DM1. En la forma MODY de la diabetes (diabetes del adulto de comienzo en la juventud) no hay dependencia de la insulina pero se diferencia claramente de la tipo 2 (DM2) porque su herencia es mongénica (mendeliana) y dominante. Se desarrolla generalmente desde los 25 años y se clasifica en seis tipos característicos en cada uno de los cuales se ha identificado el gen involucrado. Las dos formas más frecuentes involucran al gen del factor nuclear hepatocítico 1α y al gen de la glucoquinasa. La diabetes del adulto (DM2) es intensamente estudiada pero aún son muy pocos los genes reconocidos en su desarrollo, entre ellos dos factores de transcripción (el *PPARG* y el *TCF7L*). Los factores ambientales (ingesta, falta de ejercicio) son importantes.

En la hipertensión arterial se distinguen las formas mendelianas y las formas multifactoriales. El síndrome de Liddle es una forma autosómica dominante de hipertensión causada por un defecto genético del canal epitelial de sodio (ENaC) en los túbulos renales que perturba la resorción de iones y agua. En la hipertensión esencial (multifactorial) es importante el papel del gen del angiotensinógeno. El aumento de transcripción del gen del angiotensinógeno (*AGT*) está clínica y experimentalmente correlacionado con la hipertensión. Dos mutaciones del gen *AGT*, en especial la M235T, se asocian con la hipertensión al modificar los niveles basa-

les del sistema renina-angiotensina, y por ello los portadores de este tipo de mutación están predispuestos a la enfermedad.

Se sospecha que un grupo de malformaciones congénitas ejemplificado por el labio leporino con paladar hendido (LL/PH) o sin él (LL) son multifactoriales, con varios genes que actúan para su predisposición, aún no identificados. También la esquizofrenia, la enfermedad maníaco-depresiva, la artritis reumatoidea y otras afecciones se encuentran en esta situación.

La enfermedad de Alzheimer es de origen *complejo*: hay formas mendelianas y formas esporádicas. Se sabe que cuatro genes (*PPA*, *PS1*, *PS2* y *APOE4*) están involucrados en el origen de formas de la enfermedad de Alzheimer. La proteína precursora de amiloide (PPA), cuando su gen está mutado, puede dar origen a mayor cantidad de β-amiloide en esta enfermedad; algo similar puede suceder con las mutaciones de las proteínas de membrana PS1 y PS2, y en los tres casos, la enfermedad es de herencia mendeliana (autosómica dominante). El alelo E4 del gen de la apolipoproteína de muy baja densidad aumenta el riesgo de la enfermedad en las formas esporádicas, posiblemente por su incapacidad de estabilizar los microtúbulos neuronales. Las presenilinas PS1 y PS2 intervienen en compolejos multiproteínicos como la γ-secretasa, que corta la proteína PPA y produce el péptido beta amiloide. A su vez, se ha reconocido que la PPA y la proteína Tau se encuentran hiperfosforiladas en esta enfermedad, y que esta modificación de estas proteínas las hace susceptibles de formar subproductos patológicos.

La herencia *mitocondrial* es estrictamente materna y depende del genoma mitocondrial (16.569 pb), que codifica dos ARN ribosómicos mitocondriales, 22 ARNt y 13 polipéptidos de la cadena respiratoria; estos últimos corresponden a cuatro complejos, de los cuales el I (NADH deshidrogenasa) es el mejor conocido. De las enfermedades mitocondriales, la mejor caracterizada es la neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), que consiste en la pérdida de la visión central y la degeneración del nervio óptico en la tercera década de la vida y que es causada al menos por tres mutaciones que afectan subunidades de la NADH, disminuyendo la eficiencia de las mitocondrias en su función de síntesis de ATP; esta alteración, en otras mutaciones que afectan al genoma mitocondrial, se hace patente no sólo en el tejido nervioso, sino también en el muscular, que también tiene un alto consumo de energía.

REFERENCIAS

1. Holt SB Quantitative genetics of finger-print patterns. Brit Med Bull 1961;17:247-250.
2. Fraser FC. Evoiution of a palatable muitifactoriai threshoid model. Am J Hum Gen 1980;32:796.
3. Farrel M, Hoider S. Famllial recurrrence-pattern analysis of cleft lip with or without cieft palate. Am J Hum Gen 1992;50:270-277.
4. Grosen D, Chevrier C, Skytthe A, Bilie C, Molsted K Sivertsen A, et al. J Med Genet 2009, in press. A cohort study of recurrence patterns among more than 54000 relatives of oral cieft cases In Denmark: support for the multifactoriai threshold model of inheritance 2009, 069385.
5. Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. NEJM 2009;360:1759-1768.
6. Lango H, Weedon MN. What will whole genome searches for susceptibility genes for common complex disease offer to clinical practice? J Intern Medicine 2008 Jan;263(1):16-27.
7. Fiorez JC. The inherited basis of D.M. Annu Rev Genomics Hum Genet 2003;4:257-291.
8. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet 2001;358: 221–229.
9. Devendra D, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. BMJ 2004;328;750
10. Plenge RM. Shared Genetic Risk Factors for Type 1 Diabetes and Celiac Disease. Editorial. NEJM 2008;359:2837-2838.

11. Cerf ME. Transcription factors regulating β-cell function. Eur J Endocrin 2006;155:871-879.
12. Fajans SS, Bell GL, Polonsky KS. Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. NEJM 2001;345:971-980.
13. Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: a realistic appraisal in 2008. J Clin Endocrinol Metab 2008;93(12):4633-4642.
14. Thibonnier M, Schork NJ. The genetics of hypertension. Curr Opin Genet & Develop 1995; 5:362-370.
15. Hansson JH, Williams CN, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, et al. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel ?subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. Nature Genet 1995;11:76-82.
16. Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. Science 1996; 272:676-680.
17. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the b-subunit of the epithelial sodium channel. Cell 1994; 79:407-414.
18. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. Cell 1992; 71:169-180.
19. Gaillard I, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. DNA 1989; 8:87-99.
20. Kim H-S, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgin JB, Best CF, et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. Proc Nat Acad Sci USA 1995;92: 2735-2739.
21. Smithies O, Maeda N. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: Atherosclerosis and essential hypertension. Proc Nat Acad Sci USA 1995; 92:5266-5272.
22. Levy D, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. Nat Genet 2009;41(6):677-687.
23. Newhouse S, et al. Polymorphisms in the WNK1 gene are associated with blood pressure variation and urinary potassium excretion. PLoS One. 2009;4(4):e5003. Epub 2009 Apr 4.
24. Wang Y, et al. From the Cover: Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. Proc Natl Acad Sci USA 2009 Jan 6;106(1):226-231.
25. Org E, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. Hum Mol Genet 2009 Jun 15;18(12):2288-96. Epub 2009 Mar 20.
26. Elwood JH, Elwood JM. Epidemiology of anencephalus and spina bifida. Oxford: Oxford University Press; 1980.
27. McInnes A, Freimer NB. Mapping genes for psychiatric disorders and behavioral traits. Current Op Genet & Develop 1995; 5:376-381.
28. Wordsworth P. Genes and arthritis. Brit Med Bull 1995; 51:249-266.
29. Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. Proc Nat Acad Sci USA 1995; 92:4725-4727.
30. Barinaga M. New Alzheimer's gene found. Science 1995; 268:1845-1846.
31. Hardy J. The Alzheimer family of diseases: Many etiologies, one pathogenesis? Proc Nat Acad Sci USA 1997; 94:2095-2097.
32. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: Genotypes, phenotype, and treatments. Science 1997; 275:630-631.
33. Seikoe DJ, Wolfe MS 2007. Presenilin: running with scissors in the membrane. Cell 2007;131:215-221.
34. Chung SH. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. BMB Reports 2009 42(8):467-474.
35. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science 1995; 269:973-977.
36. Howell H. Mitochondrial gene mutations and human disease: a prolegomenon. Amer J Hum Genet 1994; 55:219-224.

11. Ozel ME. Transcription factors regulating β-cell function. Eur J Endocrin 2008;159:871-879.

12. Pajvani SB, Bell GI. Polarisky KS. Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. NEJM 2001;345:971-980.

13. Flores JC. The genetics of type 2 diabetes: a realistic appraisal in 2008. J Clin Endocrinol Metab 2008;93(12):4633-4642.

14. Thibonnier M, Schork NJ. The genetics of hypertension. Curr Opin Genet & Develop 1995; 5:382-370.

15. Hansson JH, Williams CH, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y et al. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel γsubunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. Nature Genet 1995;11:76-82.

16. Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. Science 1996; 272:676-680.

17. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the b-subunit of the epithelial sodium channel. Cell 1994; 79:407-414.

18. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. Cell 1992; 71:169-180.

19. Wallace I; Clauser E; Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. DNA 1989; 8:87-99.

20. Kim H-S, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgin JB, Best CF, et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92: 2735-2739.

21. Smithies O, Maeda N. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: Atherosclerosis and essential hypertension. Proc Nat Acad Sci USA 1995; 92:5266-5272.

22. Levy D, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. Nat Genet 2009;41(6):677-687.

23. Newhouse S, et al. Polymorphisms in the WNK1 gene are associated with blood pressure variation and urinary potassium excretion. PLoS One. 2009;4(4):e5003. Epub 2009 Apr 1.

24. Wang Y, et al. From the Cover: Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. Proc Natl Acad Sci USA 2009 Jan 6;106(1):226-231.

25. Org E, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. Hum Mol Genet 2009 Jun 15;18(12):2288-98. Epub 2009 Mar 20.

26. Elwood JH, Elwood JM. Epidemiology of anencephalus and spina bifida. Oxford: Oxford University Press; 1980.

27. McInnes A, Rehmer MB. Mapping genes for psychiatric disorders and behavioral traits. Current Op Genet & Develop 1995; 5:378-381.

28. Wordsworth P. Genes and arthritis. Brit Med Bull 1995; 51:249-258.

29. Shiffmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. Proc Nat Acad Sci USA 1995; 92:4725-4727.

30. Beirnega M. New Alzheimer's gene found. Science 1995; 268:1845-1846.

31. Hardy J. The Alzheimer family of diseases: Many etiologies, one pathogenesis? Proc Nat Acad Sci USA 1997; 94:2095-2097.

32. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: Genotypes, phenotype, and treatments. Science 1997; 275:630-631.

33. Selkoe DJ, Wolfe MS 2007. Presenilin: running with scissors in the membrane. Cell 2007;131:215-221.

34. Chung SH. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. BMB Reports 2009 42(8):467-474.

35. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science 1995; 269:973-977.

36. Howell N. Mitochondrial gene mutations and human disease: a prolegomenon. Amer J Hum Genet 1994; 55:213-224.

Capítulo 14

Genética bioquímica. Errores congénitos del metabolismo

Las mutaciones de los genes de enzimas producen a menudo errores congénitos del metabolismo. Mecanismos patogénicos. Galactosemia: mutaciones del gen GALT y bloqueo. Fenilcetonuria. Gen FAH. Las tesaurosis, enfermedades de acumulación. Gangliosidosis. Genes HEXA y HEXB. Enfermedades de Gaucher y de Hunter. Hiperplasia suprarrenal congénita. Pesquisa genética neonatal

INTRODUCCIÓN

La Genética y la Bioquímica se encuentran actualmente estrechamente asociadas, de tal forma que es posible encarar cada proceso metabólico desde dos puntos de vista: bioquímico y genético. Esto se debe a que la vasta mayoría de las reacciones que ocurren en el organismo son catalizadas y reguladas por enzimas y proteínas reguladoras, cada una de las cuales responde a una codificación genética y, por consiguiente, son pasibles de mutación; por lo tanto, las mutaciones pueden alterar las reacciones metabólicas.

Es posible entonces considerar que cada paso en todo camino metabólico posee al menos una regulación génica, y a menudo más de un producto génico está involucrado en cada paso. La vinculación entre caminos metabólicos y genes fue propuesta por el médico inglés Archibald Garrod a principios del siglo XX, y el mismo Garrod propuso el nombre de "errores congénitos del metabolismo" para los efectos patológicos de mutaciones en la especie humana. Sólo varias décadas después, Beadle y Tatum en los Estados Unidos pudieron demostrar experimentalmente la relación entre genes y proteínas, pero los detalles de estas relaciones sólo se están dilucidando actualmente mediante los métodos de la Genética Molecular (panel 14-1).

En principio, cada camino metabólico puede ser interrumpido, alterado o desviado en cualquiera de sus puntos a causa de mutaciones génicas (fig. 14-1). La mayoría de los bloqueos o alteraciones de los caminos metabólicos ocurren como mutaciones recesivas; es decir que la presencia de un producto génico mutante no interfiere con el producto normal, y éste es suficiente para movilizar el camino metabólico correctamente; luego, el bloqueo sólo se establece cuando falta totalmente el alelo normal. Algunas pocas mutaciones de los caminos metabólicos son dominantes; esto ocurre en casos en que la enzima determina una tasa de producto máxima con sus dos alelos, y esta tasa máxima es necesaria para la correcta regulación del camino metabólico, como en la porfiria intermitente, en la cual no es suficiente la presencia de un solo gen normal.

Por otra parte, hay numerosas proteínas de tipo estructural que no intervienen en caminos

Panel

Panel 14-1. La alcaptonuria: el descubrimiento de los errores congénitos del metabolismo (1902)

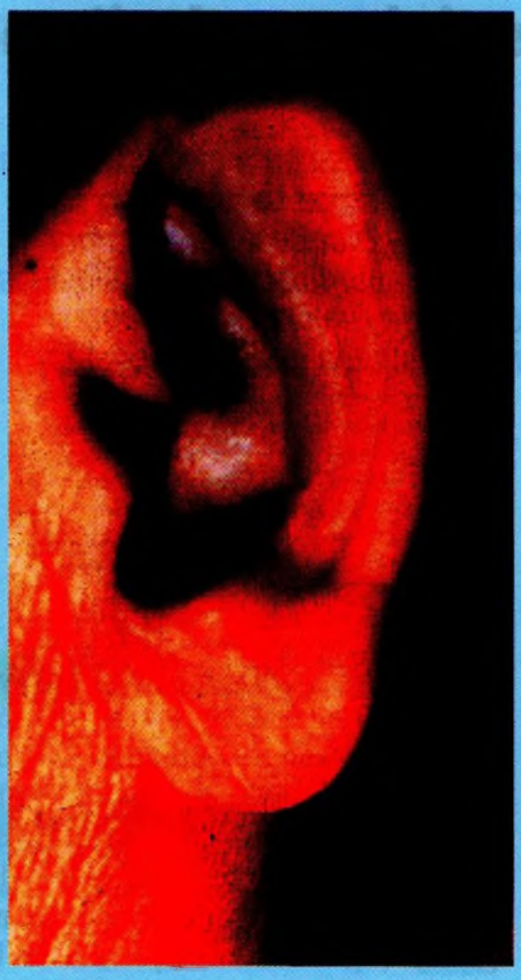


Fig. 1. Ocronosis (coloración azul negruzca) del cartílago auricular. Los alcaptonúricos desarrollan ocronosis con el paso del tiempo, al igual que artropatías por depósitos de derivados del ácido homogentísico. (Cortesía de los doctores Cordero AA, Cobreros MS, Allevato MA y Donatti L. Manifestaciones Cutáneas de las Enfermedades Sistémicas. Atlas color y texto, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1997, con autorización de la editorial.)

La Genética Humana fue, aunque parezca extraño, la pionera absoluta en la formulación de hipótesis moleculares. El médico inglés Archibald Garrod no sólo propuso acertadamente el tipo de herencia recesivo para la rara enfermedad "alcaptonuria", sino que en 1908, anticipándose en 50 años a los estudios bioquímicos, planteó que el origen de esta enfermedad era la falta de una enzima, describió cuál debía de ser el papel de la enzima y presentó la hipótesis de que debía de haber muchos otros "errores congénitos del metabolismo" (título y concepto general de este capítulo). La alcaptonuria es una enfermedad infrecuente (1 en 200.000 nacimientos), de carácter leve y pronóstico benigno, debida a una deficiencia de la enzima HGO (dioxigenasa del ácido homogentísico), y que se denota desde la niñez temprana por el oscurecimiento gradual de la orina, hasta que se ennegrece, al permanecer al aire y a la luz, por la presencia del ácido homogentísico excretado anormalmente en este líquido, y que forma un producto coloreado por oxidación. Los pacientes de esta enfermedad leve manifiestan algunos signos a medida que su edad aumenta: el más frecuente es la "ocronosis" o coloración azul negruzca de los cartílagos auriculares y nasales (fig. 1), de la esclerótica y de otros tejidos conectivos, y también se producen artropatías causadas por el depósito pigmentado en los cartílagos articulares. En 1996 Fernández Cañón y col. aislaron el gen *HGO*, cuya mutación causa la alcaptonuria.[1] Este gen está en el cromosoma 3q21-23, tiene 14 exones distribuidos en 60 kb, transcribe un ARNm de 1,8 kb en los hepatocitos y el epitelio prostático (principalmente) y el ADNc de 1.714 pb codifica una enzima de 444 aa, cuya mutación hallada en España, P230S (de "cambio de sentido", de prolina a serina, en el nucleótido 817, correspondiente al exón 10), vuelve a esta proteína no funcional, al igual que otras mutaciones.[1]

ALCAPTONURIA : 1 de 200 mil R.N.

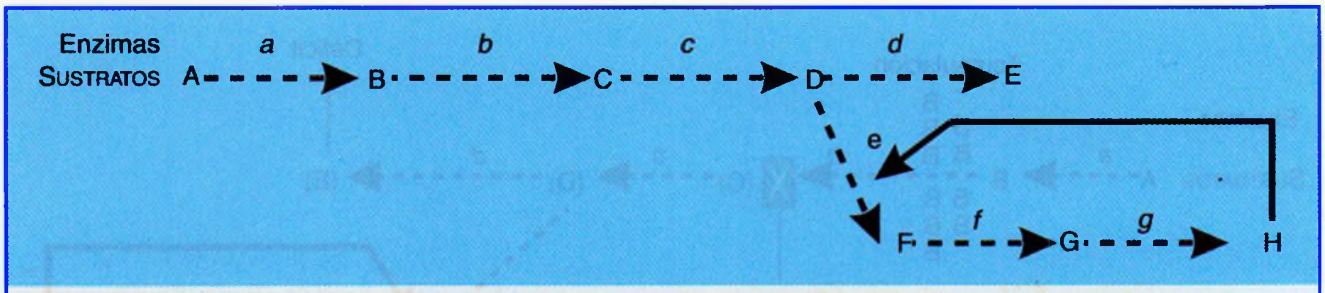


Fig. 14-1. Caminos metabólicos y genes. Un camino metabólico hipotético lleva del sustrato A a las sustancias E o H, en forma alternativa o conjunta. El sustrato D es utilizado por dos enzimas (d y e), y la sustancia final H retroalimenta negativamente (deprime) a la enzima e. Todos los pasos son pasibles de alteración o bloqueo genético.

metabólicos y en las cuales las mutaciones pueden ser dominantes o recesivas; su estudio también corresponde a la Genética Bioquímica (p. ej., las alteraciones del colágeno, las de las proteínas de los filamentos intermedios y las de las hemoglobinas). Este tipo de productos génicos estructurales es estudiado en el capítulo 15.

Mecanismos patogénicos de los errores congénitos del metabolismo

En estas enfermedades, una mutación determina la falla de una enzima. La alteración génica puede causar el déficit enzimático de varias maneras: a) la proteína no se produce, se produce truncada (cortada) o se produce en cantidades mínimas; esto puede ocurrir debido a la emergencia de un codón de terminación muy cerca del principio de la región codificante; o por un defecto de corte y empalme, a causa de la pérdida de las señales normales de empalme; o por una inestabilidad del ARN transcripto, o de la propia proteína, y b) la enzima se produce, pero está alterada: funcionalmente hay una menor actividad enzimática o ésta es nula, como consecuencia de defectos estructurales en la proteína que reducen su afinidad por el sustrato o directamente reducen su actividad catalítica, modificando el centro activo de la enzima. En términos generales, la actividad de la enzima está modificada o suprimida.

En cada paso de un camino metabólico donde hay una enzima involucrada, sus mutaciones pueden determinar una enfermedad (además de polimorfismos). El desarrollo de la enfermedad (patogenia) puede acontecer por medio de diferentes mecanismos:

1. Ausencia de un producto final (o siguiente a la reacción pertinente); por ejemplo, el albinismo (déficit de pigmento melanótico) consecuente al déficit de la enzima tirosinasa (fig. 14-2).
2. Acumulación del producto previo en el camino metabólico; el producto puede ejercer un efecto tóxico, como en la galactosemia, o determinar la atrofia y muerte celular por simple acumulación, como en las tesaurosis (fig. 14-2).
3. Derivación anormal de los productos hacia un camino metabólico alternativo, con la formación de productos intermediarios en cantidad nociva, como en el caso de la fenilcetonuria.
4. Ruptura de un mecanismo regulador del metabolismo, al alterarse las cantidades de productos, como en el caso de la hipercolesterolemia familiar.

En los siguientes párrafos se encuentran ejemplificados los mecanismos patogénicos.

Galactosemia: prototipo de enfermedad hereditaria con terapéutica exitosa

La galactosemia clásica (defecto de *galacto*sauridil-*transferasa* = GALT) es una enfermedad hereditaria que sirve de prototipo en varios

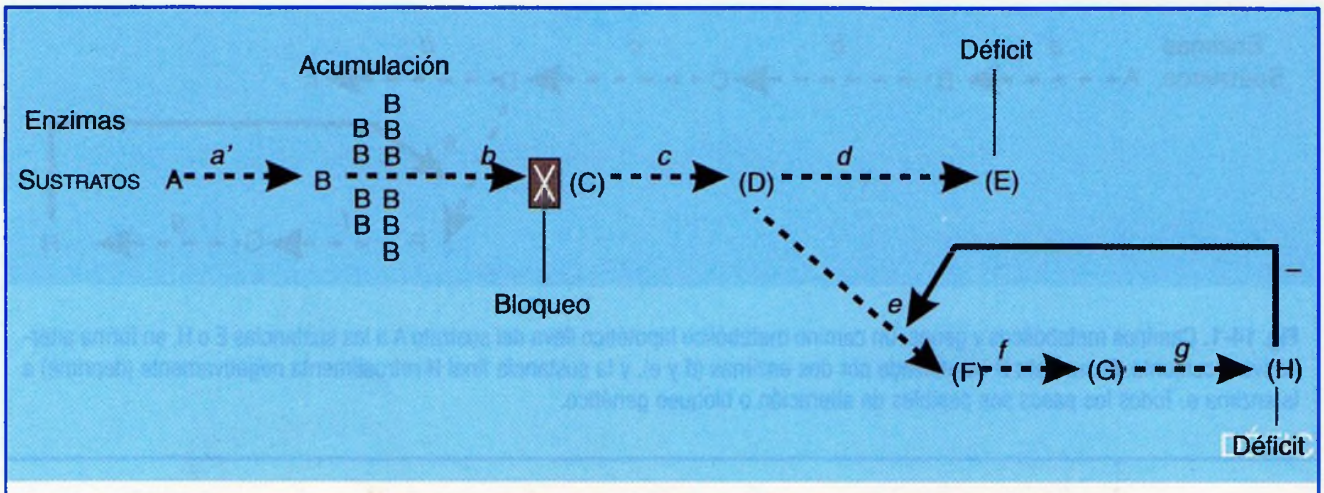


Fig. 14-2. Representación de dos de los mecanismos patogénicos en los errores congénitos del metabolismo: déficit de productos finales y acumulación del producto previo al bloqueo genético.

aspectos: primero, porque es un error congénito del metabolismo bien estudiado y típico, en el que la patogenia de la enfermedad es clara; en segundo lugar, porque el tratamiento es casi completamente exitoso, con medidas dietéticas simples, que despojan a la enfermedad hereditaria de su connotación equivocada de inevitable e intratable. La prevalencia de la galactosemia ha sido estimada en 1 cada 47.000 recién nacidos.[2] Su detección en la primera semana de vida es crítica para la sobrevida.[3] Es de pesquisa o tamizaje obligatorio en la Argentina y muchos otros países.

Al nacer, un niño galactosémico no muestra signos de enfermedad, pero a la semana, o aun a los pocos días de empezar su lactancia materna o la alimentación con leche de vaca, comienza a desmejorar, no aumenta de peso, vomita, demuestra malestar, comienza a mostrar ictericia (de 4 a 10 días después), hipotonía muscular y sopor; todo esto se complica con la susceptibilidad muy aumentada para infecciones por *E. coli*, que pueden llevar a un deceso rápido hasta al 50% de los recién nacidos galactosémicos que, por falta de diagnóstico, no reciben dieta especial en las primeras dos semanas (fig. 14-3).[3]

Los signos que aparecen posteriormente son hepatomegalia, esplenomegalia, distensión abdominal, ascitis, convulsiones y, en general, signos de cirrosis hepática. El desarrollo de cataratas por lo general es posterior a los síntomas iniciales y tiene un mecanismo patogénico particular. Si bien el tratamiento dietético temprano no sólo salva la vida de los neonatos, sino que evita los signos mayores (insuficiencia hepática, desnutrición y cataratas), se han observado ciertos efectos tardíos que no son evitables con el tratamiento, aunque éste sea temprano. Estos efectos tardíos comprenden: 1) falla ovárica (hipoplasia ovárica), casi constante en las mujeres que fueron diagnosticadas y tratadas por galactosemia en su niñez y 2) trastornos de aprendizaje, trastornos de la dicción y retraso en el uso del lenguaje. Estas manifestaciones tardías y rebeldes al tratamiento dietético requieren profundizar el estudio de su mecanismo patogénico para poder lograr una curación total.

Mecanismos patogénicos en la galactosemia

Dos mecanismos diferentes constituyen el origen de la mayoría de las manifestaciones de esta enfermedad: 1) por un lado, el bloqueo del camino metabólico de la galactosa (véase más adelante) produce una acumulación del metabolito previo, *galactosa-1-fosfato*, y esta sustancia, en concentraciones altas, llega a provocar un efecto tóxico sobre el hígado; 2) por otro lado, el bloqueo metabólico causa una acumulación de la propia galactosa, que entra en un camino metabólico secundario, para producir, por

GALACTOSEMIA: 1 de 47mil R.N.

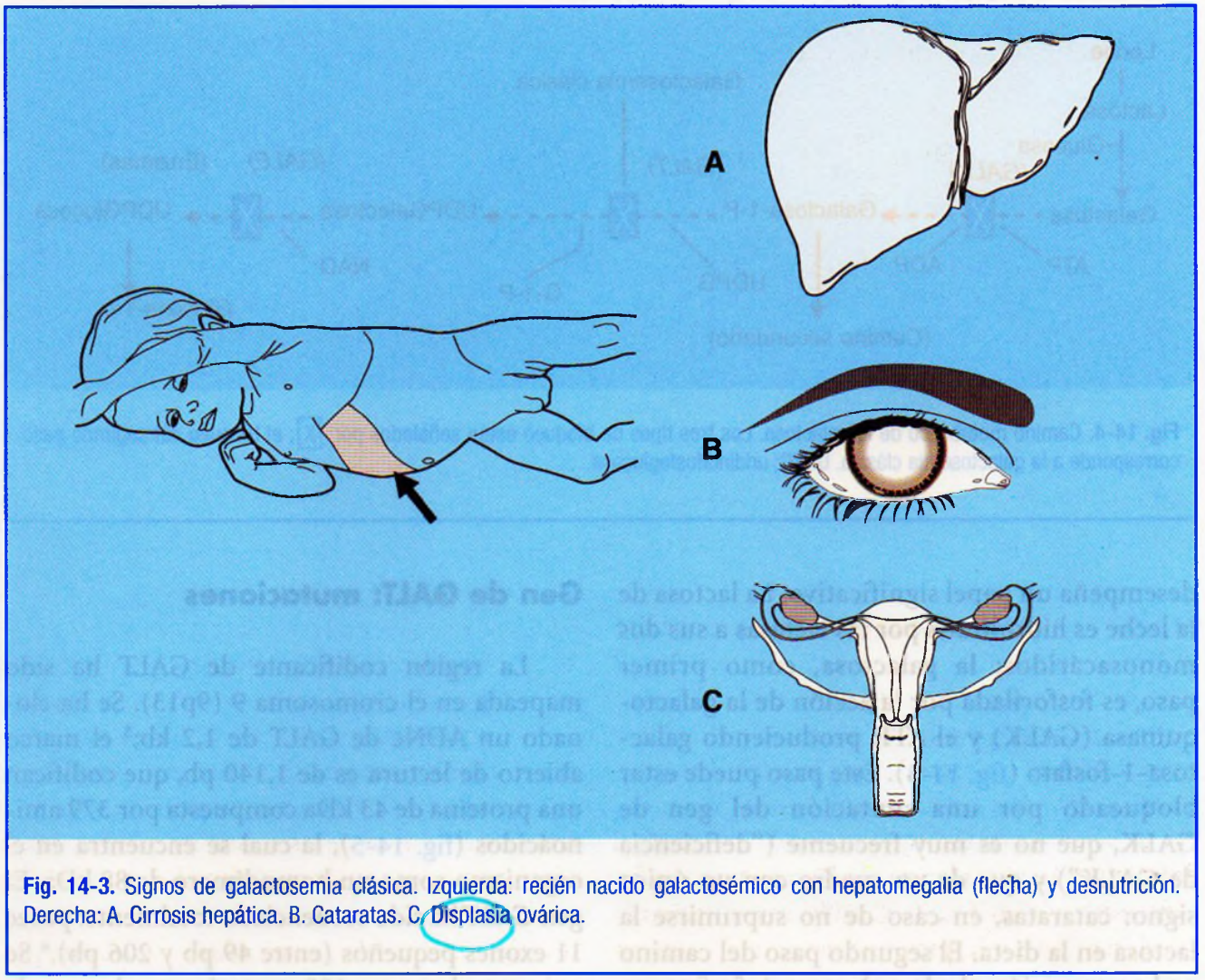


Fig. 14-3. Signos de galactosemia clásica. Izquierda: recién nacido galactosémico con hepatomegalia (flecha) y desnutrición. Derecha: A. Cirrosis hepática. B. Cataratas. C. Displasia ovárica.

reducción, *galactitol*, sustancia que provoca la catarata. Las manifestaciones más graves son producto del primer mecanismo, que afecta fundamentalmente a la célula hepática. El metabolito galactosa-1-fosfato puede inhibir enzimas que utiliza el hepatocito, tales como la fosfoglucomutasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y determina un déficit en la respiración celular.[4]

La acumulación de galactosa-1-fosfato puede ser rápida y alcanzar niveles de 300-400 mg/mL en eritrocitos; estas concentraciones, al actuar sobre los hepatocitos, probablemente dañan en forma irreversible a estas células, las llevan a la muerte y a su reemplazo por tejido fibroso, por lo que comienza a desarrollarse la cirrosis hepática.

Los canalículos biliares están dilatados y los hepatocitos remanentes adoptan disposiciones en roseta.

La catarata típica, por su parte, se produce por la imbibición del cristalino con el galactitol resultante de la vía metabólica accesoria; el galactitol, no utilizable en el cristalino y relativamente inmóvil, eleva la presión osmótica intracelular y provoca la desnaturalización de las proteínas de las fibras del cristalino, llevándolo a la opacificación.

Camino metabólico de la galactosa (camino de Leloir): mutaciones y bloqueos

El disacárido lactosa de la leche está compuesto por glucosa y galactosa; esta última no es en sí misma un nutriente esencial, puesto que el organismo puede sintetizar galactosa a partir de glucosa e incorporarla a los galactolípidos y glucoproteínas del organismo, donde

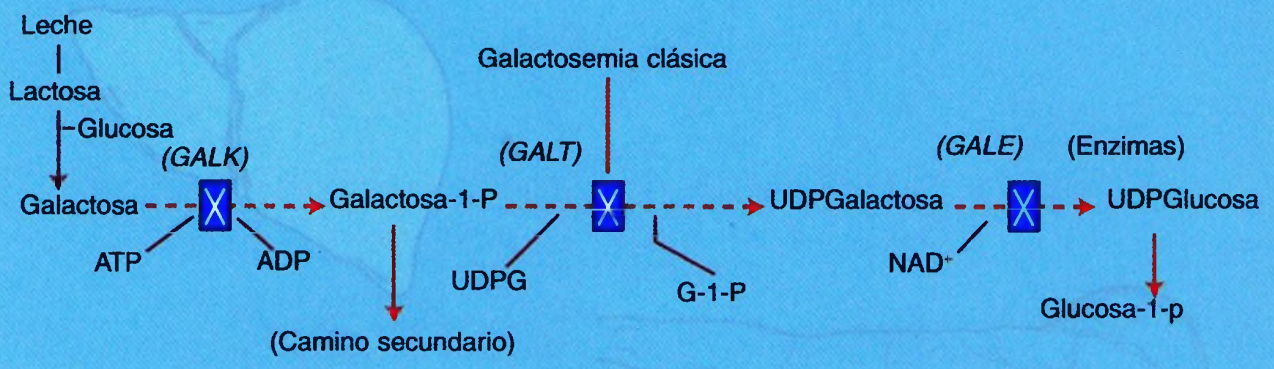


Fig. 14-4. Camino metabólico de la galactosa. Los tres tipos de bloqueo están señalados por [X]; el bloqueo del segundo paso corresponde a la galactosemia clásica. UDPG: uridindifosfoglucosa.

desempeña un papel significativo. La lactosa de la leche es hidrolizada por las lactasas a sus dos monosacáridos; la galactosa, como primer paso, es fosforilada por la acción de la galactoquinasa (GALK) y el ATP, produciendo galactosa-1-fosfato (fig. 14-4). Este paso puede estar bloqueado por una mutación del gen de GALK, que no es muy frecuente ("deficiencia de GALK") y que da un cuadro con un único signo: cataratas, en caso de no suprimirse la lactosa en la dieta. El segundo paso del camino es la conversión de la galactosa-1-fosfato en uridindifosfogalactosa, mediante la acción de la enzima GALT y UDPG; éste es el paso bloqueado en la galactosemia clásica. Un tercer paso es la conversión de la UDPGalactosa en UDPGlucosa, para entrar ya en el camino usual de la glucosa; este tercer paso se realiza por acción de la enzima uridindifosfogalactosa-4-epimerasa (GAL-E; GALE) y NAD+; este paso puede ser bloqueado por el "defecto de GALE", que no tiene la importancia del bloqueo anterior.

Finalmente, hay un camino secundario, muy poco significativo en el lactante, pero que puede incrementarse con la edad: por medio de otra enzima (la UDPGalactosa pirofosforilasa), la galactosa-1-fosfato más UTP dan UDPGalactosa y fosfato inorgánico; como esta reacción es reversible, tanto puede servir para metabolizar la galactosa-1-fosfato como para incrementar su concentración.

Gen de GALT: mutaciones

La región codificante de GALT ha sido mapeada en el cromosoma 9 (9p13). Se ha clonado un ADNc de GALT de 1,2 kb;[5] el marco abierto de lectura es de 1.140 pb, que codifican una proteína de 43 kDa compuesta por 379 aminoácidos (fig. 14-5), la cual se encuentra en el organismo como un homodímero de 88 kDa. El gen *GALT* ha sido secuenciado totalmente: posee 11 exones pequeños (entre 49 pb y 206 pb).[6] Se conocen al menos 180 mutaciones, algunas de las cuales dan lugar a la enfermedad por una considerable reducción de la actividad enzimática; otras mutaciones no dan expresión patológica, por lo cual son simples polimorfismos. La mutación patogénica que prevalece entre poblaciones caucásicas es la Q188R, que cambia el aminoácido 188, de una glutamina original, en una arginina en el mutante. Esta mutación, que ocurre en el codón 188, dentro del exón 6, es una transición adenina a guanina, la cual tiene una prevalencia del 70% entre enfermos de raza caucásica.[7]

Otra mutación frecuente es la N314D, que da lugar a la variante "Duarte"; también es una transición A → G que determina el cambio de asparagina a ácido aspártico en el aa 314; esta mutación reduce la actividad enzimática mucho menos intensamente que la Q188R; de la misma manera, otras mutaciones como la S135L y la V151A reducen la actividad de la enzima. Dado que la enzima

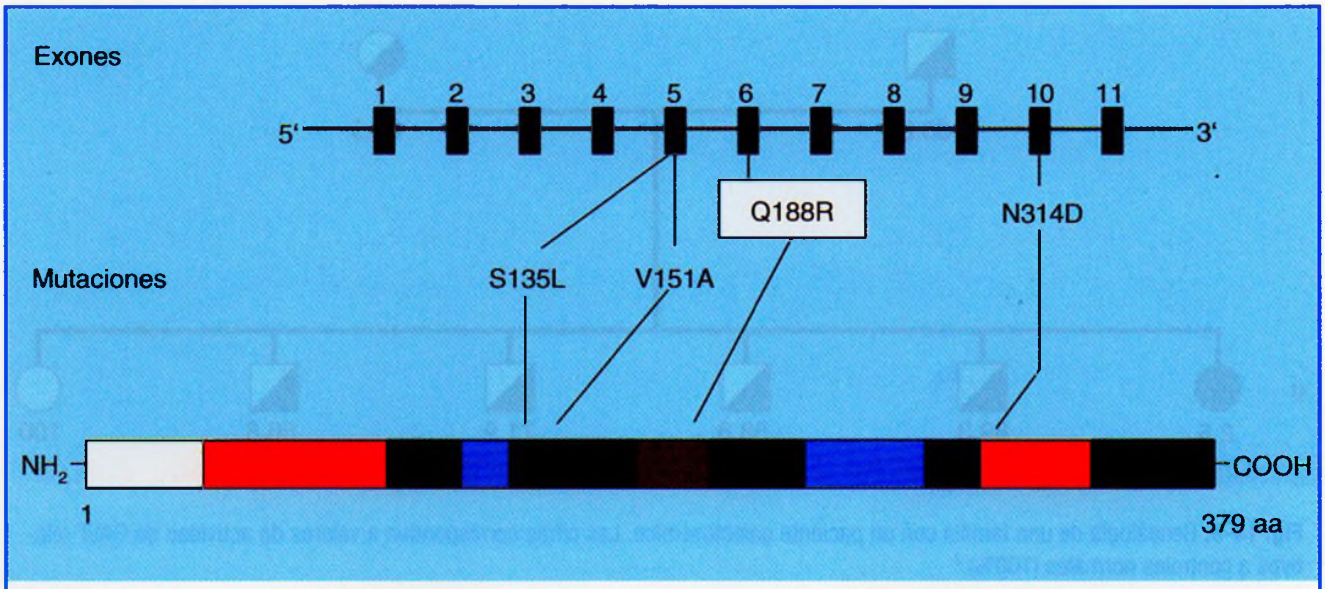


Fig. 14-5. Localización de mutaciones en el gen *GALT* y la proteína respectiva, uridiltransferasa (proteína GALT). Los exones e intrones están representados con longitudes arbitrarias. Los dominios codificados por cada exón están representados con colores en la proteína. La mutación más frecuente está señalada con un recuadro.

es funcional como un dímero, se predice la constitución de proteínas "mixtas" o heterodímeros, en un heterocigota, con un nivel de actividad de la enzima intermedio al de controles y al de los homocigotas para la mutación. Además, la constitución de heterocigotas para dos mutaciones diferentes permite prever disminuciones acentuadas de la actividad enzimática, aun no siendo homocigotas para una única mutación.

Transmisión y tratamiento

La incidencia de galactosemia está asociada con un mayor índice de consanguinidad entre los progenitores, lo cual sugiere el carácter recesivo de las mutaciones. La recesividad y la transmisión a través de portadores heterocigotas fue demostrada desde hace varias décadas, en especial por los dosajes de la actividad enzimática en los miembros de la familia (fig. 14-6).

El relevamiento de heterocigotas se puede realizar por el dosaje de galactosa-1-fosfato en sangre o por el dosaje de la actividad de GALT. Si bien hay alguna superposición entre controles normales y los extremos de la curva de heterocigotas, generalmente éstos manifiestan una disminución significativa de la actividad de GALT. Los enfermos presentan casi nula esta actividad (véase fig. 14-6). En la actualidad se detectan los *heterocigotas compuestos*, es decir, las personas portadoras de dos mutaciones *diferentes* del gen *GALT*, por medio del análisis de los exones del gen (por múltiple RCP y secuenciación).

El tratamiento está sujeto a un diagnóstico temprano, y consiste en una dieta con la supresión temprana de la leche y los derivados que contienen lactosa, los cuales son reemplazados por hidrolizados de caseína y de soja. Los resultados son excelentes para prevenir lesiones hepáticas y cataratas, y permiten un crecimiento normal. Sin embargo, las manifestaciones tardías, la displasia ovárica y los trastornos de aprendizaje son refractarios al tratamiento dietético. Estas manifestaciones consisten (en las pacientes femeninas) en una insuficiencia ovárica primaria, con depleción de los folículos a partir de la pubertad, aumento del nivel de gonadotrofinas, infertilidad y menopausia prematura.[8] Estos efectos son particularmente frecuentes en pacientes homocigotas para la mutación Q188R (el riesgo está aumentado 16 veces con respecto a heterocigotas)[8] en las que la actividad de la enzima GALT es casi indetectable. La otra manifestación tardía ocurre en niños de ambos sexos y consiste en un retraso del habla y un leve déficit cognitivo (dispraxia verbal). Aunque estas mani-

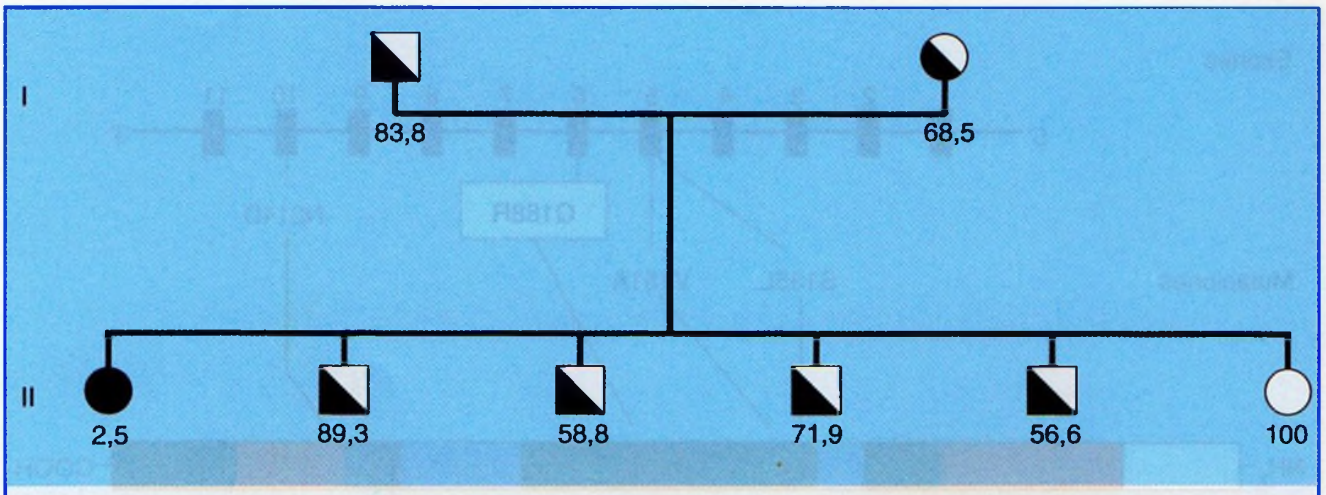


Fig. 14-6. Genealogía de una familia con un paciente galactosémico. Las cifras corresponden a valores de actividad de GALT relativos a controles normales (100%).[4]

festaciones tardías son propias de los pacientes homocigotas, con altas concentraciones de Gal-1-P y de galactitol, no se conoce aún el mecanismo patogénico que las determina.[8]

Fenilcetonuria: bloqueo en el camino de la fenilalanina

La fenilcetonuria (idiocia fenilpirúvica, PKU = FCU, deficiencia de fenilalanina-hidroxilasa) es una importante enfermedad hereditaria causante de retraso mental, que se instala desde la lactancia temprana en los niños afectados. Su prevalencia es de 1 cada 10.000 a 15.000 recién nacidos en las razas caucásicas, y es variable según poblaciones y zonas geográficas, por lo cual el análisis de su gen ha sido útil en estudios de la evolución humana.[9]

La fenilcetonuria (FCU) es un bloqueo del metabolismo de la fenilalanina, uno de los aminoácidos esenciales en la dieta, y este bloqueo provoca una acumulación del aminoácido en la sangre, elevando su concentración a más de 10 veces la normal, es decir, origina una *hiperfenilalaninemia* (hiper-F-emia).[9]

Los niños afectados no muestran anormalidades al nacer, pero a las semanas presentan vómitos, convulsiones, erupciones de tipo eczematoide y, a veces, un olor particular debido a la presencia de ácido fenilacético en el sudor y la orina. El retraso mental se instala rápidamente en todos los niños que muestran un nivel superior a 6 mg de fenilalanina/100 mL de sangre, y se hace cada vez más profundo si no se los trata con la dieta adecuada; este retraso puede llevar a un cociente intelectual de sólo el 50% del normal, con anomalías de los reflejos y del electroencefalograma, y obliga a su internación en institutos para niños discapacitados.

Los niños afectados tienen tendencia a ser de tez más clara, ojos claros y cabello más rubio en comparación con familiares consanguíneos, lo cual es explicable porque el bloqueo disminuye la síntesis de la tirosina inicial para la producción de pigmento. Otro dato significativo en niños mayores afectados es la microcefalia (disminución del tamaño craneal).

Esta enfermedad es de pesquisa neonatal obligatoria en muchos paíes (incluida la Argentina; panel 14-4) desde que se probó su utilidad alrededor de 1950. El tratamiento dietético de la FCU ha dado resultados espectaculares en los países donde se realiza el relevamiento de las tasas de fenilalanina en sangre en los recién nacidos: virtualmente se ha eliminado el retraso mental por FCU pero, paradójicamente, ha surgido una nueva enfermedad. Puesto que bien tratados los pacientes llegan a una vida prácticamente normal, las mujeres con FCU se casan y se embarazan y allí surge el peligro de que el feto sea afectado por la alteración bioquímica de la madre: la embriopatía por fenilcetonuria materna, que requiere un control cuidadoso de

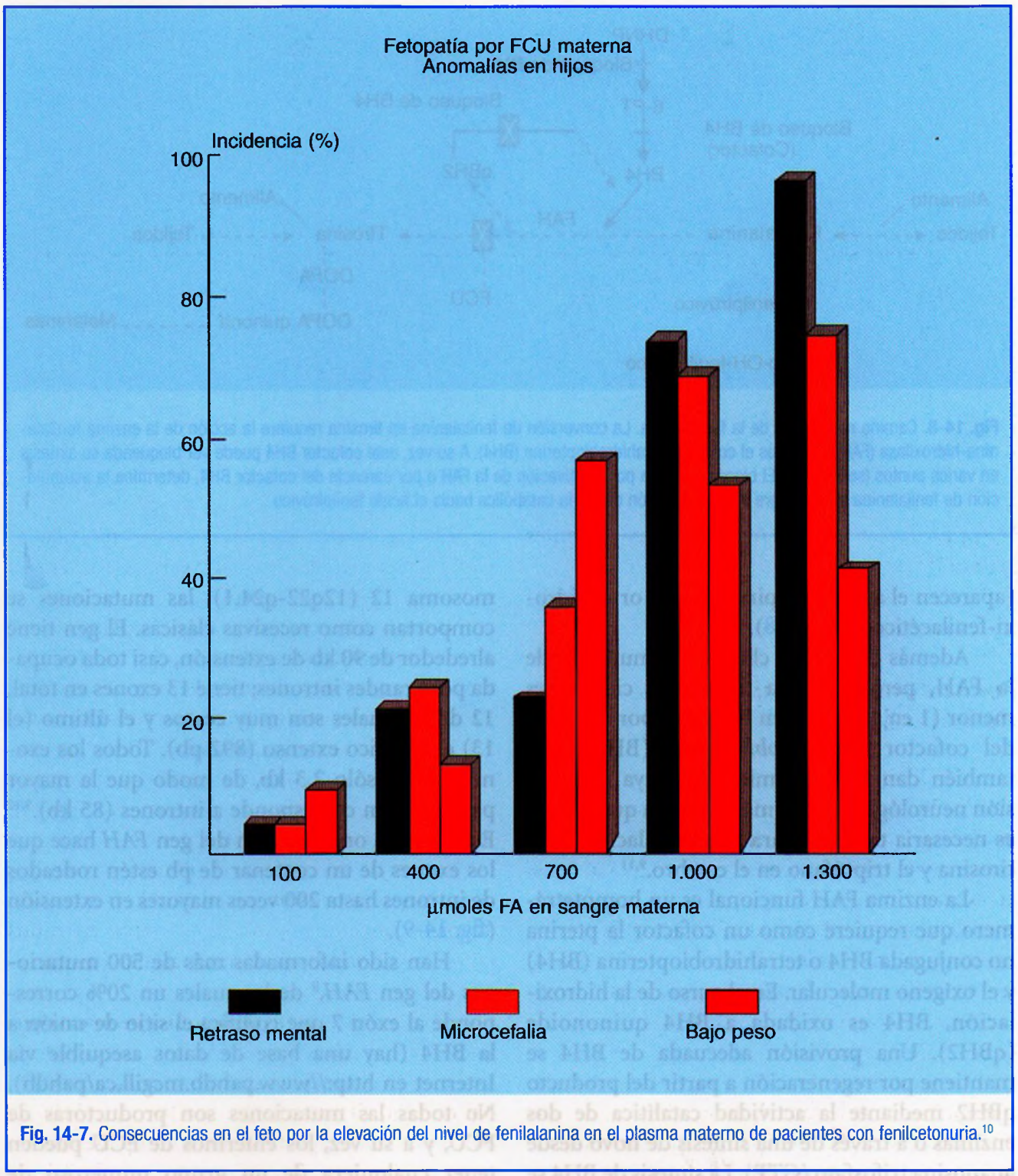


Fig. 14-7. Consecuencias en el feto por la elevación del nivel de fenilalanina en el plasma materno de pacientes con fenilcetonuria.[10]

los niveles de fenilalanina materna durante el embarazo (fig. 14-7).[9,10,11]

Camino metabólico y bloqueos

La FCU clásica se produce por las mutaciones de la enzima hepática fenilalanina-hidroxilasa (FAH), que normalmente convierte la FA en tirosina (y luego continúa con el camino de la tirosina). Al bloquearse esta conversión, la FA proveniente de los alimentos se acumula en el plasma sanguíneo, y la vía secundaria de catabolismo hacia el ácido fenilpirúvico ve aumentada su circulación de tal forma que hay catabolitos que aparecen en la orina de los enfermos y no en la de los que tienen una vía catabólica normal

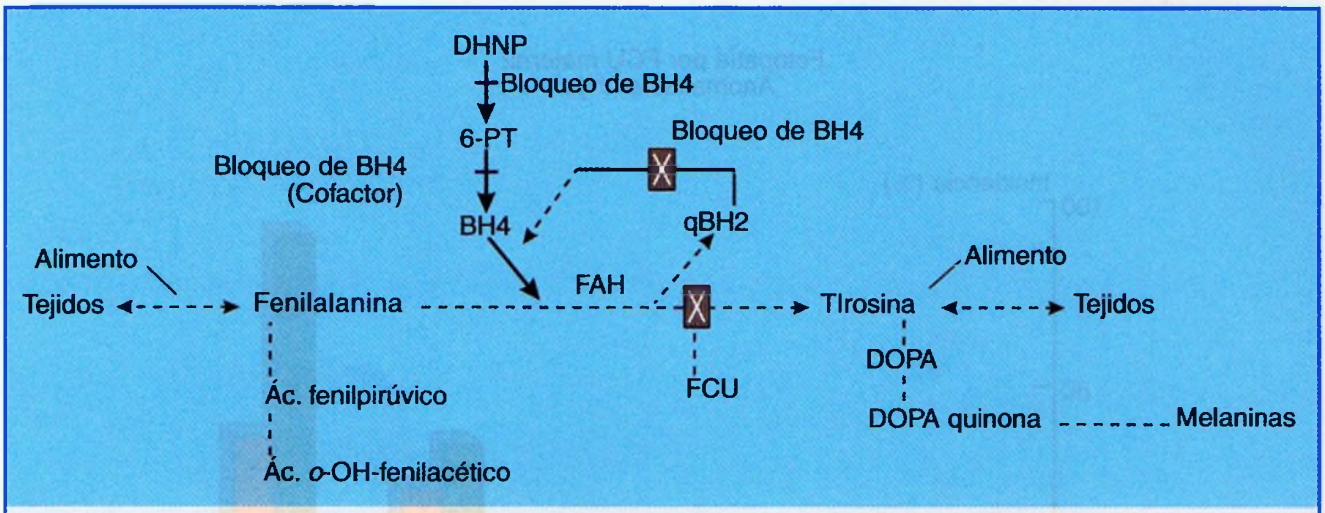


Fig. 14-8. Camino metabólico de la fenilalanina. La conversión de fenilalanina en tirosina requiere la acción de la enzima fenilalanina-hidroxilasa (FAH) y además el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4). A su vez, este cofactor BH4 puede ver bloqueada su síntesis en varios puntos (señalados). El bloqueo, ya sea por inactivación de la FAH o por carencia del cofactor BH4, determina la acumulación de fenilalanina en la sangre y una expansión de la vía catabólica hacia el ácido fenilpirúvico.

(aparecen el ácido fenilpirúvico y el orto-hidroxi-fenilacético) (fig. 14-8).

Además de la FCU clásica por mutación de la FAH, pero con una frecuencia cien veces menor (1 en 10^{-6}) existen bloqueos por ausencia del cofactor *tetrahidrobiopterina* (BH4), que también dan hiper-F-emia pero cuya repercusión neurológica es aún más grave, ya que la BH4 es necesaria también para la hidroxilación de la tirosina y el triptófano en el cerebro.[9,11]

La enzima FAH funcional es un homotetrámero que requiere como un cofactor la pterina no conjugada BH4 o tetrahidrobiopterina (BH4) y el oxígeno molecular. En el curso de la hidroxilación, BH4 es oxidada a BH4 quinonoide (qBH2). Una provisión adecuada de BH4 se mantiene por regeneración a partir del producto qBH2 mediante la actividad catalítica de dos enzimas o a través de una síntesis de novo desde guanosina trifosfato (GTP). La síntesis de BH4 se cumple a través de tres reacciones enzimáticas catalizadas secuencialmente, cada una de las cuales puede ser bloqueada por mutación.

Gen de la fenilalanina-hidroxilasa (*FAH* = *PAH* en inglés)

El gen responsable de la FCU clásica está localizado en el extremo del brazo largo del cromosoma 12 (12q22-q24.1); las mutaciones se comportan como recesivas clásicas. El gen tiene alrededor de 90 kb de extensión, casi toda ocupada por grandes intrones; tiene 13 exones en total, 12 de los cuales son muy cortos y el último (el 13) es el único extenso (892 pb). Todos los exones suman sólo 2,3 kb, de modo que la mayor parte del gen corresponde a intrones (85 kb).[9,12] Esta curiosa organización del gen *FAH* hace que los exones de un centenar de pb estén rodeados de intrones hasta 200 veces mayores en extensión (fig. 14-9).

Han sido informadas más de 500 mutaciones del gen *FAH*,[9] de las cuales un 20% corresponde al exón 7 que codifica el sitio de unión a la BH4 (hay una base de datos asequible vía Internet en http://www.pahdb.mcgill.ca/pahdb). No todas las mutaciones son productoras de FCU, y a su vez, los enfermos de FCU pueden tener cualquiera de un grupo numeroso de mutaciones, alrededor de 20 en muchas poblaciones. La FCU está asociada con una gran heterogeneidad de mutaciones, y se estima que las tres cuartas partes de los enfermos de FCU son heterocigotas *compuestos*, es decir que portan dos alelos mutantes, pero diferentes entre sí. Algunas de las mutaciones usuales entre europeos están asociadas a un único haplotipo definido por PLFR y por SNPs, de modo que estas mutaciones han

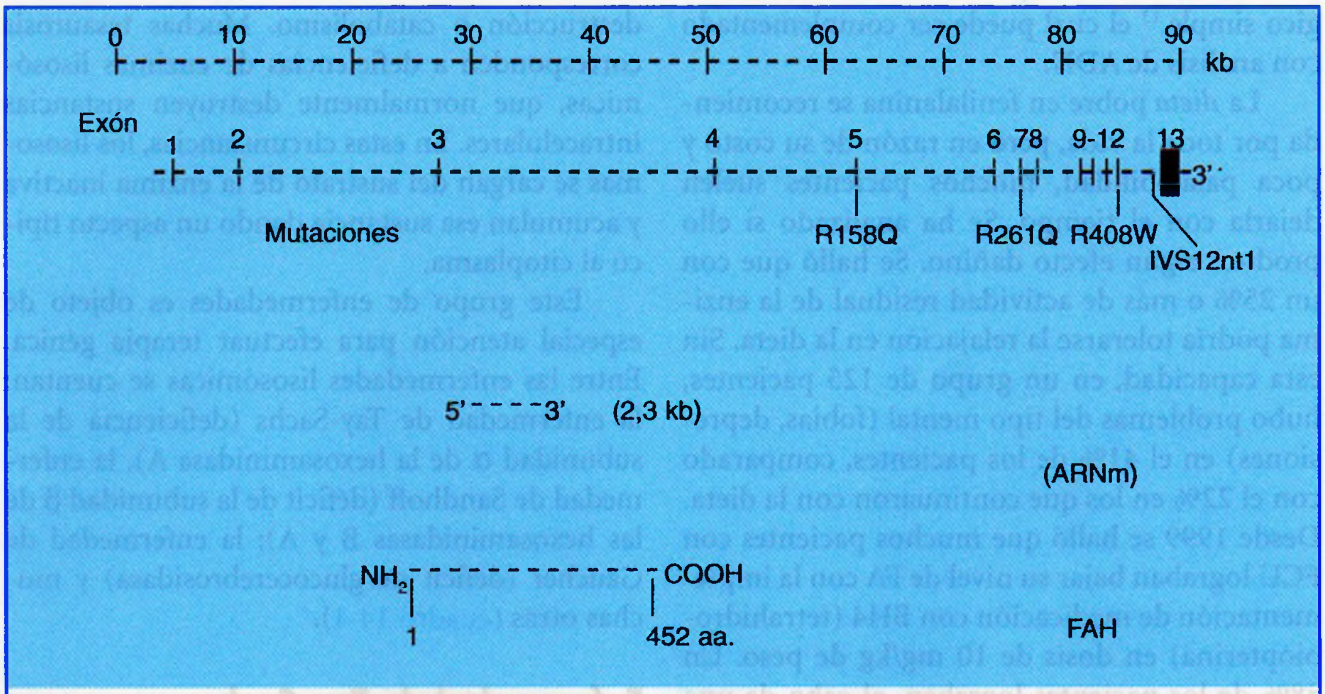


Fig. 14-9. Gen *FAH*, su ARNm y localización de cuatro mutaciones usuales. Los exones, muy pequeños (salvo el #13), están representados por líneas verticales.

podido ser rastreadas a su posible origen (hace cientos de años y hasta decenas de miles de años) en diversos grupos étnicos. Estos análisis del gen *FAH* han mostrado que las poblaciones africanas, a pesar de una menor prevalencia de FCU, muestran la mayor riqueza de variantes, tal como es esperable en el tronco común de la especie humana.[9]

Patogenia y tratamiento de la fenilcetonuria

A pesar de un detallado conocimiento de su genética, la patogenia de la enfermedad no es bien comprendida. En el sistema nervioso de los enfermos hay depleción de neurotransmisores y un proceso de desmielinización. Hay una incuestionable relación entre tasas altas de fenilalanina en el plasma sanguíneo y retraso mental (véase fig. 14-7), pero su mecanismo sigue siendo hipotético. Se ha sugerido que la alta concentración de este aminoácido compite con otros aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas a nivel del sistema nervioso central y con su transporte a través de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, hay hiperfenilalaninemias moderadas o benignas que no cursan con retraso mental.

El tratamiento consiste en una restricción cuidadosa, temprana y permanente de la fenilalanina de la dieta. Debe comenzar en el primer mes de vida y tiene por objetivo mantener el nivel sanguíneo de fenilalanina por debajo de 10 mg/100 mL para impedir la enfermedad, y superior a 3 mg/100 mL para evitar una carencia de este aminoácido esencial. Se ha observado que la interrupción de la dieta pobre en FA, hecha a cualquier edad, provoca disturbios del sistema nervioso; por ello y por el riesgo de fetopatía para las embarazadas, el criterio es continuar la dieta especial de por vida. A su vez, esto crea problemas psicológicos y económicos, por lo cual se investiga la posibilidad de una terapia génica para esta enfermedad. El diagnóstico temprano se basa en la imposición del relevamiento general de recién nacidos, para un pequeño grupo de errores metabólicos, que incluyen la FCU, la galactosemia y la hiperplasia suprarrenal congénita. La detección se realiza mediante la recolección de gotas de sangre sobre papel de filtro, que luego son analizadas por un método microbioló-

gico simple,[13] el cual puede ser complementado con análisis de ADN.

La *dieta* pobre en fenilalanina se recomienda por toda la vida, pero en razón de su costo y poca palatabilidad, muchos pacientes suelen dejarla con el tiempo. Se ha analizado si ello produce algún efecto dañino. Se halló que con un 25% o más de actividad residual de la enzima podría tolerarse la relajación en la dieta. Sin esta capacidad, en un grupo de 125 pacientes, hubo problemas del tipo mental (fobias, depresiones) en el 41% de los pacientes, comparado con el 22% en los que continuaron con la dieta. Desde 1999 se halló que muchos pacientes con FCU lograban bajar su nivel de FA con la implementación de medicación con BH4 (tetrahidrobiopterina) en dosis de 10 mg/kg de peso. Un 58% de los pacientes lograban, al cabo de una dosis de ingestión, un descenso promedio de la FA de 30% o mayor. Los pacientes respondedores corresponden en general a fenotipos menos severos que tienen una cierta actividad enzimática residual, y con mutaciones en los dominios de actividad catalítica, regulatorio, oligomerizante, y ligante de BH4.

Se están ensayando diversas formas de tratamiento sobre la base de reemplazos celulares, en especial hepatocitos aislados, o trasplante hepático; administración parenteral de la FAH; su producción en el organismo mediante vectores virales con el gen *FAH* (terapia génica) y también mediante la administración de *fenilalanina amonio liasa* (una enzima de la levadura *Rhodosporidium toruloides*) que podría consumir el exceso de fenilalanina en el intestino.[14]

Las tesaurosis (enfermedades por acumulación). Enfermedades lisosómicas

Un grupo importante de enfermedades hereditarias se caracteriza por la acumulación de una sustancia específica en tejidos y células. Estas sustancias parecen ser "atesoradas" por el organismo, de allí el nombre de "tesaurosis"; en realidad, la acumulación se debe a una deficiencia en su utilización, transporte y, especialmente, en su destrucción o catabolismo. Muchas tesaurosis corresponden a deficiencias de enzimas lisosómicas, que normalmente destruyen sustancias intracelulares. En estas circunstancias, los lisosomas se cargan del sustrato de la enzima inactiva y acumulan esa sustancia dando un aspecto típico al citoplasma.

Este grupo de enfermedades es objeto de especial atención para efectuar terapia génica. Entre las enfermedades lisosómicas se cuentan: la enfermedad de Tay-Sachs (deficiencia de la subunidad α de la hexosaminidasa A), la enfermedad de Sandhoff (déficit de la subunidad β de las hexosaminidasas B y A); la enfermedad de Gaucher (déficit de glucocerebrosidasa) y muchas otras (cuadro 14-1).

Enfermedad de Tay-Sachs: gangliosidosis de tipo G(M2) (idiocia amaurótica)

Esta enfermedad ocurre principalmente entre poblaciones judías asquenazíes, de Europa oriental, y poblaciones del Canadá francés; en otros grupos humanos es mucho más rara. Dada su presencia en poblaciones bien circunscritas, ha sido objeto de un relevamiento especialmente minucioso y constituye el grupo en el cual se ha intentado, con la mayor intensidad, algún tipo de medidas preventivas.

Esta enfermedad es letal y no tiene tratamiento, lo cual ha contribuido a que el relevamiento de heterocigotas sea eficaz, dado que las comunidades afectadas han tomado conciencia del problema y han organizado la colaboración con las instituciones médicas. Los niños afectados son normales al nacer; el diagnóstico por examen físico es posible desde los 4-6 meses. Hay un retraso del desarrollo, falta de atención visual y aparición de la típica mancha de color cereza en el fondo de ojo (fig. 14-10), alrededor de los seis meses, con hipotonía muscular, incapacidad para mantenerse sentado, dificultad para otros movimientos, hiperexcitabilidad al ruido, convulsiones y signos de ceguera al año. El avance es penosamente inexorable y se llega a un estado vegetativo; fallecen generalmente entre los 2 y los 3 años.

Cuadro 14-1. Enfermedades hereditarias por déficit de enzimas lisosómicas

Enfermedad	Enzima deficiente	Sustancia acumulada
E. de Tay-Sachs	Hexosaminidasa A (α)	Ganglíosido G(M2)
E. de Sandhoff	Hexosaminidasa B, A (β)	Ganglíosido G(M2)
Gangliosidosis generalizada	β-Galactosidasa-1	Ganglíosido G(M1)
E. de Gaucher	Glucocerebrosidasa	Giucocerebrósido
E. de Fabry	α-Galactosidasa A	Trihexósido de ceramida
E. de Niemann-Pick	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Fucosidosis	α-1-Fucosidasa	Glucolípidos
Síndrome de Hurler	α-1-Iduronidasa	Mucopolisacárido
Síndrome de Hunter	Iduronato-2-sulfatasa	Mucopolisacárido
Síndrome de Sly	β-Glucuronidasa	Glucosaminoglucanos
E. de Pompe	α-Glucosidasa	Glucógeno

Patogenia de la enfermedad de Tay-Sachs: deficiencia de hexosaminidasa A (subunidad α)

Esta enfermedad es causada por el déficit de la enzima lisosómica hexosaminidasa A, mientras que una enfermedad muy parecida, la enfermedad de Sandhoff, que no está circunscrita a un grupo racial, es producida por el déficit de las dos hexosaminidasas, A y B (por carencia de la subunidad β). En ambas enfermedades la patogenia es igual; el ganglíosido G(M2) no puede ser degradado en los lisosomas y se acumula en ellos. En la enfermedad de Tay-Sachs la acumulación de G(M2) es visible en las neuronas (más tempranamente en las células granulosas del cerebelo y luego en otros tipos neuronales), mientras que en la enfermedad de Sandhoff, además de estar presente en las neuronas, se acumula globósido en los endotelios y las células del reticuloendotelio. Los lisosomas aparecen agrandados, contienen cuerpos membranosos concéntricos (en catáfila de cebolla) y llegan a desalojar a otros organoides citoplasmáticos. Luego las neuronas mueren y son reemplazadas por glía.

El bloqueo metabólico se produce en el segundo paso del catabolismo de los gangliósidos (fig. 14-11; panel 14-2).

Gen de la hexosaminidasas A (*HEXA*) y su mutación más frecuente

Las dos enzimas, hexosaminidasas A y B, difieren en una subunidad: mientras la hexosa-

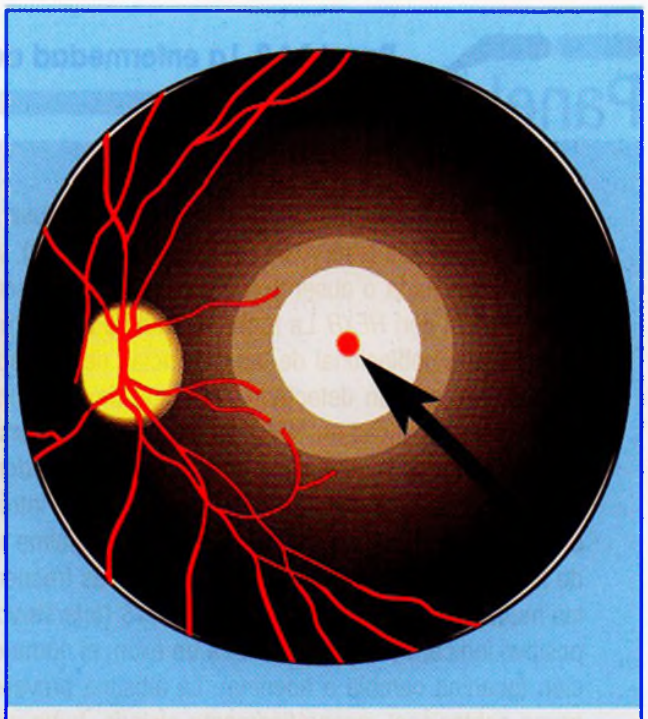


Fig. 14-10. Fondo de ojo en la enfermedad de Tay-Sachs. La flecha señala la mancha cereza, rodeada de un halo blanco, en una etapa avanzada.

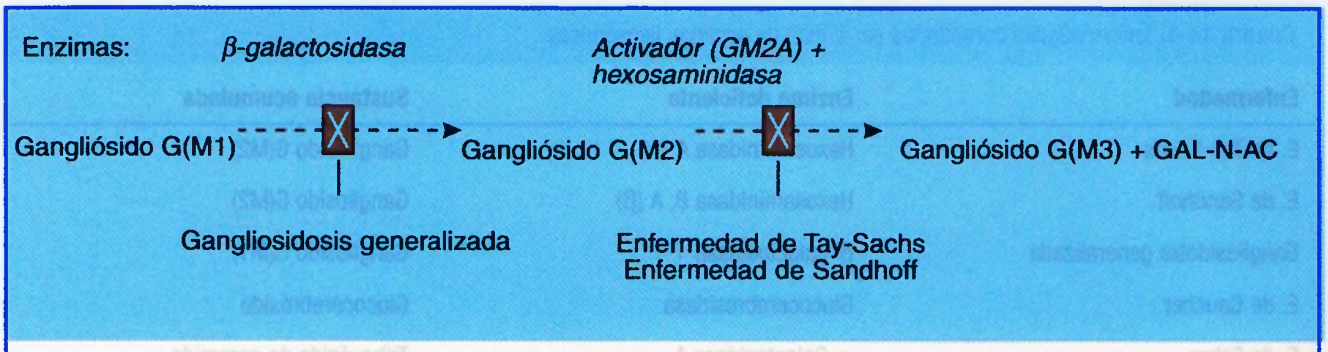


Fig. 14-11. Bloqueo metabólico en las enfermedades de Tay-Sachs y de Sandhoff. GM2A: proteína activadora; GAL-N-AC: N-acetil galactosamina.

minidasa A está formada por las subunidades α y β, la hexosaminidasa B está formada por dos subunidades β. En la enfermedad de Tay-Sachs está alterada la subunidad α y, por consiguiente, la enzima A. La subunidad α está codificada por el gen *HEXA*, localizado en el brazo largo del cromosoma 15 (15q23), mientras que la subunidad β está codificada por el gen *HEXB* en el cromosoma 5 (5q13).[16]

El gen *HEXA* se extiende a lo largo de 40 kb y posee 14 exones, la mayoría cortos, excepto el primero y el último (fig. 14-12).[17] Una mutación, consistente en una inserción de 4 pb, constituye el 80% de los alelos mutados en los heterocigotas judíos asquenazíes. Esta inserción, por cambio del marco de lectura, determina la producción de un codón de terminación a nueve bases de la inserción, en el exón 11, que vuelve inestable al ARN transcripto, el cual se degrada poco después del proceso de corte y empalme y finalmente provoca la ausencia práctica de la subunidad α, por lo cual no puede constituirse la hexosaminidasa A (α-β).

Panel 14-2. La enfermedad de Sandhoff en la Argentina

Panel

La enfermedad de Sandhoff es una tesaurosis grave íntimamente vinculada a la enfermedad de Tay-Sachs: ambas son tesaurosis del ganglíosido G(M2), y en ambas la actividad enzimática de la hexosaminidasa A está disminuida o ausente; pero es en la enfermedad de Sandhoff donde la subunidad β es anormal, por mutación del gen *HEXB*. La forma infantil de la enfermedad de Sandhoff lleva a la muerte antes de los 3 años. En un grupo poblacional de las provincias de Córdoba y La Rioja en la Argentina, en especial en el Valle de Traslasierra, se han detectado 65 casos de enfermedad de Sandhoff (forma infantil) desde la iniciación de pruebas diagnósticas en 1975. La frecuencia de portadores de mutaciones de este gen en el grupo poblacional estudiado se ha estimado en 1 cada 26 pobladores. El análisis del ADN en 130 pobladores ha mostrado una alta frecuencia de una mutación única en el intrón 2 del gen *HEXB*, que afecta la señal para empalme en el primer nucleótido del intrón y lleva a un empalme aberrante del ARN y, por consiguiente, a una disminución de la actividad enzimática.[15] La mutación más frecuente es IVS-2 +1 G→A; de acuerdo con la nomenclatura, las mutaciones en intrones se inicialan IVS (*InterVening Sequence*), luego siguen el número del intrón, el signo positivo indicando que continúan a un exón, el número del nucleótido luego del fin del exón, y el tipo de mutación (guanina cambia a adenina). La altísima prevalencia de esta mutación (30 de 31) sugiere que en este grupo poblacional, geográficamente aislado, hubo un "efecto fundador", es decir, el establecimiento de una nueva población por unos pocos individuos "fundadores", algunos de los cuales eran portadores de la mutación y han llevado a una transmisión predominante de esta mutación.[15]

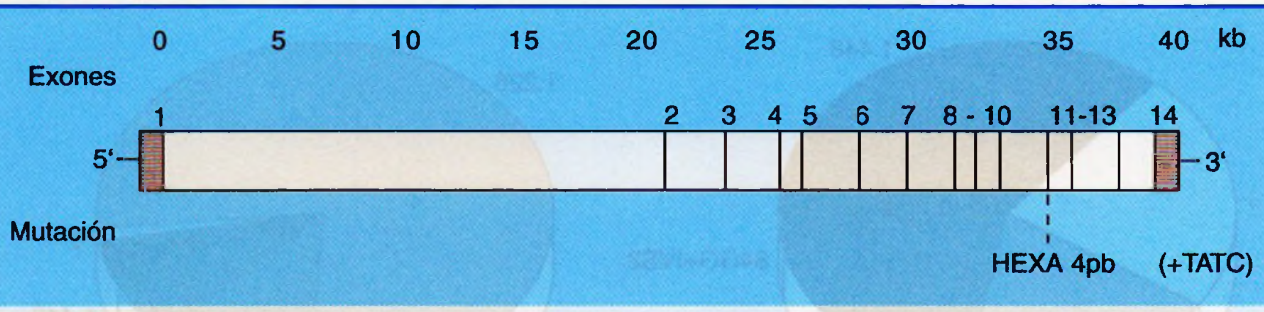


Fig. 14-12. Gen *HEXA* y localización de la mutación más frecuente en el exón 11.

Relevamiento de portadores y diagnóstico prenatal

A diferencia de la galactosemia y la FCU, no hay tratamiento para esta enfermedad fatal y catastrófica para los parientes del afectado. Esto ha movilizado a las comunidades judías asquenazíes (en las que hay un portador cada 40 individuos) a organizar su propio relevamiento genético, mediante el dosaje de la actividad de la hexosaminidasa A en el suero. Tal relevamiento se hace sobre la base de ser *voluntario* y entre adultos que dan su consentimiento escrito, para la detección de heterocigotas. Éstos tienen una sustancial reducción de la actividad HEXA en el suero y pueden ser detectados con razonable seguridad.[18] Las medidas preventivas han llevado a una disminución muy grande del número de afectados.

La enfermedad de Gaucher: problemas de relevamiento y terapia

La enfermedad de Gaucher es otra tesaurosis lisosómica, debida a una deficiencia de la enzima *glucocerebrosidasa* (β-glucosidasa) que lleva a una acumulación de glucocerebrósido (glucolípido), especialmente en los macrófagos y rara vez en el tejido nervioso. A raíz de esa acumulación en los macrófagos, se desarrollan hepatomegalia y esplenomegalia; también puede haber lesiones óseas por el aumento del volumen de la cavidad medular y resorción de mineral, con dolores osteoarticulares. La forma más común es la enfermedad benigna en el adulto (porque sólo se diagnostica en esa etapa de la vida al no haber síntomas significativos en la niñez). La forma aguda infantil es la más grave, con disturbios neurológicos y gran hepatoesplenomegalia. El gen de la β-glucosidasa (GBA) se localiza en el cromosoma 1 (1q21), contiene 11 exones y su transcripto es de 7,25 kb. A 16 kb más abajo (en dirección 3') del gen se encuentra un seudogén con gran homología, originado en una duplicación del gen, y que no es funcional por carecer de un marco de lectura abierto de suficiente longitud.[19] Mediante el análisis del ADN se han descrito 24 mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, y seis mutaciones por entrecruzamiento entre el gen y el seudogén.[19] Las mutaciones se distribuyen en forma muy diferente entre las poblaciones judías y las no judías (fig. 14-13).

La diversidad de mutaciones en la enfermedad de Gaucher y, sobre todo, la variabilidad de la gravedad de esta afección, desde muy benigna o benigna (lo más corriente) hasta formas graves agudas (relativamente raras), plantean problemas para la realización de relevamientos de heterocigotas; a ello se suma la dificultad para separar con certeza los heterocigotas de los normales por medio del dosaje de actividad enzimática.

Esto ha hecho que no exista la base de consenso necesaria como para intentar un relevamiento genético; incluso, aun contando con la información de los genotipos, sería incierto el beneficio que pueden lograr los grupos afectados, a diferencia de lo que sucede en la enfermedad de Tay-Sachs.

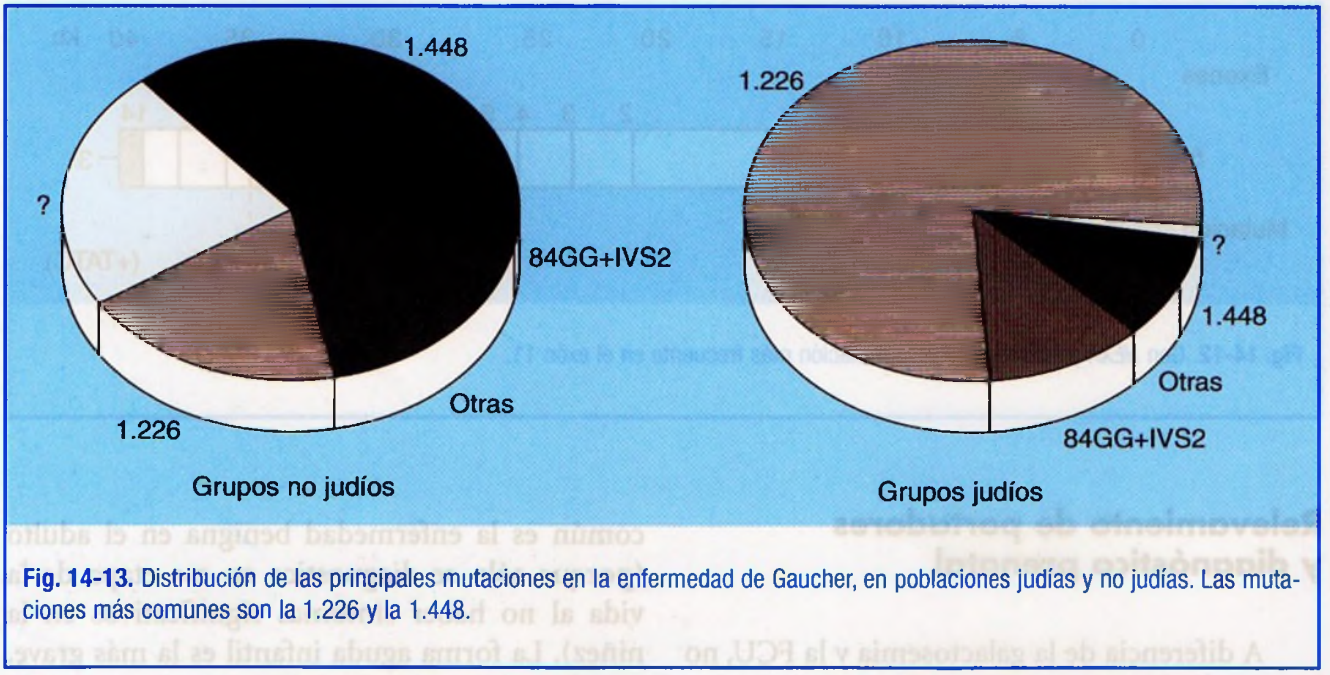


Fig. 14-13. Distribución de las principales mutaciones en la enfermedad de Gaucher, en poblaciones judías y no judías. Las mutaciones más comunes son la 1.226 y la 1.448.

Por otra parte, el tratamiento de esta enfermedad suscita, en la actualidad, un problema económico. La terapéutica más eficaz es la provisión de la enzima faltante (glucocerebrosidasa) modificada (con más residuos de manosa) para incrementar su captación por los macrófagos. Lamentablemente, se ha calculado que los costos de este tratamiento para la población de enfermos en los Estados Unidos serían prohibitivos. Por ello, se busca un tratamiento de terapia génica que reemplace células de la médula ósea, con sustitución del gen anormal.

Síndrome de Hunter: tesaurosis por mutación puntual o recombinación ilegítima

Este síndrome (mucopolisacaridosis de tipo II; el tipo I corresponde al síndrome de Hurler) se debe a una mutación ligada al sexo, que provoca el déficit de la enzima lisosómica iduronato-2-sulfatasa (IDS) y lleva a la acumulación de sulfatos de heparina y de dermatano en los lisosomas. Los signos característicos son: enanismo, aspecto rechoncho y grueso de la cara y los miembros, con nariz aplanada y labios gruesos (gargolismo), cifosis, rigidez articular, hepatoesplenomegalia y sordera. Los niños (varones) afectados pueden mostrar retraso mental y una variedad amplia en la gravedad de los síntomas, aunque la mayoría no sobrevive a la segunda década.

El gen de IDS está localizado en Xq28, pero además se ha hallado un segundo locus relacionado: IDS-2, que está localizado cerca (a 90 kb) y en dirección al telómero del X.[20] Este segundo locus no es un gen completo, sino que posee secuencias homólogas a los exones 2 y 3 del gen IDS, y a los intrones 2, 3 y 7.[20] El gen propiamente dicho contiene nueve exones y se extiende a lo largo de 19 kb. Se ha observado que el locus IDS-2 posee una secuencia que tiene hasta un 100% de homología con el intrón 7 del gen; esta homología parece favorecer un reordenamiento entre el locus IDS-2 y el gen, responsable de la inversión y ruptura del gen y de la producción del síndrome de Hunter en un 13% de los casos [20] (fig. 14-14).

El origen de este síndrome es, por consiguiente, doble: por un lado, hay mutaciones puntuales que provocan la ausencia de la enzima activa; por otro, la recombinación homóloga pero ilegítima entre el gen IDS y el locus IDS-2 produce la fragmentación del gen y la pérdida de la enzima. Hay indicios de que esta recombinación ilegítima e intracromosómica ocurre sólo en la meiosis masculina. Esto es de esperar, dado que en la meiosis espermatocítica, el extremo del

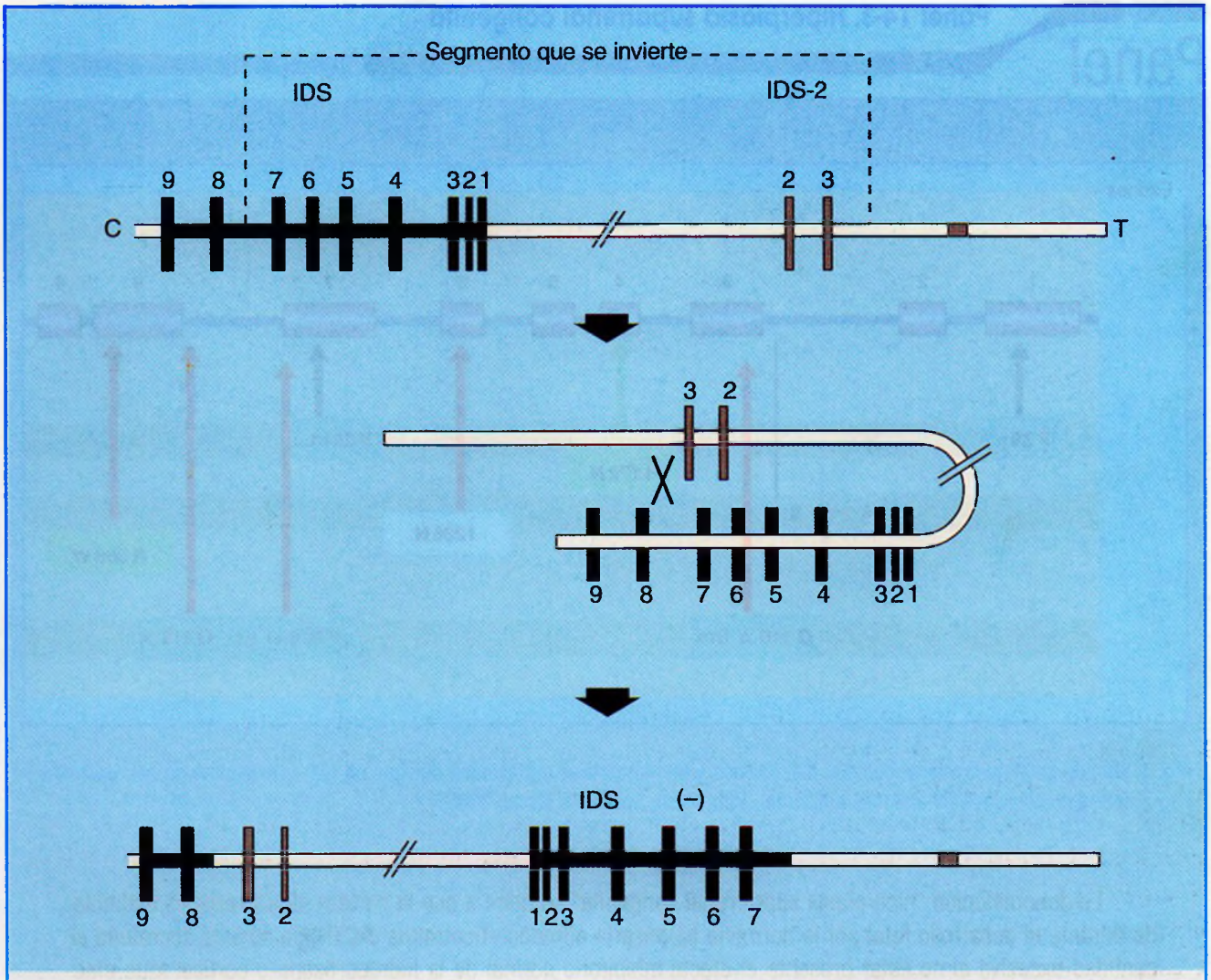


Fig. 14-14. Esquema de la recombinación intracromosómica (del X) entre el gen *IDS* y el locus IDS-2, cuyo resultado es la fragmentación e inversión del gen *IDS* (modificado de Bondeson ML y col., 1995).

brazo largo del X está libre de apareamiento (excepto la diminuta segunda región seudoautosómica, véase cap. respectivo) y es factible un autoapareamiento como el postulado para producir este reordenamiento.

Hiperplasia suprarrenal congénita. Déficit de 21-hidroxilasa (panel 14-3)

El camino metabólico de las hormonas esteroideas es un ejemplo de los bloqueos genéticos en cada paso (fig. 14-15). De todos los bloqueos genéticos, el de mayor importancia por su frecuencia es el déficit de la 21-hidroxilasa, determinante de la principal forma de hiperplasia suprarrenal congénita, con la consiguiente virilización en las niñas.

Esta hiperplasia suprarrenal puede manifestarse sólo como una alteración genital, de allí el nombre de "síndrome adrenogenital" o puede estar acompañada de pérdida de sal. Si bien afecta a los dos sexos, su manifestación más ostensible ocurre en las niñas, en quienes se observa virilización; en los varones puede presentarse como una falsa pubertad precoz. En las niñas, la virilización de los genitales (seudohermafroditismo femenino) puede tener grados muy variables; cuando es mayor, hay hipertrofia del clítoris, la uretra desemboca en el clítoris y la vagina es atrésica; hay desarrollo de vello en el pubis y las axilas muy tempranamente. El crecimiento de

Panel

Panel 14-3. Hiperplasia suparrenal congénita

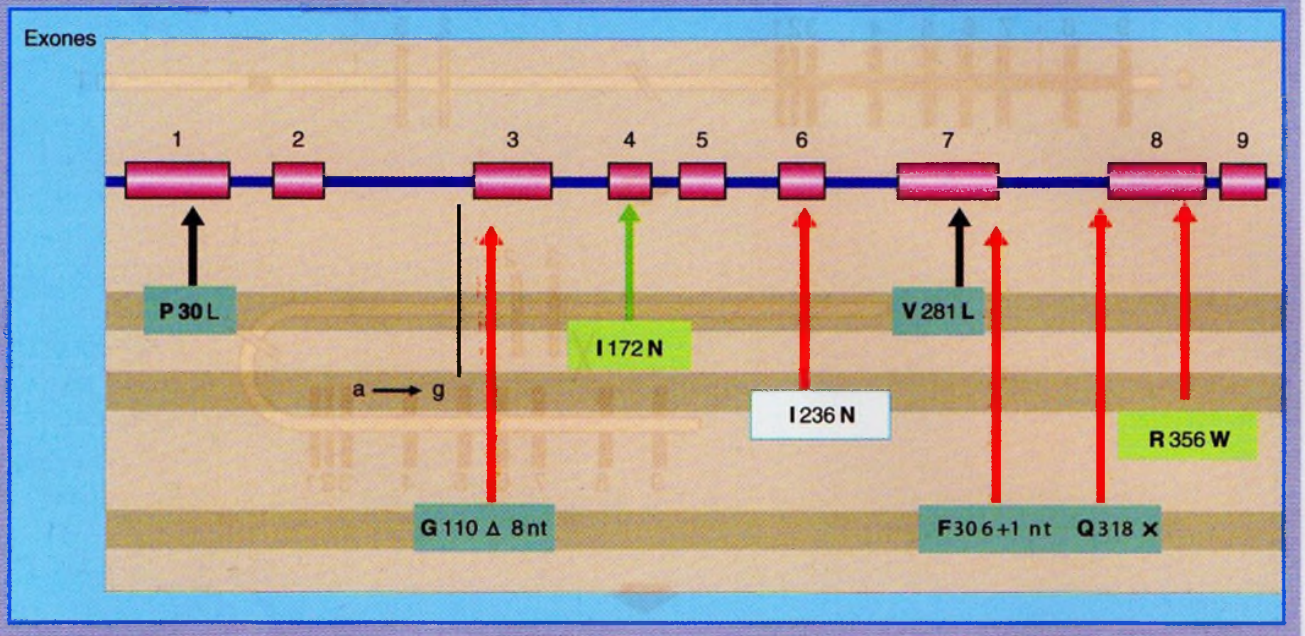


Fig. 1. Gen de la 21-hidroxilasa, con sus diez exones y las principales mutaciones (flechas en rojo, perdedoras de sal; flechas en negro, forma no clásica; flecha verde, virilizante). Tomado de Speiser & White, 2003.[23]

La denominación "hiperplasia suprarrenal congénita" se debe a que la corteza suprarrenal es estimulada durante el desarrollo fetal por la hormona hipofisaria adrenocorticotrofina (ACTH), la cual es secretada en cantidad excesiva al no estar presente el efecto inhibitorio normal de la hidrocortisona o cortisol (que efectúa una retroalimentación negativa), lo cual produce mayor crecimiento de la glándula, y el desvío de las vías metabólicas hacia la producción (excesiva) de andrógenos, principalmente la androstenodiona, que luego puede convertirse en testosterona (en la periferia). Por otra parte, como consecuencia del déficit (variable) de aldosterona, puede haber una pérdida exagerada de sal (sodio), y por el exceso de andrógenos, en un feto femenino se produce una virilización en el desarrollo de los órganos genitales externos. Según sea el grado de este último proceso, la niña podrá nacer con "ambigüedad sexual", de severidad variable. A esta situación se la llamaba antiguamente "seudohermafroditismo femenino" o "síndrome adrenogenital" por presentarse una ambigüedad más o menos intensa en los genitales externos, pero sin afectar las propias gónadas. Actualmente se prefiere la denominación hiperplasia suprarrenal congénita.

Este síndrome se manifiesta fundamentalmente en tres variedades: 1) la forma clásica más grave o "perdedora de sal" que se presenta en recién nacidos de ambos sexos y, si no es diagnosticada a poco de nacer, puede producir un cuadro grave de deshidratación, desequilibrio salino y shock, 2) la forma clásica virilizante simple que no afecta la excreción salina y se limita a la ambigüedad genital en las niñas y una precocidad seudopuberal en los varones, y 3) la forma no clásica u "oculta" que se manifiesta más tardíamente con características virilizantes en las niñas (hirsutismo, hipertrofia de clítoris, caída de cabello, acné) o con pubertad temprana en los varones. Otras manifestaciones posibles son una estatura adulta por debajo de lo normal, fertilidad reducida y poliquistosis ovárica en las mujeres.

Desde que se realiza en muchos países la detección neonatal de esta alteración, se ha estimado la frecuencia de la HSC en recién nacidos en 1/10.000 a 1/23.000. Del total de casos que se llegan a detectar al nacer, hay una predominancia de niñas (~ 60-40%) debido a que la ambigüedad genital es inmediatamente aparente. Se estima que un 12% de los casos de forma clásica no se detecta, en su mayoría en varones. En

cuanto a la forma no clásica, es más difícil estimar prevalencia real, ya que muchos de ellos no son detectados, aun en lugares donde se utiliza la pesquisa neonatal.[23]

Las mutaciones que originan esta alteración hereditaria son de múltiples tipos: diversos autores han estimado el número total descrito en más de 60.[23] Se estimó que unos dos tercios a tres cuartas partes de las mutaciones de las formas clásicas corresponden a la forma perdedora de sal, y las restantes a la forma virilizante. En cuanto a la forma no clásica, las cifras varían mucho porque no todos los casos son detectados.

Las mutaciones más frecuentes son las deleciones grandes producidas por el entrecruzamiento (*cross-over* meiótico) desigual o por la conversión génica y producen deleción de los exones 1, 2 y 3 o bien de los exones 1 al 7. Ambas constituyen un 90-95% de los casos de la forma clásica. Las mutaciones puntuales también pueden deberse a la conversión génica al introducir en el gen normal las mutaciones ya contenidas en el seudogén. Sus frecuencias relativas varían según las poblaciones estudiadas.

El tratamiento universalmente reconocido, sobre todo para las formas clásicas, es la administración de glucocorticoides: en los niños pequeños se prefiere la hidrocortisona (cortisol) que es el que mejor inhibe el exceso de secreción de ACTH por la hipófisis. En los niños mayores y en adultos se prefiere la dexametasona u otros fármacos sintéticos cuya acción es más prolongada. La corrección quirúrgica de los genitales malformados constituye un recurso importante; hay activos debates con respecto a la mejor época para realizarla considerando el impacto psicológico sobre la niña y su familia, y también se debaten las diversas técnicas quirúrgicas. Adecuadamente tratados, la gran mayoría de los pacientes logran una vida normal, tanto desde el punto de vista físico como psíquico y aproximadamente la mitad de las pacientes logran una capacidad reproductiva satisfactoria.

Cuando se asesora a una pareja en la que ambos miembros son portadores, debe tenerse en cuenta, en lo posible, el tipo de mutación que llevan, ya que en casos de ser heterocigotas para mutaciones diferentes, el pronóstico para el descendiente depende sobre todo de la mutación más "benigna". Así y todo, al decidir esta pareja tener un niño, podrá ofrecérseles un tratamiento preventivo con corticoides durante el primer trimestre, apenas confirmado el embarazo. Luego se programa un diagnóstico prenatal para determinar el sexo, y si éste es femenino se trata de determinar un diagnóstico molecular de la posible mutación. Únicamente se continúa con los corticoides si el sexo es femenino (y si el resultado molecular es positivo para una mutación de la forma clásica). Se están investigando otras formas de tratamiento que pudieran reemplazar los actualmente existentes (combinación de corticoides con antiandrógenos y terapia génica).[23]

la talla es precoz, pero dada la soldadura también precoz de los cartílagos de crecimiento, el resultado final es la estatura baja.

Cuando el síndrome se acompaña de pérdida de sal, puede haber deshidratación, acompañada de hipernatriuria e hipercloruria. En la sangre hay hiperpotasemia con alteraciones del electrocardiograma. El tratamiento habitual se realiza con glucocorticoides.

Patogenia de la hiperplasia adrenal congénita (síndrome adrenogenital)

El bloqueo más frecuente está dado por el déficit de 21-hidroxilasa, y por este bloqueo disminuye la síntesis de cortisona (glucocorticoide) y de aldosterona (mineralocorticoide), pero queda libre la vía de síntesis de andrógenos. La deficiencia de glucocorticoide estimula a la hipófisis a producir un exceso de hormona adrenocorticotrófica (ACTH), dado que el nivel de cortisona en sangre, por retroalimentación negativa, regula la producción hipofisaria de ACTH. La hipersecreción de ACTH desata la enfermedad: se estimula la síntesis de cortisona hasta el paso bloqueado, y el exceso de productos previos al bloqueo toma parcialmente la vía androgénica, por lo cual resulta un nivel excesivo de andrógenos capaz de virilizar el feto femenino y continuar esta virilización durante la niñez.

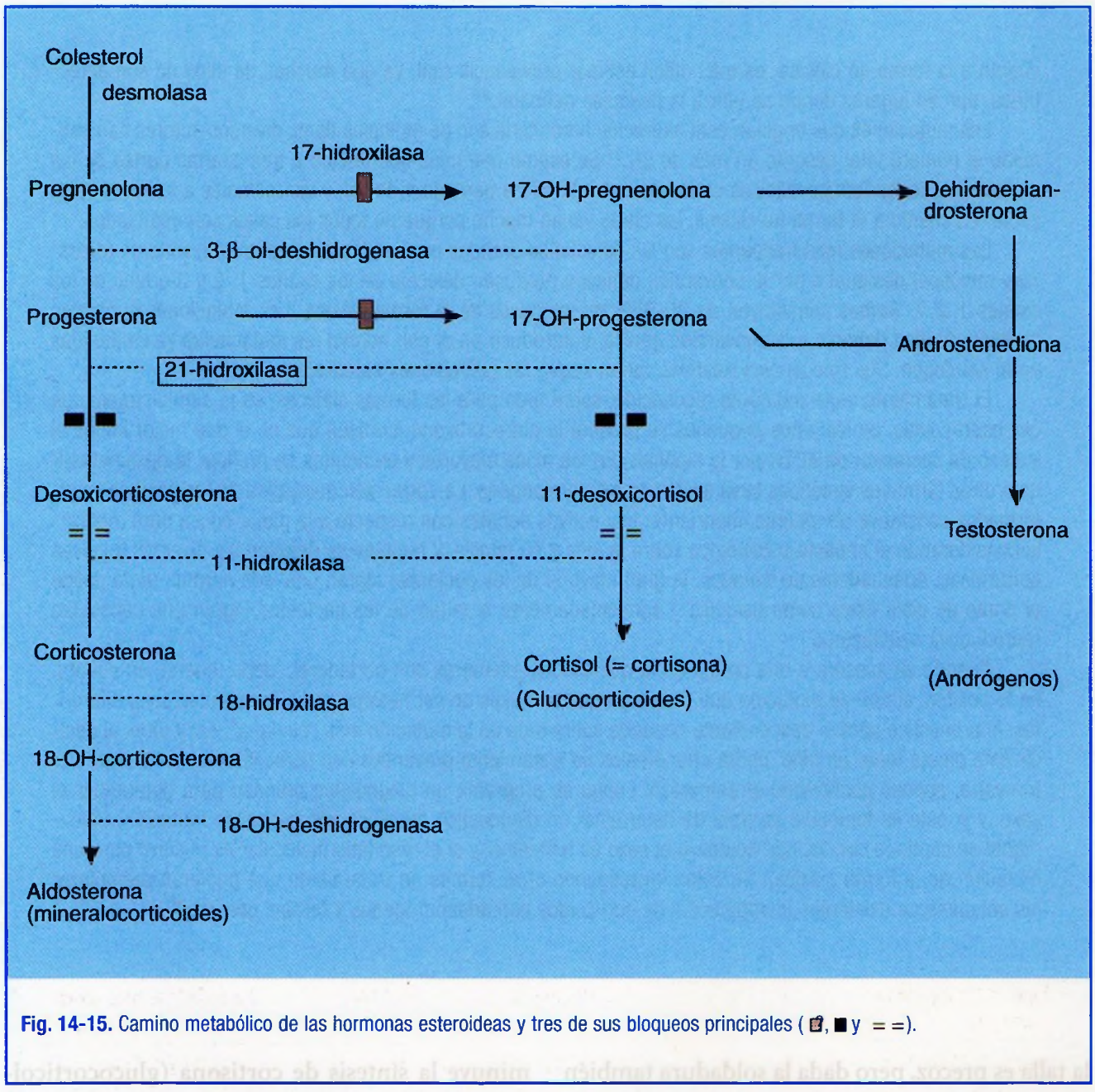


Fig. 14-15. Camino metabólico de las hormonas esteroideas y tres de sus bloqueos principales (, ■ y = =).

Gen de la 21-hidroxilasa: CYP21B. Mutaciones

El gen de la 21-hidroxilasa se localiza en el cromosoma 6 (6p21.3), dentro de la región correspondiente al "complejo mayor de histocompatiblidad" = antígeno leucocitario humano, HLA (uno de los segmentos génicos básicos del sistema inmunitario), aunque esta asociación parece fortuita. Este gen, llamado *CYP21B* (citocromo P, hidroxilasa 21, B), tiene aproximadamente 3 kb y está compuesto por 10 exones; su ARN transcripto codifica una proteína de 494-495 aa.[21,22] El gen está dentro de un segmento de 30 kb, que además contiene el gen de la proteína de complemento C4 del suero y un gen X de función desconocida. Este segmento de 30 kb está repetido en tándem, pero sólo el segmento B es funcional respecto del gen *CYP21B*; el gen repetido *CYP21A* no es funcional (aunque se transcribe) y es equiparable a un seudogén. La importancia de este seudogén es que da lugar a una parte significativa de los errores génicos causantes del déficit de la 21-hidroxilasa. Estos errores

Panel 14-4. Pesquisa genética neonatal

Panel

El origen de la pesquisa en recién nacidos se ubica en los años 60 del siglo xx, cuando el doctor R Guthrie, pediatra, desarrolló una prueba simple para detectar fenilcetonuria en neonatos (FCU).[1] Esto coincidió con publicaciones presentadas poco tiempo antes, demostrando que la FCU podía ser tratada eficazmente con dieta pobre en fenilalanina, desde los primeros días posnatales.

Poco tiempo después, al haberse perfeccionado y simplificado los métodos para descubrir el hipotiroidismo neonatal, y mostrado su tratamiento sencillo con hormona tiroidea por vía bucal, se han añadido las determinaciones correspondientes, junto a la prueba de la FCU.

En los años 70, en varios países y regiones se fueron adoptando medidas legislativas que hacían obligatorias tales pruebas (salvo expresa negativa de los padres) y gratuitas en todos los niños nacidos en las maternidades oficiales, y posteriormente también en las privadas.

La Argentina adoptó mediante dos leyes en los años 80 y 90, la pesquisa neonatal para estas dos alteraciones. En 2007 fue promulgada la ley 26.279 que amplió esta obligación a estudios para detectar enfermedades como la fenilcetonuria, hipotiroidismo, hiperplasia suprarrenal congénita, deficiencia de biotinidasa, fibrosis quística y tres enfermedades no genéticas (Chagas, sífilis y retinopatía del prematuro).[2] Las pruebas neonatales actualmente aplicadas en la Argentina y en muchos otros países, son primordialmente métodos bioquímicos sumamente precisos, y no son habitualmente análisis de biología molecular ni de citogenética.

Cuadro 1. Frecuencias, métodos de medición y medidas terapéuticas. RIA: radioinmunoensayo; Rx: tratamiento.

Enfermedad	Prevalencia	Positividad	Sensibil.	Comentario
FCU (fenilalanina)	9×10^{-5}	FA > 6 mg/dL	~100%	Rx. Dieta. Muy fiable
Hipotiroidismo congénito	3×10^{-4}	TSH >10µg	97%	No detecta hipotir. de origen central. Rx T4
Fibrosis quística	3×10^{-4}	Tripsinóg/RIA	95%	No detecta formas raras
Galactosemia	2×10^{-5}	GALT	98%	Rx. Dieta fiable
Hiperplasia suprarrenal congénita	$4\text{-}10 \times 10^{-5}$	> OHprogest.	~100%	No detecta formas raras Rx. Cortisol o sucedáneo
Déficit de biotinidasa	$\sim 1 \times 10^{-5}$	< 10-30%	~100%	Rx. Biotina 5-10 mg
Sordera uni- / bilateral	1,3-1,9%	Estimul. acúst.	92%	No incluida en la ley

Cada determinación presenta sus propias dificultades y desafíos. Es deseable que la sensibilidad de cada prueba sea elevada (para no dejar pasar falsos negativos), aunque con ello la especificidad podrá ser baja (muchos falsos positivos). La confirmación o no de un resultado positivo se aclararará con pruebas repetidas, o con otros métodos más precisos (pero más costosos, por lo cual no pueden usarse para la pesquisa).[3,8]

Una enfermedad grave y potencialmente tratable, congénita o evidenciada en los primeros años de vida, es la sordera neurosensorial, presente en un 1-2% de neonatos y hasta un 2,7% a la edad de 4 años. Hay estudios altamente convincentes de que su inclusión sería deseable.[9] Su aplicación en lactantes implica una infraestructura más compleja.

En otros países y continentes se incluyen pruebas neonatales para enfermedades que se presentan con mayor frecuencia entre ellos, como por ejemplo la anemia drepanocítica (o falciforme) en poblaciones mayoritariamente de origen africano; las talasemias en la región mediterránea y en el sur de Asia; la enfermedad de Tay-Sachs y algunas formas de la de Gaucher entre los judíos de origen asquenazí (originariamente de Europa oriental).

son: deleciones del gen funcional (*CYP21B*), productos de recombinación desigual, conversiones génicas, por copia a partir del seudogén, y finalmente, mutaciones puntuales propias del *CYP21B* (pocas).

Otros errores hereditarios del metabolismo

La mayoría de los pasos de los caminos metabólicos pueden alterarse por causa genética. En general, estos errores se ajustan a algunos de los modelos expuestos con anterioridad. Algunos de estos errores no se constituyen en enfermedades, sino que simplemente son singularidades bioquímicas, como el caso de la alcaptonuria, en el que no hay síntomas, o son leves (véase panel 14-1). Otras son raras o muy raras, pero todas expresan el bloqueo, parcial o total, de un paso metabólico, con lo cual ayudan al estudio de la regulación bioquímica en el organismo (cuadro 14-2).

Cuadro 14-2. Algunos bloqueos metabólicos por mutación en la especie humana

Enfermedad o rasgo	Enzima involucrada	Tratamiento
Fructosuria esencial	Fructoquinasa	Innecesario
Pentosuria esencial	Xilitol-oxidorreductasa	No posee
Fructosemia	Fructosa-1-P-aldolasa	Dietético
Glucogenosis I (enf. de von Gierke)	Glucosa-6-fosfatasa hepática	Dietético (pobre)
Glucogenosis II (enf. de Pompe)	α 1-4-glucosidasa lisosómica	No eficaz
Glucogenosis III (dextrinosis)	Amilo-1-6-glucosidasa	Dietético
Glucogenosis IV	Enzima ramificante	No eficaz
Glucogenosis V (enf. de McArdle)	Fosforilasa del músculo	No eficaz
Glucogenosis VI (enf. de Hers)	Fosforilasa hepática	No eficaz
Tirosinemia	Fumaril-acetoacetato hidroxilasa	No eficaz
Alcaptonuria	Oxidasa del ácido homogentísico	Innecesario
Albinismo (tipo tirosinasa neg.)	Tirosinasa	No posee
Leucinosis	Descarboxilasa	Dietético (pobre)
Homocistinuria	Cistationina-β-sintetasa	Dieta, piridoxina
Histidinemia	Histidasa	Innecesario
Enf. de Sanfilippo (4 tipos)	Heparán-N-sulfatasa (y otras 3)	No posee
Enf. de Morquio (1 tipo)	Galactosamino-6-S-sulfatasa	No posee
Síndr. de Maroteaux-Lamy	Aril-sulfatasa B	No posee

RESUMEN

Los caminos metabólicos por medio de los cuales el organismo sintetiza las sustancias necesarias y destruye y evacua las innecesarias son bien conocidos en el aspecto bioquímico; en cada uno de sus pasos interviene una enzima o una proteína reguladora, que puede ser afectada por una o más mutaciones génicas, las cuales provocan una anormalidad en ese camino. Los "errores congénitos del metabolismo" se deben a estas mutaciones y abarcan casi todos los pasos de la totalidad de los caminos metabólicos, excepto los más básicos (que no se observan como fenotipos pues son letales tempranamente). Estas enfermedades se desarrollan cuando la actividad de la enzima involucrada falta totalmente o está muy disminuida, ya sea porque la proteína no se produce, ha perdido actividad catalítica o no se une al sustrato o a cofactores. Las enfermedades metabólicas tienen una herencia *recesiva* bien definida, dado que la proteína anormal no interfiere con la función de la normal y, por consiguiente, los heterocigotas son sanos. El desarrollo de estas enfermedades obedece a varios mecanismos: ausencia de un producto final; acumulación de un metabolito previo al bloqueo; utilización preponderante de una vía metabólica secundaria, y modificación de un equilibrio regulatorio debido al exceso o la falta de uno de los productos. Se exponen en detalle algunas enfermedades prototípicas de estos errores congénitos del metabolismo. La *galactosemia* es una enfermedad grave del lactante por déficit de la enzima GALT (uridiltransferasa), en la cual el metabolito previo (galactosa-1-P) se acumula hasta provocar efectos tóxicos, y además el catabolito galactitol afecta el cristalino (cataratas). El gen *GALT*, localizado en el cromosoma 9, posee 11 exones y codifica el monómero de la enzima GALT de 43 kDa. Se conocen más de 180 mutaciones distintas de este gen, pero la más común es la que afecta el aminoácido 188 (transición A-G). El tratamiento dietético (restricción de lactosa) es muy eficaz, excepto para prevenir la displasia ovárica y los trastornos de aprendizaje. La *fenilcetonuria* es una enfermedad importante, determinante de retraso mental, debida al déficit de la fenilalanina-hidroxilasa (FAH), que provoca una acumulación de fenilalanina en la sangre y una utilización excesiva del camino catabólico productor de ácido fenilpirúvico. El gen *FAH*, en el cromosoma 12q22, de 90 kb de extensión y 13 exones con sólo 2,3 kb codificantes, está sujeto a más de 500 mutaciones, de las cuales cuatro son más comunes en la raza blanca. Cada mutación puede ser ubicada en un grupo humano y algunas se han rastreado a sus orígenes históricos. El tratamiento basado en restricción dietaria de la fenilalanina ha sido exitoso, pero debe mantenerse de por vida.

Las tesaurosis ocurren generalmente por bloqueos de enzimas lisosómicas. La *enfermedad de Tay-Sachs* es una tesaurosis de gangliósido G(M2) por déficit de la enzima hexosaminidasa A (HEXA), letal y sin tratamiento, que afecta a ciertos grupos raciales. El gen *HEXA*, en el cromosoma 15, de 40 kb y 14 exones, codifica la subunidad α de la hexosaminidasa A; sus mutaciones impiden la formación del heterodímero enzimático. Una inserción de 4 pb (TATC) es la más frecuente. Esta enfermedad se ha prestado al mayor relevamiento poblacional de heterocigotas, con medidas preventivas eficientes. En la *enfermedad de Gaucher*, tesaurosis de glucocerebrósido por déficit de glucocerebrosidasa, no ha sido posible el relevamiento por la heterogeneidad de formas clínicas y por la inseguridad de detección de los heterocigotas. El gen de la enzima, localizado en 1q21, tiene 11 exones y hay descritas más de 24 mutaciones diferentes, que a su vez tienen distribuciones distintas entre judíos y no judíos. Su tratamiento por reposición enzimática no es económicamente factible. El *síndrome de Hunter* (ligado al sexo) es una tesaurosis de mucopolisacáridos por déficit de la enzima iduronato-2-sulfatasa. El gen *IDS* se localiza en Xq28, tiene nueve exones extendidos sobre 19 kb y se encuentra cerca del locus IDS-2, que es una copia incompleta del gen. Las recombinaciones entre el gen *IDS* y el locus IDS-2 dan lugar a deleciones y cambios de secuencias responsables de una parte significativa del síndrome de Hunter. El déficit de la 21-hidroxilasa esteroidea se encuentra en la hiperplasia suprarrenal congénita, en la cual por el bloqueo de la síntesis de corticoides adrenales, se utiliza excesivamente la vía sintética de andrógenos, que provoca la virilización fetal y posnatal de las niñas afectadas. El gen *CYP21B* se encuentra en un segmento duplicado en el cromosoma 6, y las recombinaciones ilegítimas y las conversiones génicas entre el gen funcional (B) y el segmento afuncional duplicado (A) producen la mayor parte de las deleciones y cambios responsables de este déficit.

REFERENCIAS

1. Fernández Cañön JM, Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, Renedo M, Fernández-Ruiz E, Peñalva MA, et al. The molecular basis of alkaptonuria. Nature Genet 1996;14:19-24.
2. Suzuki M, West C, Beutler E. Large-scale molecular screening for galactosemia alieles in a panethnic population. Hum Genet 2001;109:210-215.
3. Levy HL, Sepe SJ, Shi VE, et al. Sepsis due to *Escherichia coli* in neonates with galactosemia. N Engl J Med 1977; 297:823.
4. Holzel A. Galactosemia. Brit Med Bull 1961;17:213-216.
5. Reichardt JKV, Woo SLC. Molecular basis of galactosemia: Mutations and polymorphisms in the gene encoding human galactose-1-phosphate uridyl transferase. Proc Nat Acad Sci USA 1991;88:2633-2637.
6. Leslie ND, Immerman EB, Flach JE, Florez M, Fridovich-Keil JL, Elsas LJ. The human galactose-1-phosphate uridyl transferase gene. Genomics 1992;14:474-480.
7. Elsas LJ, Langley S, Steele E, Evinger J, Fridovich-Keil JL, Brown A, et al. Galactosemia: a strategy to identify new biochemical phenotypes and molecular genotypes. Amer J Hum Genet 1995;56:630-639.
8. Forges T, Monnier-Barbarino P, Leheup B, Jouvet P. Pathophysiology of impaired ovarian function in galactosemia. Hum Reprod Update 2006;12:573-584.
9. Scriver CR. The *PAH* gene, phenyilketonuria and a paradigm shift. Hum Mut 2007;28:831-845.
10. Levy HL. Newborn screening and dietary treatments: lessons and update. In: Kaback MM, Shapiro LJ (eds). Frontiers in Genetic Medicine. Columbus, Ohio: Ross Laboratories; 1987.
11. Scriver CR, Eisensmith RC, Woo SLC, Kaufman S. The hyperphenylalaninemias of man and mouse. Ann Rev Genet 1994; 28:141-165.
12. DiLella A, Kwok SCM, Ledley FD, Marvit J, Woo SLC. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. Biochemistry 1986; 25:743-749.
13. Guthrie R, Susi A. A simple phenilalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963; 32:338.
14. Harding CO. Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria. Clin Genet 2008;74:97-104.
15. Kleiman FE, Dodelson de Kremer R, Oller de Ramírez A, Gravel RA, Argaraña CE. Sandhoff disease in Argentina: high frequency of a splice site mutation in the *HEXB* gene and correlation between enzyme and DNA-based tests for heterozygote detection. Hum Genet 1994;94:279-282.
16. Proia RL, Soravia E. Organization of the gene encoding the human β-hexosaminidase α-chain. J Biol Chem 1987;262:5677-5681.
17. Boles DJ, Proia RL. The molecular basis of HEXA mRNA deficiency caused by the most common Tay-Sachs disease mutation. Am J Hum Genet 1995;56:716-724.
18. Lowden JA. Carrier detection in the control of genetic disease. In: Kaback MM, Shapiro LJ (eds). Frontiers in Genetic Medicine. Columbus, Ohio: Ross Laboratories, 1987.
19. Beutler E. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. Science 1992;256:794-799.
20. Bondeson M-L, Dahl N, Malmgren H, Kleijer WJ, Tönnesen T, Carlberg B-M, et al. Inversion of the *IDS* gene resulting from recombination with IDSrelated sequences is a common cause of Hunter syndrome. Human Mol Genet 1995;4: 615-621.
21. Strachan T. Molecular pathology of 21-hydroxylase deficiency. J Inher Metab Dis 1994;17:430-441.
22. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:5111-5115.
23. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. New Eng J Med 2003;349:776-788,

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Scriver CR, Beaudet A, Sly W, et al. (eds). The metabolic and molecular basis of inherited disease, 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL PARA PESQUISA GENÉTICA NEONATAL (PANEL 14-3)

1. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963;32:338-343.
2. Ley Nacional 26279 de pesquisa neonatal. Boletín Oficial (República Argentina) 31232 del 05-09-2007.
3. Waisbren SE. Expanded newborn screening: Information and resources for the family physician. Am Fam Physician 2008; 77(7):987-994.
4. Rossato N. Pesquisa neonatal obligatoria. Reflexiones. Arch Argent Pediatr 2009;107(3).

5. Borrajo GJC. Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. J Inherit Metab Dis 2007;30:466-481.
6. Baily MA, Murray TH. Screening and caring for children with rare diseases. Ethics, evidence, and cost in newborn screening. Hastings Center Report 2008;38(3):23-31.
7. Khoury MJ, McCabe LL, McCabe ERB. Population screening in the age of genomic medicine. N Engl J Med 2003;348:50-58.
8. Wiicken B, Wiley V. Newborn screening. Pathology 2008;40(2):104-115.
9. Morton CC, Nance WE. Newborn Hearing Screening – A Silent Revolution. N Engl J Med 2006;354:2151-2164.

Capítulo 15

Anomalías genéticas de las proteínas estructurales

Proteínas de los filamentos intermedios: queratinas y sus mutaciones. Colágenos mutantes. Osteogénesis imperfecta. Gen de la fibrilina y síndrome de Marfan. Hipercolesterolemia. Receptor de LBD. Hemoglobinas y sus genes. Familias génicas. Hemoglobinas anormales. Talasemias

INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se han explorado las enfermedades que se originan cuando las enzimas son afectadas por mutaciones. Además de las enzimas, cuyas alteraciones genéticas determinan los errores congénitos del metabolismo (véase cap. 14), numerosas proteínas que tienen básicamente una función estructural, como el colágeno, pueden ser afectadas por mutaciones de sus genes codificantes. En el caso de los errores metabólicos, las mutaciones son casi siempre recesivas, ya que basta una cantidad menor de enzima codificada por el alelo normal para mantener la función normal. En cambio, en las anomalías genéticas de proteínas estructurales se encuentran tanto las dominantes como las recesivas.

Las anomalías de proteínas estructurales pueden clasificarse en varios tipos: a) de proteínas estructurales intracelulares, como las constituyentes de los filamentos intermedios, por ejemplo la queratina, cuyas mutaciones dan origen a enfermedades (una de ellas es la epidermólisis ampollar); b) de proteínas estructurales extracelulares, como el colágeno, cuyas mutaciones dan enfermedades como la osteogénesis imperfecta; c) proteínas estructurales formadoras de receptores y canales de membrana, cuyas mutaciones determinan enfermedades como la fibrosis quística y la hipercolesterolemia familiar; d) de proteínas estructurales transportadoras, como la apoceruloplasmina, cuyas mutaciones dan lugar a la enfermedad de Wilson y, sobre todo, las hemoglobinas, cuyas mutaciones provocan varios tipos de anemias, entre las cuales se hallan las talasemias.

Filamentos intermedios y sus proteínas normales

Mientras los microfilamentos de actina y los microtúbulos son constituyentes esenciales y permanentes de las células, los filamentos intermedios (el tercer componente del citoesqueleto) son sumamente variables de un tipo celular a otro y hay células que aparentemente no los muestran (como los oligodendrocitos y algunas líneas celulares).[1] Al ser estructuras especializadas y variables (salvo las láminas) en las células

Cuadro 15-1. Tipos de filamentos intermedios y sus proteínas

Tipo	Proteína	Nº de proteínas	Filamento	Localización
I	Q9-Q20, y queratinas tricocíticas de las uñas y los pelos Hal-4	28	Queratinas ácidas	Epitelios
II	Q1-Q8, Hb1-b4 y bx	26	Queratinas neutras	Epitelios
III	Vimentina, desmina, periferina, proteína fibrilar glial	5	Vimentinas	Mesénquima, músculo, etc.
IV	NFL, M, H, nestina, α-internexina	4	Neurofilamentos	Neuronas
V	Láminas A, C, B1, B2	4	Láminas (laminoproteínas)	Células (todas)

básicas, son el origen de posibles mutaciones viables, pues las mutaciones que afectan funciones básicas rara vez son visibles fenotípicamente, dado que no llegan a formar un organismo viable. En efecto, los componentes de los filamentos intermedios, en especial las queratinas, dan lugar a varios tipos de enfermedades conocidas y su conocimiento se ha incrementado aceleradamente en los últimos años.

Los filamentos intermedios pueden ser de cinco tipos (cuadro 15-1).[2]

Organización de las queratinas

Entre las proteínas de los filamentos intermedios predominan las queratinas por su número (son 54 queratinas elementales), pero prácticamente todas tienen la misma organización.

Las 70 proteínas conocidas de los filamentos intermedios tienen una organización similar, con un dominio helicoidal central y constante, formado por cuatro segmentos (1A, 1B, 2A y 2B-S) y sus separadores; un dominio de cabeza, no helicoidal (E1, V1 y H1), variable, y un dominio de cola (V2, E2, H2) también variable (fig. 15-1).[2]

El dominio central en estas proteínas es constante, y sus cuatro segmentos largos de α-hélice son típicos, así como las regiones peptídicas limitantes del dominio central, los "motivos" inicial y terminal de la hélice (véase fig. 15-1), que son particularmente afectados por mutaciones, dada su conservación y su importancia para la formación del dominio central normal.

La "cabeza" y la "cola" no helicoidales (globulares) son ampliamente variables entre los distintos tipos de filamentos intermedios. Para

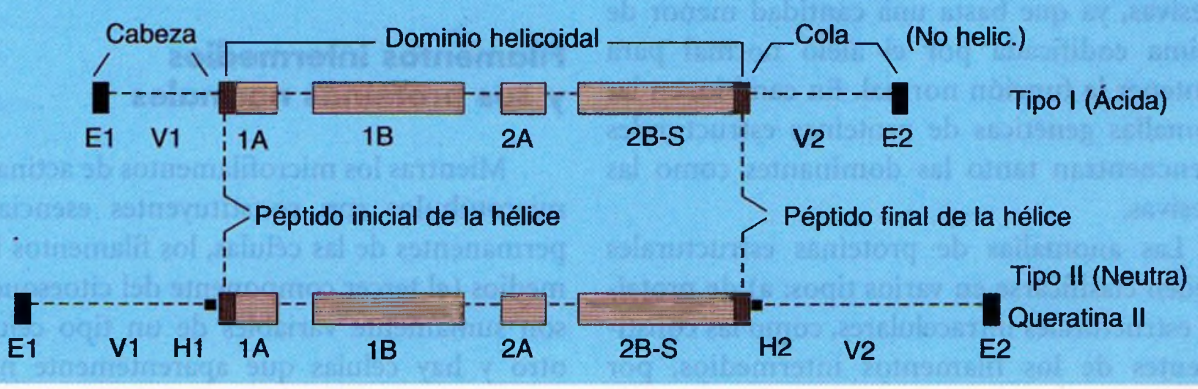


Fig. 15-1. Esquema general de las queratinas de tipos I y II, con sus dominios de cabeza y cola no helicoidales y el dominio central en forma de hélice.

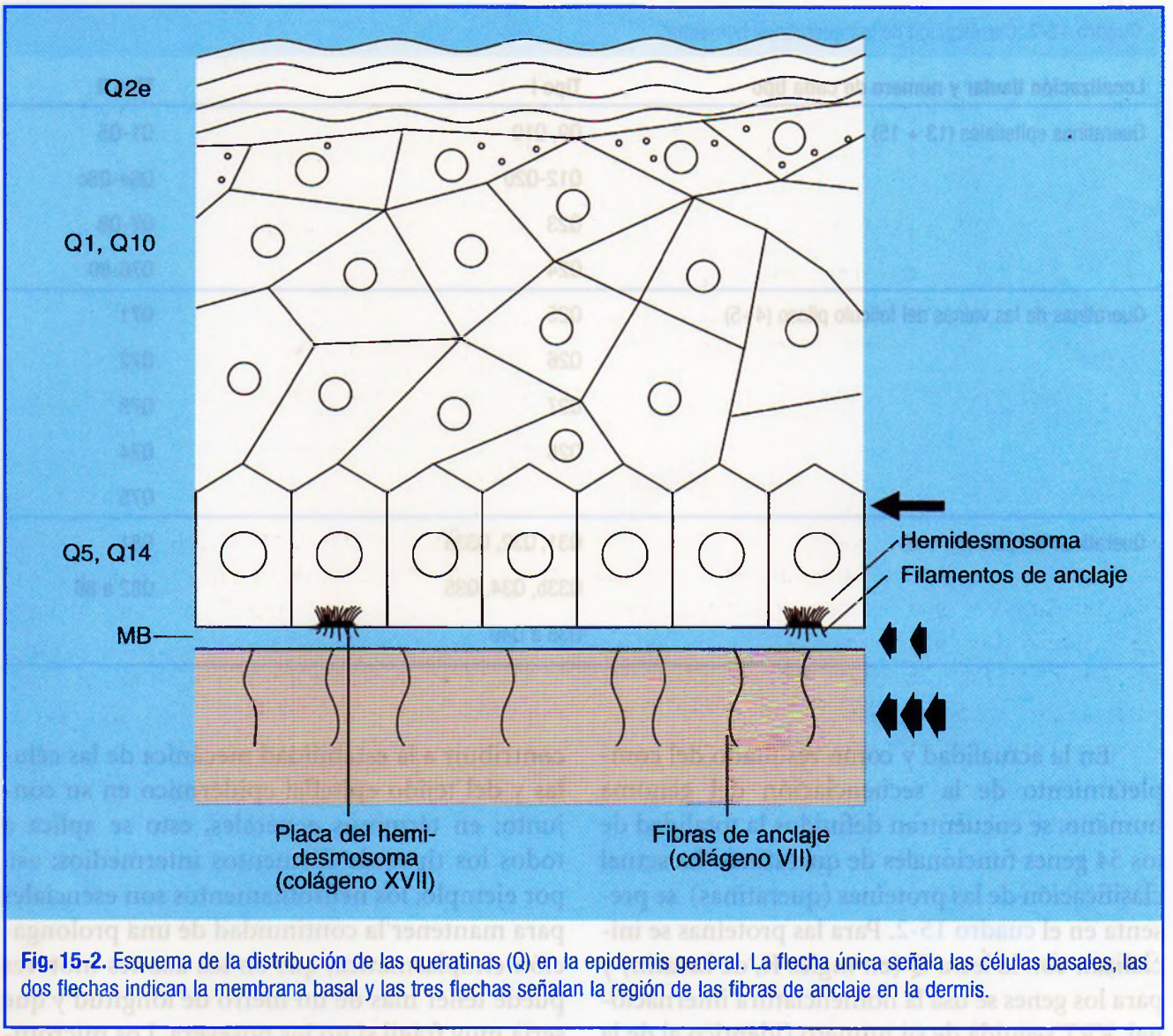


Fig. 15-2. Esquema de la distribución de las queratinas (Q) en la epidermis general. La flecha única señala las células basales, las dos flechas indican la membrana basal y las tres flechas señalan la región de las fibras de anclaje en la dermis.

constituir los filamentos, primero se aparean dos unidades proteínicas formando un dímero y luego se unen dos dímeros formando un tetrámero con el aspecto de dos pares de filamentos retorcidos uno sobre el otro, con una longitud de 48 nm; luego, estos tetrámeros se asocian de manera escalonada unos con otros para componer el filamento, de un ancho de 10 nm y longitud indefinida. Los dímeros de todos los filamentos intermedios, salvo los de queratina (tipos I y II), son homodímeros; los de queratina son heterodímeros, formados por la asociación de una de las queratinas de tipo I con una de las de tipo II (un poco mayor que la I). Dada la existencia de un total de 54 queratinas entre ambos tipos, la cantidad de heterodímeros de queratina (y por consiguiente, de filamentos) es muy grande (aunque no todos los heterodímeros posibles están presentes en las células). Esta gran variabilidad de los filamentos de queratina permite que ciertos tipos de células epiteliales tengan queratinas específicas, y aun dentro de un epitelio, las células situadas a diferentes alturas presentan filamentos de diferente composición (dos queratinas, una de cada tipo I y II, para formar un filamento). Las queratinas se ordenaron inicialmente con números arábigos en orden decreciente de su peso molecular (la queratina 1 y la 9, Q1 y Q9, son las mayores en los tipos II y I). En la epidermis general (en la palmoplantar es diferente) hay una distribución específica de queratinas: las células basales poseen las suyas, los queratinocitos intermedios poseen otras y la capa córnea otras diferentes (fig. 15-2).

Cuadro 15-2. Clasificación de las queratinas humanas[3]

Localización tisular y número de cada tipo	Tipo I	Tipo II
Queratinas epiteliales (13 + 15)	Q9, Q10	Q1-Q5
	Q12-Q20	Q6a-Q6c
	Q23	Q7-Q8
	Q24	Q76-80
Queratinas de las vainas del folículo piloso (4+5)	Q25	Q71
	Q26	Q72
	Q27	Q73
	Q28	Q74
		Q75
Queratinas del pelo (11 + 6)	Q31, Q32, Q33a	Q81
	Q33b, Q34, Q35	Q82 a 86
	Q36 a Q40	

En la actualidad y como resultado del completamiento de la secuenciación del genoma humano, se encuentran definidos la totalidad de los 54 genes funcionales de queratinas. La actual clasificación de las proteínas (queratinas) se presenta en el cuadro 15-2. Para las proteínas se inicializan con la letra Q (en inglés K, de keratin) y para los genes se usa la nomenclatura internacional, KRT seguida de su número (idéntico al de la proteína).[3-5]

Función normal de las queratinas

La gran variedad de los filamentos de queratina les otorgan una amplia versatilidad para servir a funciones diferentes en epitelios distintos y aun en zonas del mismo epitelio; por ejemplo, la epidermis palmar y la plantar contienen queratinas distintas (Q6 y Q10 en la zona media y Q9 en la superficial) de las de otras zonas; de esta manera, las palmas de las manos y las plantas de los pies se comportan en forma diferente y presentan una patología propia. Por otra parte, los derivados más resistentes, las uñas y los pelos, contienen queratinas especiales, las queratinas *tricocíticas* (véase cuadro 15-1). Las queratinas tienen como función esencial contribuir a la estabilidad mecánica de las células y del tejido epitelial epidérmico en su conjunto; en términos generales, esto se aplica a todos los tipos de filamentos intermedios; así, por ejemplo, los neurofilamentos son esenciales para mantener la continuidad de una prolongación citoplasmática, que en los axones motores puede tener más de un metro de longitud y que sería muy frágil si no los poseyera. Los microtúbulos y los microfilamentos son mucho más dinámicos y están relacionados con el transporte y el movimiento, mientras que los filamentos intermedios dan el tipo preciso de resistencia mecánica que necesita cada epitelio. Por consiguiente, es de esperar que las mutaciones de estos genes afecten la resistencia mecánica de los tejidos epiteliales. Por otra parte, en la epidermis, las diferentes capas se especializan en funciones distintas. La capa basal (fig. 15-3) posee células de dos tipos: las células troncales, caracterizadas por expresar altos niveles de integrinas de la familia $\beta 1^6$ capaces de regenerar todo el epitelio, y queratinocitos de amplificación, que están comprometidos para diferenciarse. En las capas medias residen los queratinocitos típicos, con gran desarrollo de los desmosomas y los tonofilamentos, mientras que en las capas altas,

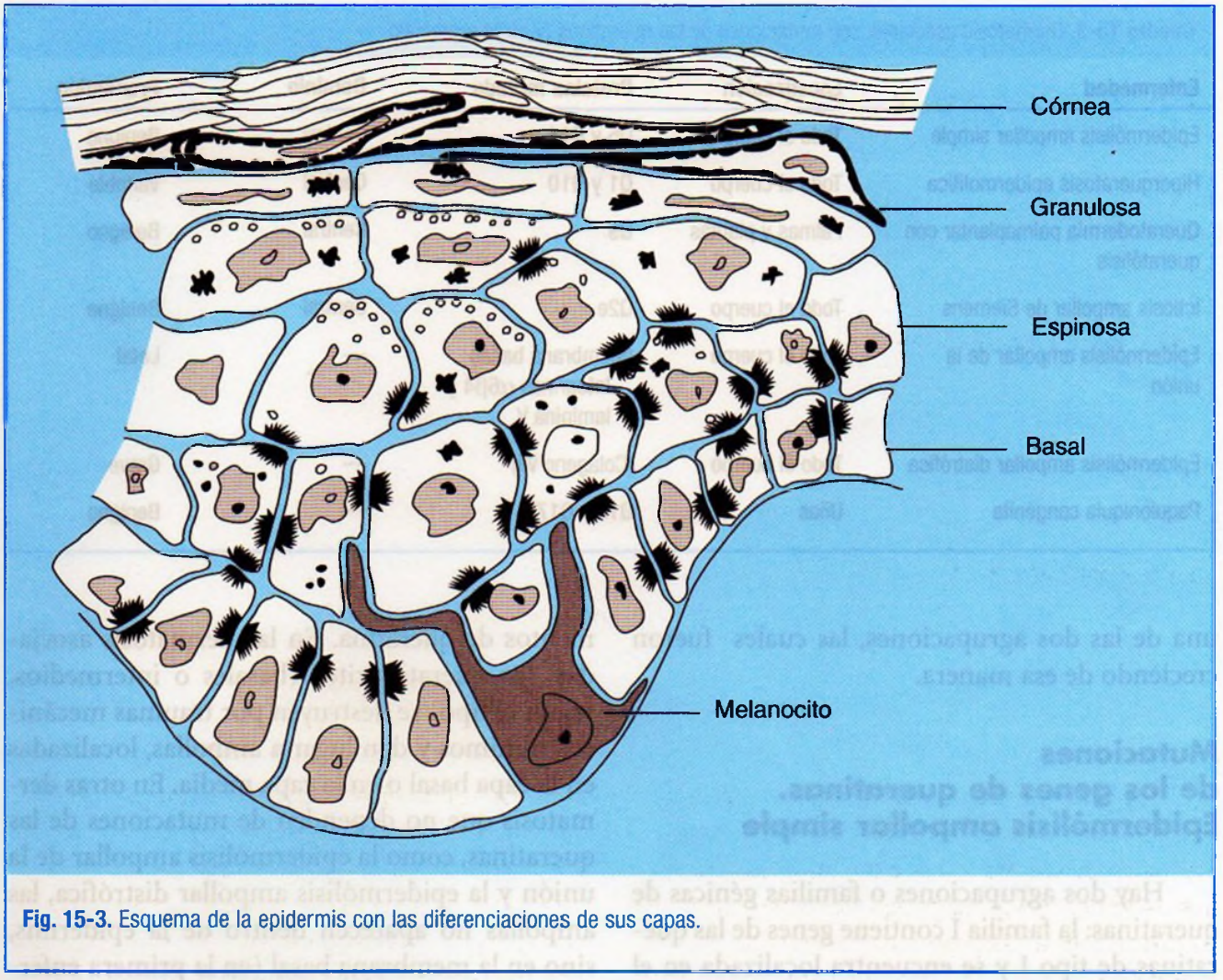


Fig. 15-3. Esquema de la epidermis con las diferenciaciones de sus capas.

como la granulosa, además de los gránulos densos de queratohialina, se encuentran los gránulos con membrana (queratinosomas) que se polarizan cerca de la membrana y, posteriormente, son expulsados para el sellado del espacio intercelular (la barrera contra el agua se encuentra a nivel de la capa lúcida); en las capas superiores también se activa la sulfatasa esteroidal relacionada con la descamación normal de las láminas córneas.

Debe subrayarse que las células humanas sólo forman agregados estables de *heterodímeros* (una queratina de tipo I con una de tipo II) y aun de solamente algunos de los heterodímeros posibles, porque los demás son rápidamente degradados por proteasas.

Esta propiedad, junto a la curiosa agrupación de los genes de queratinas en solamente dos agrupaciones, una de 27 genes de queratinas de tipo I en el cromosoma 17, y otra de 26 genes de queratinas de tipo II en el cromosoma 12 (que lleva también un único gen de tipo I) ha llevado a estudiar la evolución biológica de estos genes.[4] De esta manera se ha comprobado que estos dos grupos de genes de queratinas son propios de los vertebrados terrestres, mientras que el número de genes de queratinas es mucho menor en peces. Por otro lado, los pelos son una "invención" de los mamíferos, y es por ello que en los mamíferos se encuentra un gran número de genes de queratinas componentes del pelo. Se presume que los genes más antiguos de queratinas son los de la Q18 y Q8, que forman heterodímeros en epitelios simples y en epitelios parenquimatosos, pero no forman manojos ("tonofilamentos"). A partir de ellos podría haber habido duplicaciones génicas, que de alguna manera no bien comprendida, fueron simultáneas para cada queratina de cada

Cuadro 15-3. Dermatosis asociadas con mutaciones de las queratinas (y otras proteínas)

Enfermedad	Localización	Proteína mutada	Dominio	Pronóstico
Epidermólisis ampollar simple	Todo el cuerpo	Q5 y Q14	Central	Benigno
Hiperqueratosis epidermolítica	Todo el cuerpo	Q1 y Q10	Central	Variable
Queratodermia palmoplantar con queratólisis	Palmas y plantas	Q9	Central	Benigno
Ictiosis ampollar de Siemens	Todo el cuerpo	Q2e	Central	Benigno
Epidermólisis ampollar de la unión	Todo el cuerpo	(Membrana basal) Integrinas α6β4 y laminina V	—	Letal
Epidermólisis ampollar distrófica	Todo el cuerpo	(Colágeno VII)	—	Grave
Paquioniquia congénita	Uñas	Q16 y Q17	—	Benigno

una de las dos agrupaciones, las cuales fueron creciendo de esa manera.

Mutaciones de los genes de queratinas. Epidermólisis ampollar simple

Hay dos agrupaciones o familias génicas de queratinas: la familia I contiene genes de las queratinas de tipo I y se encuentra localizada en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21.2);[7] la otra familia (II) contiene genes de queratina de tipo II y está localizada en el brazo largo del cromosoma 12 (12q13). Se han detectado mutaciones asociadas con la epidermólisis ampollar simple (véase más adelante) y otras mutaciones asociadas con otras enfermedades de la piel.[8] Las cuatro enfermedades principales asociadas con las mutaciones de queratina (cuadro 15-3) son autosómicas dominantes (hay formas excepcionales recesivas), y esto se explica porque es suficiente que haya un 2% de proteína mutante para producir el colapso de la estructura de los filamentos intermedios.[9]

La vasta mayoría de las mutaciones de las queratinas afectan el dominio central helicoidal, en especial el péptido inicial de la hélice (1A) y el final. Esto sugiere que tales regiones son esenciales para la manutención del dominio central en la forma helicoidal normal y que, a su vez, son esenciales para la función mecánica de los filamentos de queratina. En las dermatosis asociadas, los queratinocitos (basales o intermedios, según el tipo) se destruyen por traumas mecánicos mínimos y dan lugar a ampollas, localizadas en la capa basal o en la capa media. En otras dermatosis que no dependen de mutaciones de las queratinas, como la epidermólisis ampollar de la unión y la epidermólisis ampollar distrófica, las ampollas no aparecen dentro de la epidermis, sino en la membrana basal (en la primera enfermedad) o en la dermis papilar (en la segunda); en este último caso, el defecto está en las fibras de anclaje, de colágeno VII (véase fig. 15-2).

Por otra parte, estudios recientes han mostrado que las queratinas, además de su papel como soporte mecánico, intervienen en la formación de la barrera placentaria, son factores de protección contra la apoptosis en células epiteliales y también intervienen en la regulación de la síntesis de proteínas durante la cicatrización.[5]

Anomalías genéticas del colágeno y de otras proteínas estructurales extracelulares (panel 15-1)

En forma similar a lo que ocurre con las queratinas, los colágenos constituyen una familia de proteínas que presenta una gran variedad de monómeros constituyentes y de formas de ensamblamiento supramolecular de dichos constituyentes. Esta característica permite a los

Panel

Panel 15-1. Colágenos y otras proteínas estructurales

La llamada "superfamilia" de proteínas de tipo colágeno incluye 42 genes de colágenos (correspondients a los 42 tipos de cadenas alfa) y a una veintena de proteínas que comparten similitudes estructurales con los 29 colágenos humanos. Algunas de estas proteínas asociadas a colágenos son la adiponectina del tejido adiposo, el componente C1q del complemento del suero sanguíneo, ocho proteínas llamadas colectinas o proteínas de surfactante, dos "emilinas" o glucoproteínas asociadas a fibras elásticas del tejido conectivo, tres receptores de macrófagos y dos péptidos derivados de los colágenos XVIII y XV.[11] En el cuadro se muestran las características de los colágenos humanos.

Cuadro 1. Tipos de colágeno, sus genes y características

Tipo	Cadenas α1,α2,α3	Sub-grupo1	Gen COL	Locus	Tejidos	Enfermedad humana[2]	Patrón hereditario
I	1	Fib	1A1	17q21.3	Huesos	OI, ED,	AD
	2	Fib	1A2	7q22	Conect. gral.	osteoporosis	
II	1	Fib	2A1	12q13.1	Cartílago	SEDC, otras	AD
III	1	Fib	3A1	2q24	Piel, vasos	ED, aneurisma	AD
IV	1	Otr	4A1	13q34	Membranas	angiopatía	
	2	Otr	4A2	13q34	basales		
	3, 4	Otr	4A3,4	2q36-37		Alport	AR
	5, 6	Otr	4A5,6	Xq22.3		Alport	XR
V	1	Fib	5A1	9q34	Conect. gral.	Ehlers-	AD
	2	Fib	5A2	2q24		Danlos I, II	AD
	3	Fib	5A3	19p13.2			
VI	1	Cue	6A1	21q22	Conect. gral.	Miopatías	
	2	Cue	6A2	21q22		Bethlem	AD
	3	Cue	6A3	2q37		Ullrich	AR
VII	1	Anc	7A1	3p21	Piel, anclaje	EB distróf.	AD
VIII	1	Ret	8A1	3q12	Córnea		
	2	Ret	8A2	1p32		Distr. córnea	AD
IX	1	Fac	9A1	6q12	Cartílago	EDM6	AR
	2	Fac	9A2	1p32	h. vítreo	EDM2	AD
	3	Fac	9A3	20q13.3		EDM3, LDD	AD
X	1	Ret	10A1	6q21-22	Cartílago metáfisis	DM Schmid PPAC	AD
XI	1	Fib	11A1	1p21	Epífisis ós.	OSMED	AR
	2	Fib	11A2	6p21.3		otras varias	AD
XII	1	Fac	12A1	6q12-13			
XIII	1	M	13A1	10q22			
XIV	1	Fac	14A1	8q23			
XV	1	Otr	15A1	9q21-22	Ojo	Knobloch II	AR
XVI	1	Fac	16A1	1p34			
XVII	1	M	17A1	10q24.3	Piel	EB	AR
XVIII	1	Otr	18A1	21q22.3	Ojo	Knobloch I	AR
XIX	1	Fac	19A1	6q12-14			

(continúa)

Cuadro 1. Tipos de colágeno, sus genes y características (*continuación*)

Tipo	Cadenas α1,α2,α3	Sub-grupo[1]	Gen COL	Locus	Tejidos	Enfermedad humana[2]	Patrón hereditario
XX	1	Fac	20A1		Córnea, piel		
XXI	1	Fac	21A1	6p12-11	Varios		
XXII	1	Fac	22A1	8q24.2	Enlaces		
XXIII	1	M	23A1	5q35	Metástasis		
XXIV	1	Fib	24A1	1p22.3	Hueso, córn.		
XXV	1	M	25A1	4q25	Neuronas		
XXVI	1	Fac	26A1		Gónadas		
XXVII	1	Fib	27A1	9q32	Cartíl., otros		
XXVIII	1			7p21.3	Piel, otros		
XXIX	1			3q21	Piel	Dermatitis atóp.	
LH-1		Enz		1p36.2-3	Conect. gral.	ED VI	AR

[1] Subgrupos: Fib = fibrilares; Fac = FACIT (asociados a fibrilares con hélice triple cortada); M = de membrana; Ret = reticuladas; Cue = en cuentas tipo rosario; Anc = de anclaje; Otr = otras. LH = lisil hidroxilasa; Enz = enzima; OSMED = displasia otoespondilomegaepifisaria.
[2] OI = osteogénesis imperfecta; ED = Ehlers-Danlos; SEDC = displasia espondiloepifisaria congénita; EB = epidermólisis ampollar; EDM = displasia epifisaria múltiple; LDD = enfermedad discal lumbar; PPAC = progresiva artropatía seudoreumatoide de la niñez; DM = displasia metafisaria; Knobloch = síndrome ocular complejo.

Además de las proteínas listadas en el cuadro, varias enzimas encargadas de los distintos pasos del procesamiento de los procolágenos y de su organización en fibrillas son de gran importancia en Medicina, puesto que sus mutaciones también pueden provocar anomalías o ausencias de ciertos colágenos. Estas enzimas son: tres hidroxilasas, dos glicosiltransferasas, una oxidasa específica y las dos proteinasas específicas que cortan los propéptidos de los extremos carboxilo y amino de los procolágenos.[11]

colágenos presentar una exquisita flexibilidad para constituir muy diversas matrices extracelulares en distintos tejidos y dentro del mismo tejido, en diversas regiones del organismo. Los colágenos son las proteínas más abundantes en el organismo humano y constituyen alrededor de un 30% de la masa proteínica total. Actualmente, están bien definidos 29 tipos de colágeno, designados con números romanos en el orden cronológico de su descubrimiento.[10,11] Hay 42 diferentes tipos de cadenas alfa, a cada una de las cuales corresponde un gen, pero además hay alrededor de otras 20 proteínas que contienen dominios semejantes a los de los colágenos (véase panel 15-1). Sin embargo, los colágenos que tienen relevancia en Medicina son los primeros once tipos. Los colágenos están compuestos por tres cadenas polipeptídicas (cadenas α) que pueden ser idénticas o diferentes; cada cadena diferente se designa por un número arábigo y como las cadenas α son distintas en cada tipo de colágeno, la nomenclatura para cada cadena incluye, además de su número arábigo, el número romano de su tipo de colágeno; así, para el colágeno I, el más general del tejido conectivo, las cadenas son: α1(I) y α2(I). Cada cadena tiene un gen diferente, designado *COL* seguido del tipo de colágeno (en números arábigos) y la cadena (designada "A") y su número. Los genes *COL* están dispersos por el genoma humano (cuadro en panel 15-1).[12]

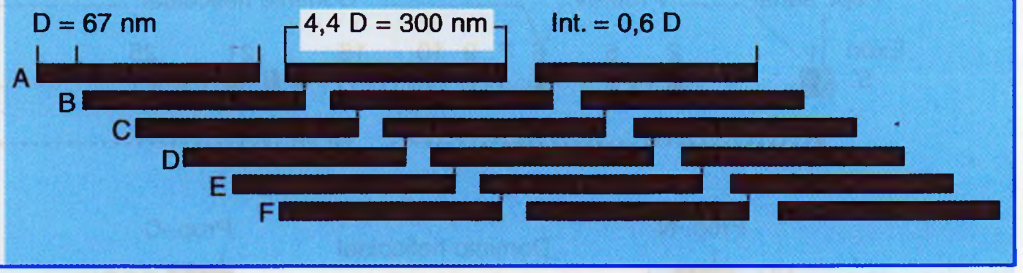


Fig. 15-4. Esquema de la disposición de las moléculas de tropocolágeno (trímeros) en la fibrilla típica de periodicidad D = 67 nm.

Los colágenos se clasifican (según formen o no fibrillas), en fibrilares (tipos I, II, III, V y XI) y no fibrilares (tipos IV, VII, VIII, IX, X, XII, XIII y XIV) y un colágeno fibrilar, pero de fibrilla no escalonada, el VI. La fibrilla típica (de moléculas escalonadas) tiene la periodicidad característica de 67 nm (periodicidad D), y la longitud de la molécula formada por las tres cadenas, el tropocolágeno, es 4,4 veces D (alrededor de 300 nm; fig. 15-4). Esta fibrilla elemental de colágeno, tan regular, es el producto de la constitución de la triple hélice muy regular de las tres cadenas α, y esta triple hélice, a su vez, es el resultado de la secuencia muy regular de aminoácidos (aa), en unidades repetidas de a tres, todas comenzando por glicina y siguiendo con dos aminoácidos prefijados (unidades Gli- X-Y). Las mutaciones que alteran esta secuencia tienen profundas repercusiones en el colágeno; por otra parte, como las tres cadenas empiezan a unirse por la región terminal o carboxiloterminal (para formar la triple hélice), esta región es particularmente sensible a los cambios mutacionales.[13]

Genes de colágeno y sus proteínas

Los genes *COL* están dispersos por muchas regiones del genoma humano (véase cuadro en panel 15-1), sin formar un cúmulo definido; sin embargo, poseen una organización con muchas similaridades, que son constantes en los exones correspondientes al dominio helicoidal central, donde éstos son siempre pequeños, de un múltiplo de 9 pb, que puede ser: 54 pb (el más frecuente), 45, 99, 108 y 162 pb.[13] Estos exones codifican respectivamente (en unidades peptídicas de tripletes Gli-X-Y) 6 unidades, 5, 11, 12 y 18 unidades. Lo más llamativo es que todos los exones centrales comienzan exactamente por el codón de glicina y terminan por el del aminoácido "Y"; este patrón de organización es muy antiguo en la evolución, porque incluso se halla en erizos de mar, por lo cual es previo a la divergencia de vertebrados e invertebrados en la evolución de los organismos.[12]

El gen de la cadena pro-α1(I) (del colágeno más común), localizado en el cromosoma 17 (17q21.3), posee 51 exones, de los cuales los primeros cinco corresponden al péptido señal (1) y al dominio globular propéptido-N (4), del 6 al 47 corresponden al dominio helicoidal, y los cuatro últimos corresponden al propéptido-C (fig.15-5).

Mutaciones de los genes *COL*: el "suicidio proteínico"

Más de 1.100 mutaciones se han encontrado solamente para los primeros cinco tipos de colágenos humanos.[11] Estas mutaciones están asociadas con el grupo de enfermedades denominado "osteogénesis imperfecta" y, adicionalmente, con el síndrome de Ehler-Danlos, condrodisplasias, el síndrome de Alport, epidermólisis ampollar distrófica y el síndrome de Knobloch (despegamiento de retina, miopía y malformación craneana). La mayor parte de estas mutaciones afectan la codificación de la glicina inicial de las unidades de tres aminoácidos del dominio helicoidal central, y esto refleja la necesidad imperiosa de una estricta regularidad de las posiciones de la glicina para que el colágeno pueda cumplir sus funciones normales; es decir que los colágenos fibrilares no toleran ni una interrupción de las repeticiones Gli-X-Y en su dominio helicoidal. A su vez, los cambios producen efectos cada vez más severos cuanto mayor es la proximidad al propéptido-C; esto se explica porque las cadenas

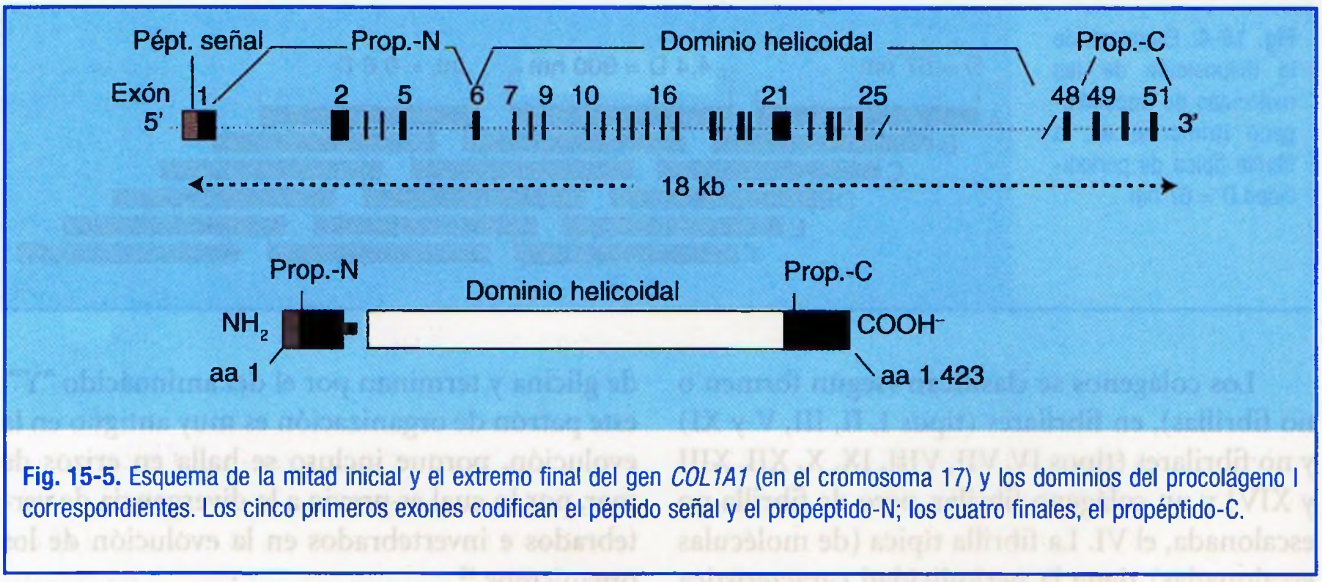


Fig. 15-5. Esquema de la mitad inicial y el extremo final del gen *COL1A1* (en el cromosoma 17) y los dominios del procolágeno I correspondientes. Los cinco primeros exones codifican el péptido señal y el propéptido-N; los cuatro finales, el propéptido-C.

α comienzan a unirse por esa región y luego extienden su unión en forma similar a un cierre relámpago hasta el otro extremo, de manera que si hay un defecto en esa región, se demora o se obstaculiza la formación del trímero.

La osteogénesis imperfecta tiene un patrón hereditario dominante, lo cual sugiere que los procolágenos mutantes de alguna manera interfieren con la organización supramolecular y la función de los colágenos normales. En efecto, se ha evidenciado en animales transgénicos, que sólo expresan un 10% del colágeno mutante además del normal, que ese porcentaje menor de colágeno anormal interfiere con la producción de fibrillas normales. Las mutaciones que afectan la codificación de glicinas en el dominio central y, en especial, hacia el propéptido-C, demoran el ensamblamiento de cadenas α, lo cual lleva a que se exageren las modificaciones postraduccionales (glucosilación, etc.) y, a su vez, todo el trímero se vuelve más susceptible a la degradación enzimática. Esto significa que una sola cadena mutante es suficiente para provocar la degradación del trímero (con dos cadenas normales). Este fenómeno se ha denominado el "suicidio proteínico" Además, cuando el colágeno es segregado fuera de la célula, la presencia de colágeno mutante interfiere con la fibrilogénesis normal y hace que los colágenos queden expuestos a las enzimas proteolíticas extracelulares. Las mutaciones que afectan glicinas cercanas al propéptido-N determinan variedades menos severas de osteogénesis imperfecta y permiten medir el grado de alteración del trímero por el incremento de la desnaturalización térmica de la molécula.[14]

Osteogénesis imperfecta (OI)

Las mutaciones que afectan el colágeno de tipo I causan principalmente las osteogénesis imperfectas, un grupo de enfermedades relacionadas con defectos del tejido conectivo, que se expresan principalmente en problemas óseos. Se han descrito al menos diez variantes de osteogénesis imperfecta (OI), incluyendo algunas variantes originadas en mutaciones de proteínas asociadas o de enzimas del procesamiento del colágeno, pero la mayor importancia corresponde a mutaciones de los dos genes del colágeno de tipo I. La OI clásica o de tipo I se caracteriza por fracturas múltiples ante traumas mínimos, esclerótica azulada o grisácea, audición disminuida por esclerosis de los huesecillos del oído medio, en tanto que los dientes pueden ser translúcidos, de color amarillo pardusco y frágiles. En esta forma clínica, las deformaciones (cifosis, escoliosis, miembros arqueados) son leves y el lapso de vida no está muy disminuido. En la forma II, en cambio, la fragilidad ósea es extrema y hay gran mortalidad perinatal y hasta fetal, por fracturas intrauterinas o durante el parto. La forma III es heterogénea y grave, aunque menos que la II. La OI es un ejemplo de pleiotropía porque los diversos signos y síntomas en distintos órganos

obedecen a una única causa, que es el defecto del colágeno.

En la patogenia de la enfermedad se debe considerar que el colágeno I es un componente esencial del hueso y que su calcificación depende de la normalidad estructural de las fibrillas de colágeno. La fragilidad ósea es una consecuencia de la menor cantidad de tejido óseo y de su deficiente calcificación, productos de la dificultad de sintetizar fibrillas normales. Los dientes opalescentes se deben a una hipoplasia de la dentina, que también obedece a un déficit de colágeno normal; la esclerótica azulada se produce por una disminución del tejido conectivo fibroso normal de esta cubierta. En términos generales, cuando un colágeno no puede sintetizarse normalmente, se incrementa la proporción de otros colágenos que pueden ser componentes menores en el individuo sano. Sin embargo, dado que las fibras de colágeno normales contienen más de un colágeno en cantidades determinadas y disposición definida (p. ej., considerando una fibra cilíndrica, puede haber un colágeno menor en la región central y un colágeno principal en las partes intermedia y periférica), los cambios de colágeno llevan aparejadas modificaciones en el grosor y en la disposición de las fibras. La variación del cuadro clínico se puede relacionar con la ubicación y la calidad de las mutaciones; cuando las mutaciones afectan el sector cercano al propéptido-C, se desarrolla la forma II o letal: mutaciones de *COL1A1* que cambian la glicina 988 en cisteína o la glicina 664 en arginina. Las mutaciones que afectan la codificación cercana al propéptido-N son más leves: glicina 85 a arginina, por ejemplo. Finalmente, hay formas relativamente benignas debidas a una reducción de la expresión de *COL1A1*.[15]

Mutaciones del gen de la fibrilina y síndrome de Marfan (panel 15-2)

La identificación de un producto génico alterado (fibrilina) ha permitido aclarar la etiología del síndrome de Marfan, descrito hace un siglo. Los afectados por este síndrome (cuya prevalencia es de 2 cada 10.000 recién nacidos), presentan talla elevada, miembros largos y finos (aracnodactilia), cifoescoliosis, hipotonía muscular, subluxación del cristalino y síntomas cardiovasculares: insuficiencia de las válvulas cardíacas y degeneración de la túnica media de las grandes arterias, en especial la aorta.

La proteína alterada en el síndrome de Marfan es la *fibrilina*, componente principal de las *microfibrillas*, que a su vez conforman las fibras elásticas junto con la elastina, o que se presentan aisladamente como microfibrillas en el ligamento suspensor del cristalino en el ojo. La fibrilina es una glucoproteína grande, de 320 kDa, que contiene 42 dominios similares a un precursor del factor de crecimiento epidérmico (FCE). Estos dominios, por su parte, contienen (en la mayoría de los casos) un "motivo" o secuencia de aa ligante de Ca^{++}. El gen, además, codifica siete "motivos" de 70 aa (que incluyen ocho cisteínas cada uno), similares a una parte de la proteína ligadora al factor de crecimiento y transformación β1 (LTBP, panel 15-2).

El gen principal de la fibrilina se encuentra en el cromosoma 15 (15q21) y se han demostrado un número significativo de mutaciones de este gen asociadas con el síndrome de Marfan.[22] Este síndrome muestra un patrón de herencia *dominante*, lo cual nuevamente sugiere que la proteína mutante obstaculiza la función de la proteína normal; se supone que estas mutaciones interfieren con la organización normal de la microfibrilla, por una interacción anormal entre la proteína mutante y la normal, que potencia la presencia del producto mutante y le da su carácter dominante (dominancia negativa).

Mutaciones de receptores de membrana: el receptor de lipoproteínas de baja densidad (R-LBD)

Los receptores de la membrana citoplasmática son proteínas grandes y complejas que cumplen varias funciones. Dado que estas proteínas atraviesan la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática, deben poseer uno o varios dominios "transmembranosos" de

Panel 15-2. El síndrome de Marfan (aracnodactilia) y el defecto de la proteína fibrilina

Panel

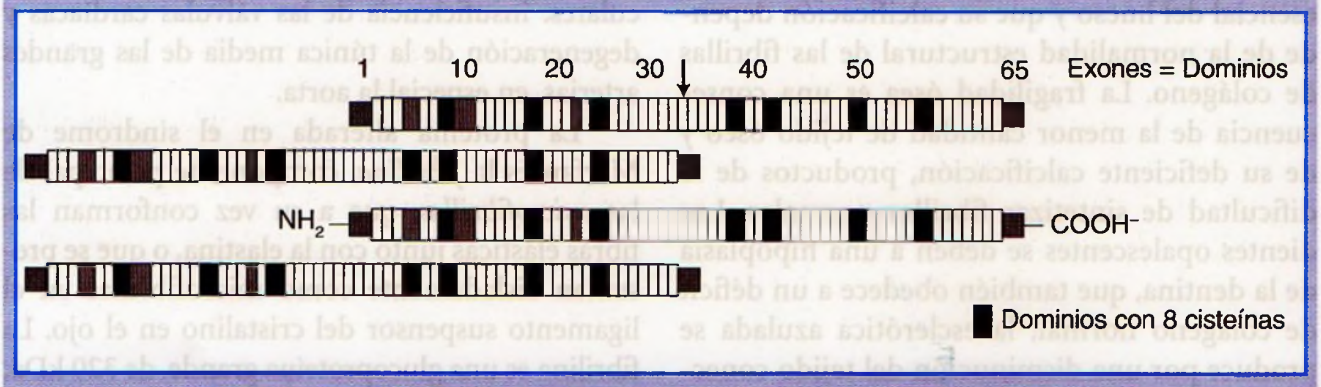


Fig. 1. Organización propuesta de los monómeros de fibrilina para formar microfibrillas. Los monómeros vecinos se asocian con una superposición parcial; esto hace que la parte media de uno (flecha) esté asociado con el extremo de un vecino.

El síndrome de Marfan, de herencia dominante, es un ejemplo demostrativo de la acción perjudicial de una proteína mutante que impide, en mayor o menor grado, la organización de la proteína normal con la cual coexiste (efecto dominante negativo). El gen correspondiente de la *fibrilina* (*FBN1*) se localiza en 15q21, cubre 110 kb y posee 65 exones; los dominios correspondientes en la proteína muestran ciertas repeticiones. En especial, hay siete dominios muy ricos en cisteína (poseen ocho cisteínas), que necesariamente deben estar en registro cuando se asocian varios monómeros para formar un filamento. La disposición regular de estos siete dominios ricos en cisteína permite una asociación *solapada* de monómeros. De esta manera, los extremos carboxilo y amino de un monómero estarán en contacto con la parte media de los monómeros superior e inferior (fig. 1). En dicha parte media ocurren las mutaciones con efectos más graves (síndrome de Marfan neonatal), en las cuales la formación de microfibrillas está más desorganizada (los exones 31 y 32 acumulan dichas mutaciones). Las mutaciones de cambio de sentido y de salteado de exones que involucran esta región son las más graves, aparentemente porque los monómeros mutantes impiden que los monómeros normales se asocien correctamente para formar un filamento normal; aun una cantidad minoritaria de proteína mutante es suficiente para anular la capacidad de formar microfibrillas. Por lo tanto, las mutaciones (en apariencia más catastróficas) que impiden directamente la formación de fibrilina por parte del gen mutante (p. ej., por un codón de terminación al principio del transcripto o por una mutación de cambio del marco de lectura), al no producir una proteína interactuante con la proteína normal codificada por el otro alelo, determinan formas muy benignas de este síndrome porque simplemente se forma menos fibrilina.[16,17]

A partir del año 2003 se ha producido un avance muy importante en el conocimiento de esta enfermedad, que ahora ya no es solamente considerada un defecto estructural de las fibras del tejido conectivo, sino que es también una desregulación del importante factor β de crecimiento y transformación (TGFβ, en la nomenclatura internacional), que es un grupo de tres proteínas (TGFβ1-TGFβ3) que tienen una función de activar la proliferación y la diferenciación de numerosos tipos celulares.[18,19] Este cambio conceptual sobre el síndrome de Marfan, aunque aún está incompletamente integrado, permite explicar numerosas observaciones previas. Así, se pudo explicar que una variante de esta enfermedad, el síndrome de Marfan tipo II, no tiene mutaciones de fibrilina, pero sí hay mutaciones de los dos receptores (TGFBRI y TGFBRII) del factor de crecimiento y transformación.[20] Dado que la causa de muerte más frecuente en este síndrome es la dilatación y posterior aneurisma disecante de la aorta, ha tenido mucha repercusión el uso de fármacos que retrasan o anulan la aparición de estos aneurismas, y algunos de estos productos actúan sobre el sistema de señalización del factor TGFβ.[21]

Actualmente se considera que en el síndrome de Marfan los efectos más dañinos son originados por una desregulación del sistema de señales de diferenciación celular promovidos por el TGFβ, de tal forma que incluso los niveles de este factor TGFβ, en la circulación sanguínea de los pacientes están aumentados, y decrecen cuando se administran fármacos como el losartan. El mecanismo patogénico reside probablemente en el comportamiento de ciertas proteínas de la matriz intercelular del conectivo, las llamadas "proteínas ligadoras del factor latente TGFβ (proteínas LTBP)". Estas proteínas por un lado se asocian con la fibrilina en las microfibrillas, pero cuando están libres en la matriz intercelular se unen a la forma "latente" o inmadura del factor TGFβ, manteniendo a este factor en forma inactiva. Cuando estas LTBP no se unen correctamente a la fibrilina, el nivel de factor TGFβ se incrementaría provocando alteraciones en la diferenciación de varios tipos celulares e incluso de materiales intercelulares como las propias fibras elásticas.

carácter intensamente hidrofóbico, que contactan con los lípidos de la membrana. Del lado exterior (extracelular), presentan el dominio o los dominios de reconocimiento y unión al ligando específico; del lado interno o citoplasmático, poseen dominios de unión a factores acoplantes, que transmiten o transducen la unión del ligando como una señal para un fenómeno intracelular. De manera adicional, algunos receptores transportan el ligando unido hacia el interior de la célula mediante un proceso de endocitosis; tales receptores se encuentran en las vesículas con cubierta que tienen "clatrina" (véanse detalles en textos de Biología Celular). Esta endocitosis mediada por receptores permite (además del ingreso del ligando y su degradación en los lisosomas) el reciclado de los receptores, que se convierten en endosomas y se fusionan con la membrana plasmática.

El receptor de las proteínas plasmáticas llamadas "lipoproteínas de baja densidad" (LBD), que son transportadoras de colesterol, es un receptor del tipo descrito: se encuentra en vesículas con cubierta en el interior de la célula, y en "fositas con cubierta" (de clatrina) en la superficie celular; este receptor se une a las LBD e inicia un proceso de endocitosis por medio del cual las LBD con colesterol son llevadas a los lisosomas, donde el colesterol es separado de la proteína, mientras que los receptores son reciclados y devueltos a la superficie celular (fig. 15-6).

Gen del receptor de LBD y proteína receptora

El gen de este receptor está localizado en el cromosoma 19 (19p13.2), tiene 45 kb y contiene 18 exones;[23] los grupos de exones se corresponden con los dominios de la proteína (fig. 15-7). La proteína precursora tiene 860 aminoácidos, si se cuentan los primeros 21 de un péptido señal; el receptor propiamente dicho tiene 839 aa, pero su peso molecular aumenta por el agregado de hidratos de carbono durante su paso por el aparato de Golgi.

Al secuenciarse el ADNc de este gen, se tuvo la evidencia de que un grupo de exones tenía gran similitud con los del precursor de otra proteína, el factor de crecimiento epidérmico (FCE), y que otro grupo de exones, a su vez, era muy similar a los del gen de otra proteína, el componente C9 del complemento del suero.[23] Por consiguiente, el gen del R-LBD parece haberse originado por la duplicación y transferencia de exones de otros genes. A su vez, los dominios de la proteína están bien definidos y muestran sus relaciones con otras proteínas. El primer dominio corresponde al sitio de unión del receptor con el componente proteínico de la LBD (apoproteínas B y E). Este dominio tiene cerca de 300 aa y presenta siete repeticiones de 40 aa cada una. Cada repetición de 40 aa tiene una gran semejanza con una secuencia única de 40 aa presente en la proteína C1 del complemento. Esta región está codificada por los exones 2-6. El segundo dominio

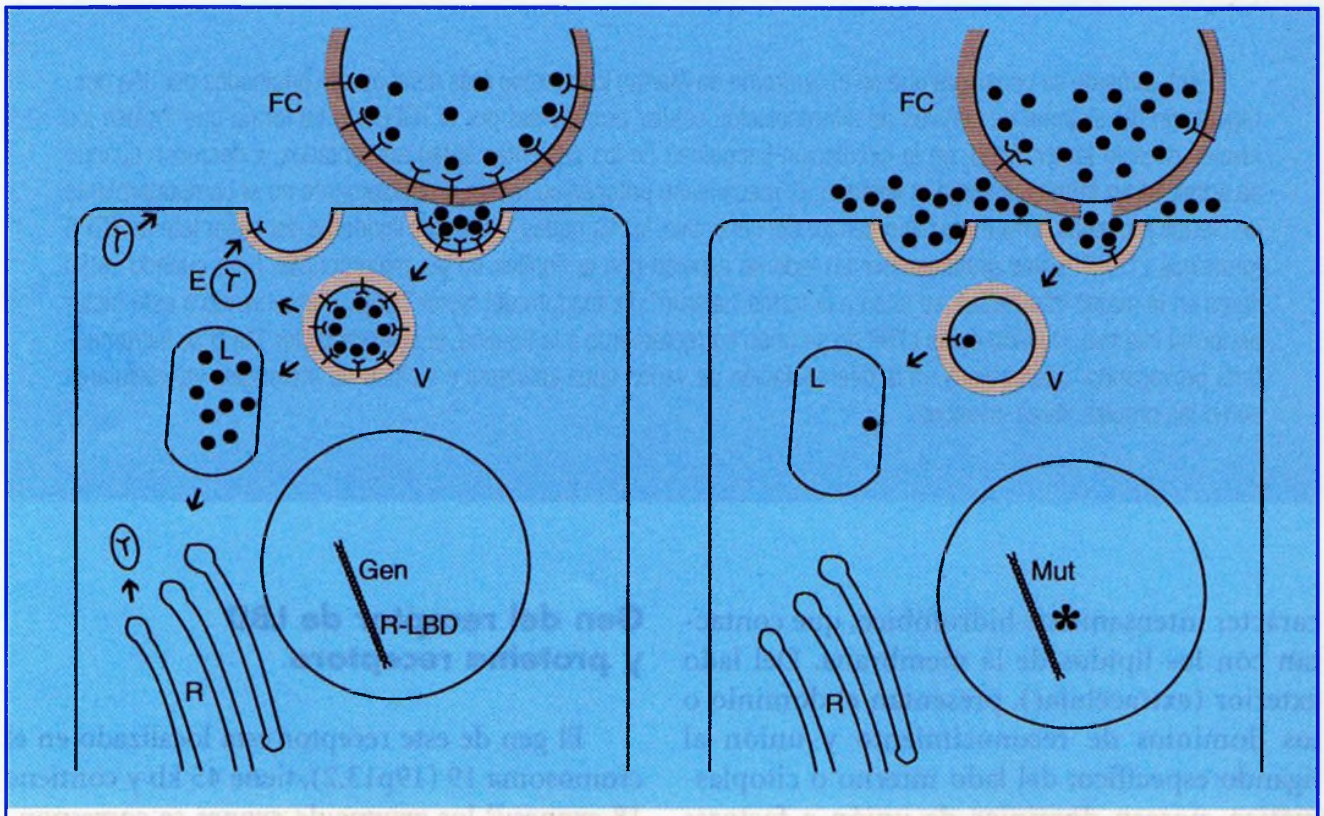


Fig. 15-6. Esquema de la captación y el transporte intracelular de LBD con colesterol. A la izquierda, célula con el gen normal del receptor de LBD; a la derecha, célula con mutación del gen del R-LBD. FC: fosita con cubierta; V: vesícula con cubierta; L: lisosoma; R: retículo endoplasmático y aparato de Golgi; E: endosoma con receptor para reciclado. En la célula con el receptor mutado, se acumula LBD con colesterol en el espacio extracelular, porque hay una gran depleción de receptores (o son anormales) y la endocitosis capta muy pocas LBD (círculos negros pequeños).

está formado por 400 aa y está relacionado con el precursor del FCE (este precursor es una proteína grande de 1.217 aa que tiene un dominio de 53 aa externo a la membrana); la homología se da con el dominio externo del FCE. Este dominio posibilita la separación del receptor y el ligando en los endosomas y es codificado por los exones 7-14. El tercer dominio es una secuencia de 48 aa, en la que se producen las uniones con carbohidratos durante su paso por el complejo de Golgi; es codificado por el exón 15. El cuarto dominio es una secuencia de 22 aa muy hidrofóbicos; es el dominio transmembranoso, codificado por los exones 16-17. El quinto y último dominio contiene 50 aa del lado del carboxilo terminal; se encuentra del lado citoplasmático y permite la asociación del receptor a las zonas de la membrana que poseen clatrina para formar las fositas con cubierta; está codificado por los exones 17-18.

Mutaciones del gen del R-LBD

Dado que existen dominios bien circunscritos y con función definida, las mutaciones y deleciones conocidas de este gen (más de una docena) permiten correlacionar sus efectos con la posición de la mutación. Las mutaciones que afectan la región promotora y el primer exón llevan directamente a la ausencia del producto, que no se transcribe. Las deleciones y mutaciones en los primeros seis exones pueden determinar una proteína truncada no funcional, ya sea porque la unión al ligando es defectuosa o porque la proteína no puede sufrir las modificaciones postraduccionales normales. Las mutaciones que afectan los dos últimos exones impiden la asociación específica del receptor a las fositas con cubierta, de modo tal que no producen la endocitosis normal. Por cualquiera de estos mecanismos, se llega al cuadro de la hipercolesterolemia familiar.

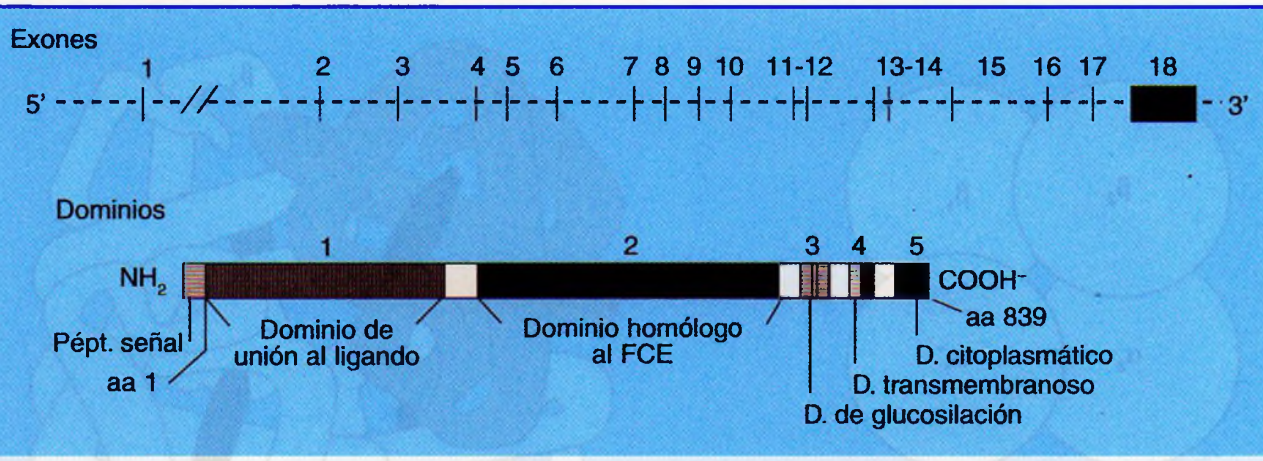


Fig. 15-7. Gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (R-LBD) y su proteína.

Hipercolesterolemia familiar (déficit del receptor de LBD = LDL)

Esta enfermedad tiene una incidencia muy significativa (1 en 500 nacimientos) en su forma clásica o heterocigótica; la forma letal homocigótica es rara (1:1.000.000).

Se hereda con carácter dominante (aunque dado que los heterocigotas no son idénticos a los homocigotas podría denominarse dominancia parcial o herencia intermedia); en los heterocigotas lleva a una anticipación de 25 años en la posibilidad de infartos cardíacos comparada con la población no afectada, mientras que los homocigotas sufren infartos ya en la segunda década de la vida. El nivel plasmático de colesterol oscila entre 300 y 570 mg/100 mL en los heterocigotas; en los homocigotas esta cifra se duplica (600 a 1.200 mg/100 mL). Hasta el año 2007 se habían caracterizado 1.043 mutaciones en el gen del receptor de LBD asociadas a esta enfermedad. [24]

La presencia de xantomas (tumoraciones causadas por la acumulación de colesterol) es valiosa para el diagnóstico. Los xantomas se localizan sobre el tendón de Aquiles y los tendones extensores de las manos, en los codos y las tuberosidades tibiales. Los pacientes mayores de 40 años muestran xantomas en más del 90% de los casos. La enfermedad progresa hacia la producción de placas ateromatosas en las grandes arterias, con la consiguiente producción de isquemia miocárdica y otros accidentes vasculares. Las placas ateromatosas se deben sobre todo a la captación de lipoproteínas por parte de las células reticuloendoteliales, que toman el aspecto de "células espumosas" por su acumulación de lípidos. En cambio, las células fibroblásticas no son capaces de captar y endocitar las LBD a causa de la disminución (en la forma heterocigótica) o la carencia (en las homocigóticas) del receptor normal de LBD.

Además de ingresar con los alimentos, el colesterol es sintetizado por el organismo a través de un camino metabólico en el cual interviene la enzima OH-metil-glutaril-CoA reductasa. La actividad de esta enzima es deprimida por la presencia de colesterol libre, que de esta manera regula negativamente su propia síntesis. En la hipercolesterolemia, la escasez de colesterol libre intracelular por el déficit del receptor permite que la enzima continúe sintetizando colesterol endógeno. Ésta es una de las razones por las cuales las dietas pobres en colesterol tienen un efecto limitado en el tratamiento de la hipercolesterolemia. En los heterocigotas es posible una cierta reducción del nivel plasmático de colesterol (hasta un 30%) mediante medidas dietéticas; sin embargo, en los homocigotas las dietas son ineficaces.

Proteínas transportadoras. Las hemoglobinas

Las hemoglobinas (Hb) son proteínas tetraméricas, compuestas por cuatro cadenas poli-

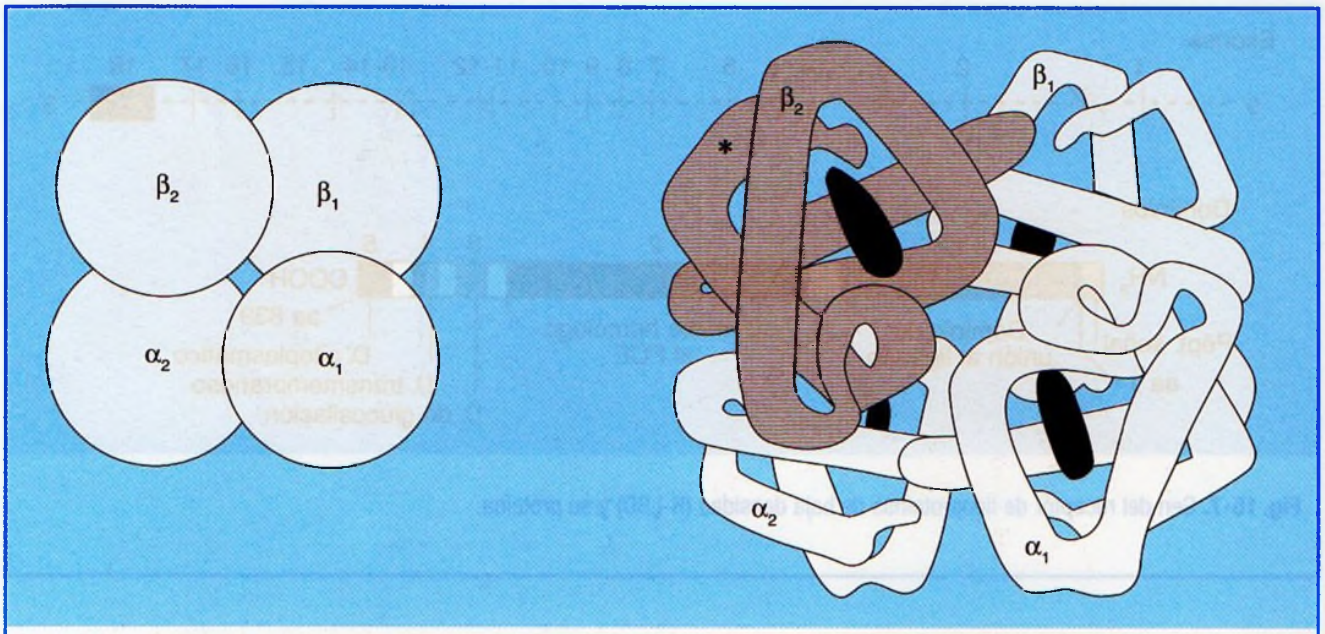


Fig. 15-8. Esquema simple de la hemoglobina (A) tetramérica que muestra su estructura cuaternaria (izquierda) y el plegamiento de las cuatro cadenas constituyentes, es decir, la estructura terciaria (derecha). Los óvalos negros representan los grupos hem con hierro.[25] La cadena sombreada (asterisco) se detalla en la figura 15-9.

peptídicas, dos de un tipo y las otras dos de otro (en la hemoglobina A, dos cadenas α y dos β); cada cadena hospeda un grupo hem con hierro y transporta principalmente oxígeno. Las cadenas proteínicas son las globinas, cuyos genes han sido intensamente estudiados y se conocen en detalle. La primera demostración de que un cambio estructural y hereditario de una proteína determina una enfermedad fue la de la hemoglobina S, propia de la anemia falciforme (véase más adelante), y a lo largo de las últimas décadas el estudio de las hemoglobinas ha permitido explicar la etiología de varias enfermedades de la sangre.

La hemoglobina completa (tetramérica) es aproximadamente esférica, de unos 6 nm de diámetro, y cada una de las cuatro globinas posee un bolsillo donde se aloja cada grupo hem con hierro (fig. 15-8). Cada globina es parecida a la mioglobina del músculo, y las distintas globinas son parecidas entre sí, aunque no idénticas; la globina α tiene 141 aa y la globina β, 146 aa.

Las propiedades de la Hb dependen de la interacción de sus cuatro unidades; si se separa en dos dímeros o cuatro monómeros, pierde su característica afinidad por el oxígeno y otras propiedades funcionales, de donde se desprende de la importancia de las interacciones entre los grupos de cada una de las cadenas. En realidad, la exquisita sensibilidad de la Hb tetramérica a los cambios en el entorno, como el de la presión parcial de oxígeno, depende de su organización tridimensional; esta conformación es flexible, ya que se modifica con la asociación de cada átomo de oxígeno, es decir que se trata de una proteína "alostérica" (que tiene cambios reversibles de su forma espacial, relacionados con estados funcionales), y sus cambios son progresivos porque cada uno facilita el siguiente. Dada la significación que tiene cada mutación de un gen de globina en la forma molecular final de la proteína, es necesario considerar algún detalle de esta estructura molecular.[25,26] La hemoglobina, como otras proteínas poliméricas, muestra cuatro niveles de estructura: la estructura *primaria* es la secuencia de aa en cada cadena de globina; la estructura *secundaria* es la sucesión de segmentos enrollados en α-hélice y no enrollados; la estructura *terciaria* es la forma espacial en la cual se pliegan los sectores enrollados (la mayor parte) y los lineales (en la globina β esta estructura terciaria está compuesta por los ocho segmentos A-H), y finalmente, la estructu-

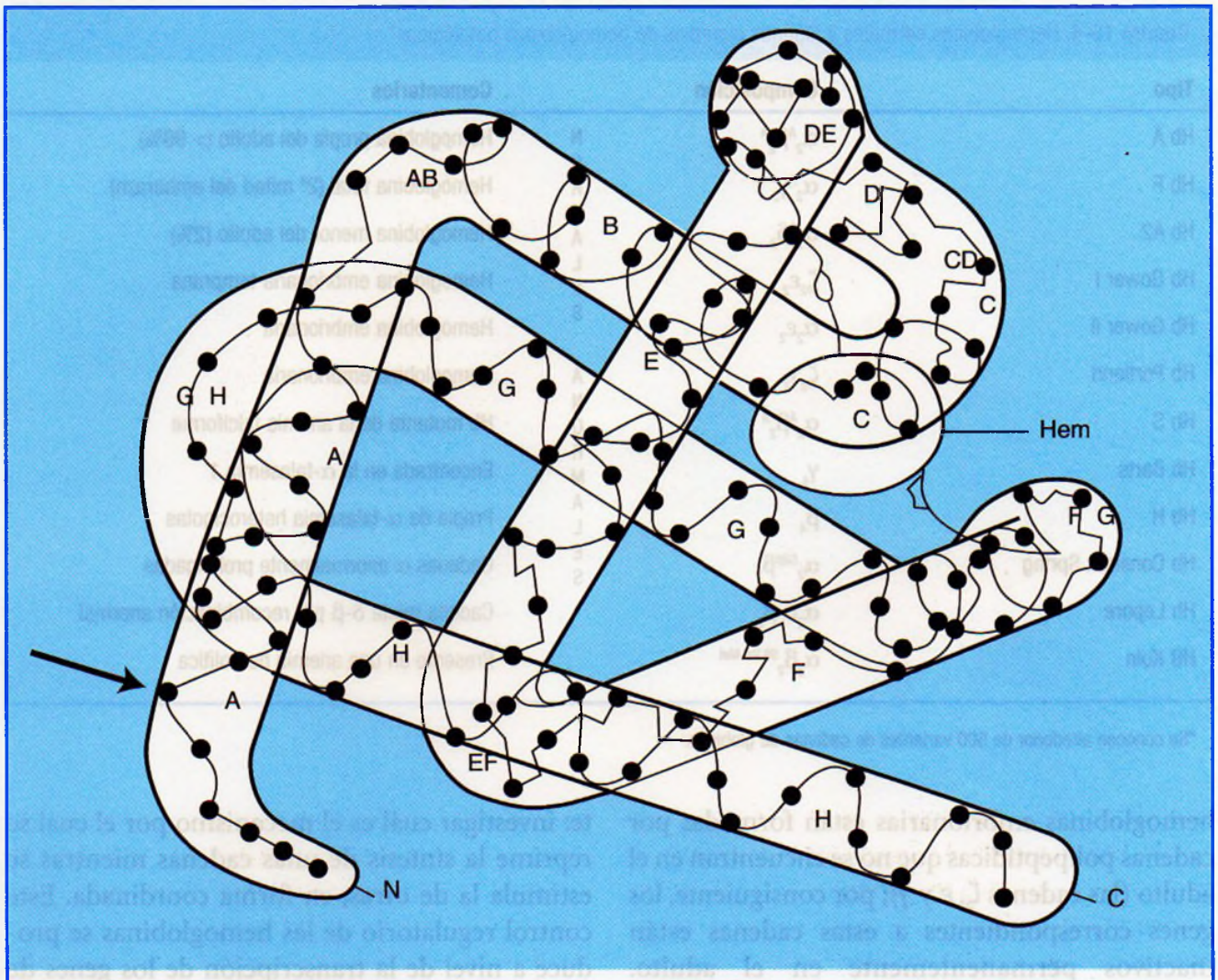


Fig. 15-9. Esquema de las estructuras secundaria y terciaria de la globina β. Esta cadena se corresponde con la señalada con el asterisco en la figura 15-8. Cada residuo aminoacídico está representado por un círculo negro. La flecha señala la posición del aminoácido cambiado en la Hb S de la anemia falciforme.

ra *cuaternaria* es la disposición de las subunidades (las cuatro globinas) que conforman la Hb completa (véase fig. 15-8). Para ubicar las mutaciones, es especialmente útil la comprensión de la estructura terciaria, es decir, el plegamiento de la cadena de la globina en ocho segmentos helicoidales, que nombrados desde el extremo amino hacia el carboxilo son A, B, C, D, E, F, G y H; los segmentos no helicoidales se encuentran entre cada región helicoidal, esto es, en cada codo, y se denominan con las dos letras de las hélices contiguas, es decir, codo AB, etc. Además el segmento inicial es lineal (la colita inicial; fig. 15-9). La nomenclatura basada en los segmentos helicoidales permite distinguir claramente el lugar donde está ubicada cada anormalidad (p. ej., un aminoácido cambiado) en una de las cadenas; esto último es muy útil, puesto que existen más de 500 variantes o mutantes conocidas de globinas.

La hemoglobina principal del adulto es $\alpha_2^A\beta_2^A$, es decir que el número de cadenas se utiliza como suscripto y el tipo de globina (A, etc.) como superscripto. En el cuadro 15-4 se enumeran hemoglobinas normales y algunas variantes patológicas.

Las hemoglobinas humanas normales son seis. Durante el primer trimestre del embarazo, en la hematopoyesis inicial en el saco vitelino, existen las hemoglobinas embrionarias. Estas tres

Cuadro 15-4. Hemoglobinas normales y algunos ejemplos de hemoglobinas patológicas*

Tipo	Composición		Comentarios
Hb A	$\alpha_2^A\beta_2^A$	NORMALES	Hemoglobina propia del adulto (> 98%)
Hb F	$\alpha_2^A\gamma_2$		Hemoglobina fetal (2ª mitad del embarazo)
Hb A2	$\alpha_2^A\delta_2$		Hemoglobina menor del adulto (2%)
Hb Gower I	$\zeta_2\varepsilon_2$		Hemoglobina embrionaria temprana
Hb Gower II	$\alpha_2\varepsilon_2$		Hemoglobina embrionaria
Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$	ANORMALES	Hemoglobina embrionaria
Hb S	$\alpha_2^A\beta_2^S$		Hb mutante de la anemia falciforme
Hb Barts	γ_4		Encontrada en la α-talasemia 1
Hb H	β_4		Propia de α-talasemia heterocigotas
Hb Constant Spring	$\alpha_2^{CSp}\beta_2$		Cadenas α anormalmente prolongadas
Hb Lepore	$\alpha_2\delta\text{-}\beta_2$		Cadena mixta δ-β por recombinación anormal
HB Koln	$\alpha_2\beta_2^{98\ Val\text{-}Met}$		Presente en una anemia hemolítica

*Se conocen alrededor de 500 variantes de cadenas de globinas.

hemoglobinas embrionarias están formadas por cadenas polipeptídicas que no se encuentran en el adulto (las cadenas ζ, ε y γ); por consiguiente, los genes correspondientes a estas cadenas están inactivos permanentemente en el adulto. Alrededor del tercer mes de vida intrauterina se intensifica un *cambio de hemoglobinas* (el primero): las cadenas embrionarias ζ y ε dejan de sintetizarse aceleradamente, mientras las cadenas α y γ se incrementan rápidamente, y constituyen la *hemoglobina fetal*, que domina el período comprendido entre el cuarto mes de vida intrauterina y el nacimiento. En el período posnatal y hasta alrededor del primer año en el lactante, ocurre el *segundo cambio de hemoglobinas*: la cadena γ declina y aumenta la cadena β, hasta reemplazar totalmente a la γ alrededor del año de edad. De esta forma, el lactante adquiere la hemoglobina adulta ($\alpha_2\beta_2$), que constituye alrededor del 98% de la Hb total; hay una hemoglobina adulta en cantidad mucho menor, la Hb A2, que está constituida por dos cadenas α y dos cadenas δ (este último tipo de cadena se sintetiza poco en relación con las otras cadenas) (fig. 15-10).

Las transiciones de las hemoglobinas durante el desarrollo plantean un problema importante: investigar cuál es el mecanismo por el cual se reprime la síntesis de unas cadenas mientras se estimula la de otras, en forma coordinada. Este control regulatorio de las hemoglobinas se produce a nivel de la transcripción de los genes de las diferentes cadenas, por lo cual es necesario el conocimiento de la estructura de estos genes.

Familias génicas de las globinas. Familia génica α

Los genes de las globinas se constituyen en dos familias: la α y la β, que abarcan varios genes y seudogenes cada una y se localizan en cromosomas diferentes (la α en la región terminal del brazo corto del cromosoma 16; la familia β en el brazo corto del cromosoma 11). En ambas familias génicas los genes están colocados en un orden muy bien definido, que coincide con el orden con el cual son activados durante el desarrollo. La familia α contiene tres genes funcionales: α_1, α_2 y ζ, que se expresan en diferentes períodos, puesto que el gen zeta (ζ) se expresa al inicio de la hemopoyesis embrionaria y disminuye hacia el tercer mes, mientras avanzan los α, que se mantienen activos de allí en adelante. Hay

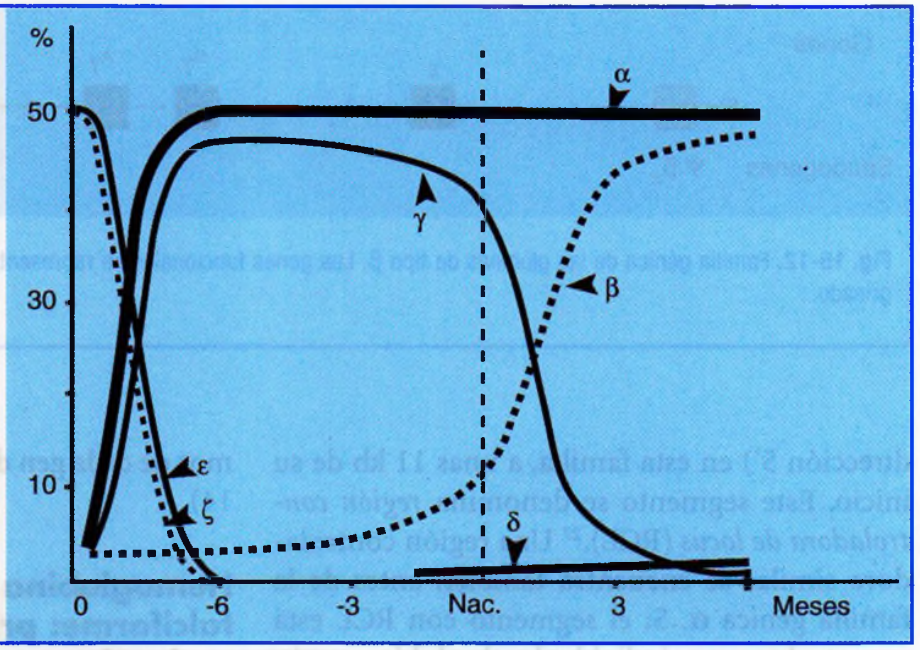


Fig. 15-10. Cambios en las concentraciones relativas de las distintas cadenas de globinas desde la época embrionaria hasta el primer año de edad. Los seis tipos de cadena se identifican por su letra griega correspondiente (α, β, γ, δ, ε y ζ).

además tres seudogenes: psiα_1, psiα_2 y psiζ; además de un gen θ cuya expresión es menor y poco conocida (fig. 15-11).

Familia génica de las β-globinas

La familia génica β se extiende por más de 50 kb y contiene cinco genes y dos seudogenes (fig. 15-12). El orden de los genes también es constante en esta familia y tiene significado funcional, ya que al alterarse artificialmente este orden, se altera el control de cambios durante el desarrollo. El gen épsilon (ε), que es el primero en el sentido 5', es el que se activa inicialmente en el embrión temprano; los genes gamma ($^{A}\gamma$ y $^{G}\gamma$) difieren sólo en la codificación del aminoácido 136 (alanina en $^{A}\gamma$ y glicina en $^{G}\gamma$) y se activan intensamente en la segunda mitad del embarazo, para formar parte de la Hb fetal; por último, el gen β (y en pequeña escala el gen δ) son activos durante toda la vida adulta. Todos estos genes son pequeños (también lo son los de la familia α), con una extensión de aproximadamente 1,6 kb (los α de sólo 0,8 kb).

La estructura de los genes de globinas es simple: todos contienen sólo tres exones, separados por los dos intrones, y una secuencia anterior y otra posterior no traducidas (fig. 15-13).[26]

No solamente los exones son esenciales para formar globinas funcionales; la región promotora, que se extiende un centenar de bases del lado 5', la región de la SANT, la región de la SPNT y los bordes de los intrones, son importantes para la transcripción y para el procesamiento del ARN transcripto.

Regulación génica en la familia β de las globinas

La expresión sucesiva de los genes ε (épsilon), luego de los dos γ y después de los δ y β, depende de una región situada "arriba" (en

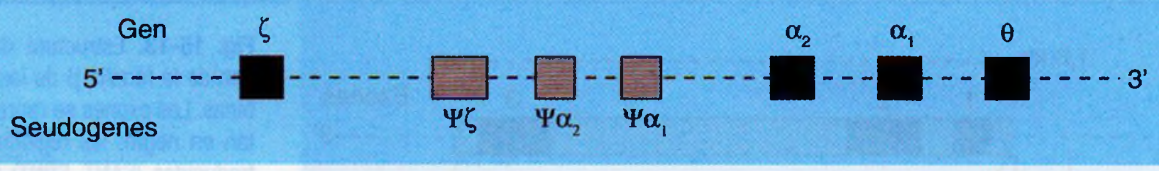


Fig. 15-11. Familia génica de las globinas α. Los genes funcionales se representan en color negro; los seudogenes Ψ en grisado.

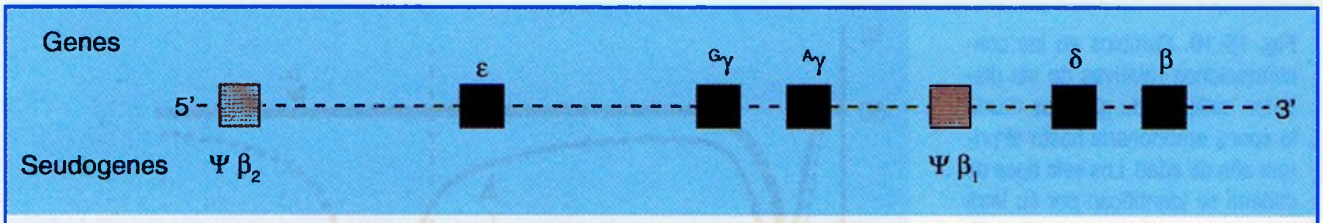


Fig. 15-12. Familia génica de las globinas de tipo β. Los genes funcionales se representan en color negro; los seudogenes, en grisado.

dirección 5') en esta familia, a unas 11 kb de su inicio. Este segmento se denomina *región controladora de locus* (RCL).[27] Una región controladora similar se encuentra también antes de la familia génica α. Si el segmento con RCL está ausente, los genes individuales de globinas están inactivos o se expresan muy poco. La RCL está compuesta por cuatro segmentos hipersensibles a la acción de DNasa I. Cada uno de los cuatro segmentos es capaz de activar la expresión de un gen próximo, cuando se introducen en un ratón que se convierte en transgénico. La RCL contiene "motivos" o secuencias definidas que pueden asociarse con proteínas nucleares, como GATA y CACC/GGTG, de tal modo que probablemente esta región se une de manera específica a factores de transcripción que interactúan entre sí dentro del complejo de transcripción, es decir que la RCL actuaría como un grupo de "intensificadores" y "silenciadores" (véase cap. 5). La distancia física entre la RCL y cada gen de globina es importante para la regulación; si se invierte de modo artificial el orden de los genes γ y β, el gen β se expresa precozmente, mientras el gen γ queda reprimido de manera temprana. Se supone que la RCL se encuentra en una parte del ADN que hace un lazo sobre sí mismo y acerca esta región a los genes de globinas, para permitir la interacción entre la RCL y los promotores próximos de cada gen de globina de la familia (fig. 15-14).

Hemoglobina de la anemia falciforme: primera enfermedad molecular

La primera demostración de que un cambio estructural en una proteína está asociado a una enfermedad hereditaria se obtuvo con la hemoglobina S (del inglés "sickle" = hoz) presente en la anemia falciforme. Esta enfermedad es una anemia grave en los homocigotas (patrón de herencia recesivo, aunque como los heterocigotas no son normales, puede caratularse de intermedia); en los heterocigotas, en condiciones ambientales normales, generalmente es asintomática y se denomina el "rasgo de células falciformes" Sin embargo, en ciertas condiciones los heterocigotas pueden sufrir "crisis" con síntomas parecidos a los del homocigota, pero pasajeros. Hay además heterocigotas compuestos" es decir, heterocigotas que contienen la mutación para Hb S y otra mutación diferente, con síntomas variables. La enfermedad cursa como una anemia hemolítica crónica, con crisis dolorosas en los miembros, ictericia, fiebre, esplenomegalia e incapacidad de excretar orina concentrada; en el examen sanguíneo, se observan eritrocitos defor-

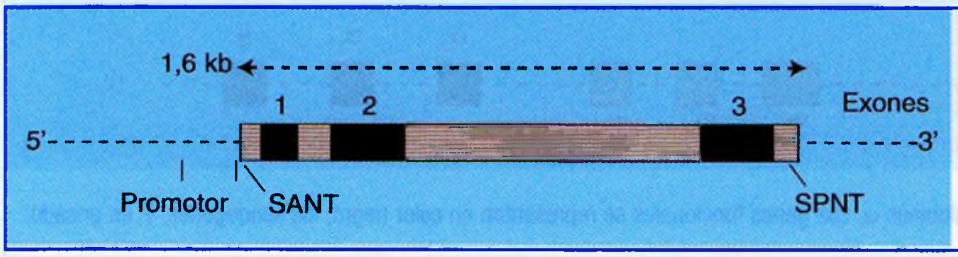


Fig. 15-13. Estructura de un gen de la familia β de las globinas. Los exones se representan en negro; las regiones no traducidas (SANT, SPNT) y los intrones en grisado.

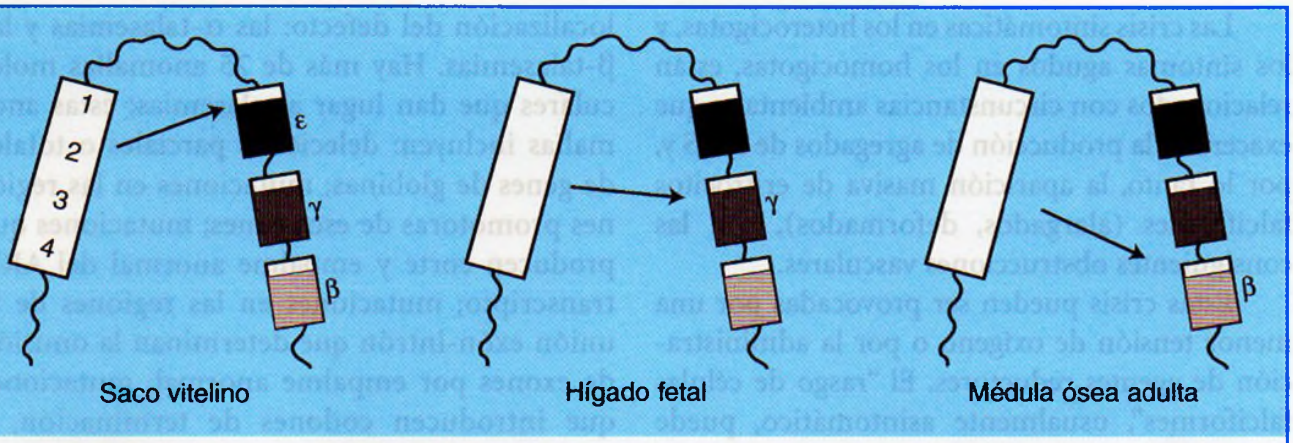


Fig. 15-14. Interacción sucesiva de la región controladora (RCL) con los genes de la familia β.

mados, alargados, con forma de hoz, y la movilidad electroforética es anormal para la hemoglobina. Esta anemia afecta sobre todo a las poblaciones negras de África occidental y a la población de origen africano de los Estados Unidos (1 en 500 nacidos entre estos últimos); el "rasgo de células falciformes" (heterocigotas) se encuentra en 1 de cada 11 personas de raza negra en los Estados Unidos. La patogenia de la enfermedad radica en la presencia de la hemoglobina S anormal, que tiende a constituir agregados moleculares en forma de largas columnas dentro del eritrocito, frente a una baja tensión de oxígeno.[28] Los eritrocitos se deforman a causa de los agregados moleculares de Hb S; estos eritrocitos alargados producen un aumento de la viscosidad de la sangre, con disminución de la velocidad de circulación en los capilares; luego ocurre la oclusión de vasos sanguíneos con el consiguiente infarto en diversos órganos: bazo, riñón, médula ósea, sistema nervioso. El origen de la enfermedad es una mutación puntual (β6A3 Glu → Val) en el primer exón de la globina β, consistente en la transversión de una base (timina) por otra (adenina), que lleva a cambiar la codificación del sexto aminoácido de la globina β (el ácido glutámico original es reemplazado por el aminoácido neutro valina). Este cambio simple es suficiente para permitir que predominen las uniones hidrófobas entre moléculas de hemoglobina y se formen largas columnas o agregados moleculares de Hb S (fig. 15-15).

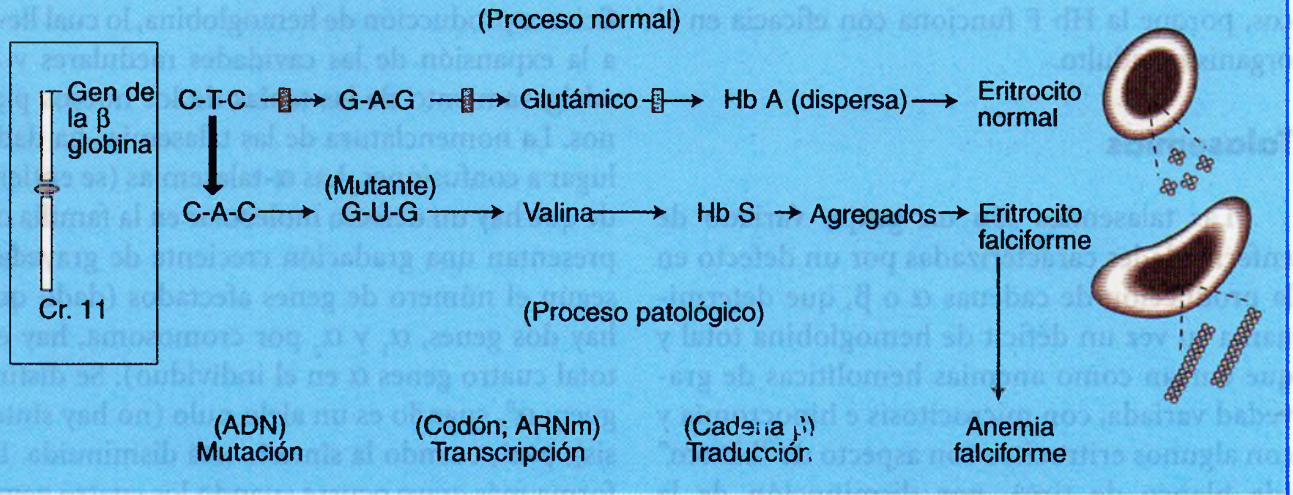


Fig. 15-15. Patogenia molecular de la formación de eritrocitos falciformes.

Las crisis sintomáticas en los heterocigotas, y los síntomas agudos en los homocigotas, están relacionados con circunstancias ambientales que exacerban la producción de agregados de Hb S y, por lo tanto, la aparición masiva de eritrocitos falciformes (alargados, deformados), con las consiguientes obstrucciones vasculares.

Estas crisis pueden ser provocadas por una menor tensión de oxígeno o por la administración de agentes reductores. El "rasgo de células falciformes" usualmente asintomático, puede adoptar las características de la anemia grave del homocigota si el portador viaja en un avión con cabina no presurizada; esto muestra claramente el hecho central de la genética, es decir, que el fenotipo es el resultado de la *interacción del ambiente y el genotipo* (véase cap. 2).

Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (PHHF)

En esta anomalía, la hemoglobina fetal Hb F (fórmula $\alpha_2{}^A\gamma_2$) no es reemplazada por la hemoglobina A adulta y, frecuentemente, tampoco se produce la hemoglobina menor, A2. Esto implica que no se transcriban los genes de las cadenas β y δ. Las causas de esta anomalía son múltiples y se agrupan en dos clases: 1) PHHF por deleción δ-β, y 2) PHHF por mutaciones de punto; de esta última hay dos subclases, según se incremente la expresión del gen ${}^A\gamma$ o el ${}^G\gamma$. Las mutaciones de punto recaen sobre la región promotora de los genes γ. La PHHF no produce efectos patológicos, porque la Hb F funciona con eficacia en el organismo adulto.

Talasemias

Las talasemias son un grupo variado de enfermedades caracterizadas por un defecto en la producción de cadenas α o β, que determinan a su vez un déficit de hemoglobina total y que cursan como anemias hemolíticas de gravedad variada, con microcitosis e hipocromía y con algunos eritrocitos con aspecto de "blanco" (de blanco de tiro), por disminución de la hemoglobina. Las talasemias se pueden dividir en dos clases principales, de acuerdo con la localización del defecto: las α-talasemias y las β-talasemias. Hay más de 75 anomalías moleculares que dan lugar a talasemias; estas anomalías incluyen: deleciones parciales o totales de genes de globinas; mutaciones en las regiones promotoras de esos genes; mutaciones que producen corte y empalme anormal del ARN transcripto; mutaciones en las regiones de la unión exón-intrón que determinan la omisión de exones por empalme anormal; mutaciones que introducen codones de terminación, y otros tipos de mutaciones.[29] Las deleciones predominan en las talasemias α, mientras que las mutaciones puntuales predominan en las talasemias β.

Las talasemias no sólo presentan un déficit global en la producción de Hb, sino que también hay un desequilibrio entre las cadenas producidas; las cadenas con producción deficitaria son generalmente α o β, y ese déficit se acompaña con un exceso de producción de cadenas no involucradas en el defecto molecular (muchas veces la γ). En ciertas α-talasemias hay hemoglobinas anormales, sin ninguna cadena de tipo α, tales como la Hb Barts (γ_4) y la Hb H (β_4). Las globinas sintetizadas en exceso y no integrantes del tetrámero son inestables y precipitan dentro de las células hemopoyéticas y los eritrocitos, produciendo "cuerpos de inclusión", que contribuyen a incrementar la fragilidad de estas células y a acelerar su destrucción por parte del reticuloendotelio, especialmente en el bazo y la médula ósea. Ésta es hiperplásica por reacción a la ineficiente producción de hemoglobina, lo cual lleva a la expansión de las cavidades medulares y al adelgazamiento de las tablas de los huesos planos. La nomenclatura de las talasemias ha dado lugar a confusiones. Las α-talasemias (se entiende que hay un defecto molecular en la familia α) presentan una gradación creciente de gravedad según el número de genes afectados (dado que hay dos genes, α_1 y α_2 por cromosoma, hay en total cuatro genes α en el individuo). Se distinguen: α^0, cuando es un alelo nulo (no hay síntesis), y α^+, cuando la síntesis está disminuida. La forma más grave ocurre cuando los cuatro genes α están afectados (-,-/-,-); no hay globina α, ni se forma Hb A ni Hb F; sólo se forma Hb Barts (γ4)

y hay hidropesía fetal, edema, hepatoesplenomegalia e insuficiencia cardíaca. Cuando hay sólo uno o dos genes α afectados, es asintomática.

Las β-talasemias también son heterogéneas aun en mayor grado; se distingue como β^0 el tipo que no produce cadena β, y como β^+ el tipo con disminución de las cadenas β. Los llamados "homocigotas β^0" son generalmente heterocigotas compuestos de dos mutaciones diferentes; estos pacientes tienen una anemia hemolítica grave.

El tratamiento de las talasemias graves no ha sido muy eficaz. Las transfusiones llevan a una acumulación de hierro que se torna un problema serio. Esta enfermedad es candidata para terapia génica.

RESUMEN

Las anomalías genéticas de proteínas estructurales forman un grupo importante de enfermedades hereditarias, distinguible de los errores congénitos del metabolismo (con enzimas alteradas). Este grupo comprende las anomalías de proteínas estructurales intracelulares (como las queratinas); las anomalías de proteínas extracelulares (como el colágeno); las anomalías de proteínas de membrana (como el canal de Cl^- de la fibrosis quística y el receptor de LBD de la hipercolesterolemia) y las anomalías de proteínas transportadoras (como las hemoglobinas). Los componentes de los filamentos intermedios son (a excepción de las láminas) variables en células indiferenciadas; dado que las mutaciones de sus genes no afectan la viabilidad del organismo, éstas son más fáciles de detectar. Hay 54 formas moleculares diferentes de queratinas y todas ellas presentan una cabeza globular, un segmento medio helicoidal (con cuatro subsegmentos, 1A, 1B, 2A, 2B-S) y una cola globular. Para formar filamentos, se unen dos queratinas diferentes en un heterodímero; hay una gran cantidad de tipos posibles de filamentos, lo cual permite que diferentes epitelios tengan queratinas propias y específicas, y que dentro de un epitelio, las células a alturas diferentes tengan queratinas específicas (Q1 y Q10 en capas medias; Q2e en superficiales). La familia génica I de queratinas se localiza en el cromosoma 17 (17q), y la familia génica II de queratinas está en el 12q. Se conocen una treintena de mutaciones de queratinas, asociadas con enfermedades con herencia *dominante* como la epidermólisis ampollar simple. En estas enfermedades se altera la estabilidad mecánica de los queratinocitos, y traumas mecánicos mínimos los destruyen provocando ampollas intraepidérmicas.

Los colágenos constituyen una familia de proteínas muy variadas; además de las diferentes formas moleculares, también hay diversos modos de asociación entre ellas, lo cual les permite producir una extensa gama de matrices extracelulares. Se conocen 29 tipos de colágeno, formados por tres cadenas α helicoidales. Los genes *COL* (uno para cada tipo de cadena α) están dispersos en el genoma humano, pero tienen idéntica organización en la parte codificante del dominio helicoidal central: allí todos los exones contienen un número de bases que es múltiplo de 9, y todos ellos comienzan por la codificación de glicina y terminan por la del aminoácido "Y". El gen *COL1A1*, localizado en el cromosoma 17, tiene 51 exones; del 6 al 47 corresponden al dominio helicoidal de la proteína. Hay más de 200 mutaciones del *COL1A1,* sobre todo del segmento helicoidal central, y afectan especialmente las codificaciones de glicina iniciales de cada subunidad Gli-X-Y, las cuales son esenciales. Estas mutaciones determinan las osteogénesis imperfectas, de herencia dominante, puesto que la proteína mutante interfiere con la normal y provoca su degradación ("suicidio proteínico"). En la osteogénesis imperfecta hay fracturas múltiples, esclerótica azulada y otros signos (pleiotropía) originados en las mutaciones en COL1A1. En el síndrome de Marfan (dominante) hay una *fibrilina* mutante que causa anomalías del tejido elástico y del ligamento suspensor del cristalino. También se ha reconocido que el sistema de señales del factor de crecimiento y diferenciación TGFβ está alterado y esta alteración es clave en la producción de los defectos vasculares. Las mutaciones del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LBD)

determinan a hipercolesterolemia familiar. No se produce el fenómeno normal de endocitosis de las LBD guiado por los receptores. El gen del receptor está en el cromosoma 19 y contiene 18 exones cortos; la proteína tiene cinco dominios característicos y las mutaciones en cada dominio tienen efectos definidos. La enfermedad es dominante; los heterocigotas tienen 300-570 mg/100 mL de colesterol y los homocigotas el doble, con una incidencia de infartos mayor y más temprana. La falta de endocitosis altera la síntesis autorregulada de colesterol, por lo cual la dieta no es eficaz en los homocigotas. Las hemoglobinas (Hb) son proteínas tetraméricas formadas por dos dímeros; la HbA del adulto es $\alpha_2{}^A\beta_2{}^A$. La estructura terciaria (plegamiento) de cada cadena de globina está determinada por su secuencia de aa (estructura primaria) y por los ocho segmentos helicoidales (A-H). Hay seis hemoglobinas normales (Gower I, Gower II y Portland en el embrión hasta el tercer mes; Hb F en el feto hasta el nacimiento; Hb A y Hb A2 desde el primer año de vida a la adultez) y medio millar de Hb anormales o variantes. Hay dos procesos de cambio de Hb: uno alrededor del tercer mes del desarrollo embrionario y otro en el período posnatal. La familia génica α, en el cromosoma 16p, contiene tres genes funcionales: ζ, α_1 y α_2, y tres seudogenes; la familia génica β contiene cinco genes (ε, $^G\gamma$, $^A\gamma$, δ y β) y dos seudogenes. El orden de los genes tiene significación funcional. Cada gen es pequeño (1,6 kb el β; 0,8 kb el α) con sólo tres exones, una SANT y una SPNT. La "región controladora de locus" (RCL) está involucrada en los cambios de hemoglobinas durante el desarrollo, mediante la interacción con los promotores de cada gen. La anemia falciforme se debe a una mutación puntual, β6A3 Glu → Val, que determina la agregación de la Hb S y la deformación de los eritrocitos (alargados, en hoz).

Las talasemias (más de 75 formas moleculares) son anemias hemolíticas con déficit de Hb y con desequilibrio de las cadenas de globina producidas. Se agrupan en α-talasemias (cuya gravedad se incrementa con el número de genes α afectados) y β-talasemias (más graves en los "homocigotas" para alelos nulos, β^0)

REFERENCIAS

1. Hedberg KK, Chen LB. Absence of intermediate filaments in a human adrenal cortex carcinoma-derived cell line. Exp Cell Res 1986;163:509-517.
2. McLean WHI, Lane EB. Intermediate filaments in disease. Curr Opin in Cell Biol 1995;7:118-125.
3. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. J Cell Biol 2006;174:169-174.
4. Zimek A, Weber K. Terrestrial vertebrates have two keratin gene clusters, striking differences in teleost fish. Europ J Cell Biol 2005;84:623-635.
5. Moll R, Divo M, Langbein L. THe human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol 2008;129:705-733.
6. Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. Cell 1995;80:83-93.
7. Rosenberg M, Ray Chaudhury A, Shows T, Le Beau MM, Fuchs E. A group of tipe I keratin genes on human chromosome 17; characterization and expression. Mol Cell Biol 1988;8:722-736.
8. Lane EB. Keratin diseases. Current Opinion in Genetics and Develop 1994;4:412-418.
9. Epstein EH. Molecular genetics of epidermolysis bullosa. Science 1992;256:799-804.
10. Hulmes DJS. The collagen superfamily diverse structures and assemblies. In: Tipton KF (ed). Essays in Biochemistry, vol. 27. London: Portland Press; 1992. p. 49-65.
11. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. TIG 2004;20: 33-43.
12. Vuorio E, de Crombrugghe B. The family of collagen genes. Annu Rev Biochem 1990;59:837-872.
13. D'Alessio M, Bernard M, Pretorious PJ, de Wet W, Ramírez F. Complete nucleotide sequence of the region encompassing the first twenty-five exons of the human proα1(I) collagen gene (COL1A1). Gene 1988;67:105-115.
14. Deak SB, Scholz PM, Amental PS, Constantinou CD, Levi Minzi SA, González-Lavin L, Mackenzie JW. The substitucion of arginine for glycine 85 of the α1(I) procollagen chain results in mild osteogenesis imperfecta. J Biol Chem 1991; 266: 21827-21832.

15. Willing MC, Pruchno CJ, Atkinson M, Byers PH. Osteogenesis imperfecta type I is commonly due to a COL1A1 nul allele of type I collagen. Am J Hum Genet 1992;51:508-515.
16. Putnam EA, Cho M, Zinn AB, Towbin JA, Byers PH, Milewicz DM. Delineation of the Marfan phenotype associated with mutations in exons 23-32 of the FBN1 gene. Amer J Med Genet 1996;62:233-242.
17. Liu W, Qian C, Comeau K, Brenn T, Furthmayr H, Francke U. Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGFlike domains disrupt microfibril assembly and cause severe Marfan syndrome. Hum Molec Genet 1996;5:1581-1587.
18. Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, et al.The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. J Med Genet 2006;10:769-787.
19. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE et ai. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. Nature Genet 2003;33:407-411.
20. Mizuguchi T, Matsumoto N. Recent ptrogress in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. J Hum Genet 2007;52:1-12.
21. Pyeritz RE. A smail molecule for a large disease. New Eng J Med 2008;358:2829-2831.
22. Mcinnes RR, Byers PH. Biochemical genetics: examples of life after cloning. Current Opinion in Genet and Develop 1993;3:475-483.
23. Südhof TC, Goidstein JS, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. Science 1985;228:815-822.
24. Huijgen R, Vissers MN, Defesche JC et al. Familial hypercholesterolemia: current treatment and advances in management. Expert Rev Cardiovasc Threr 2008;6:567-581.
25. Dickerson RE, Geis I. The structure and action of proteins. New York: Harper & Row; 1969.
26. Collins FS, Weissman SM. The molecular genetics of human hemoglobins. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1985;31:315-462.
27. Crossley M, Orkin SH. Regulation of the β-globin locus. Current Opin Genetics and Develop 1993;3:232-237.
28. Murayama M. Molecular mechanism of red cell "sickling" Science 1966;153:145-149.
29. Orkin SH, Kazazian HH. The mutation and polymorphisms of the human β-globin gene and its surrounding DNA. Ann Rev Genet 1984;18:131-171.

15. Willing MC, Pruchno CJ, Atkinson M, Byers PH. Osteogenesis imperfecta type I is commonly due to a COL1A1 null allele of type I collagen. Am J Hum Genet 1992;51:508-515.
16. Putnam EA, Cho M, Zinn AB, Towbin JA, Byers PH, Milewicz DM. Delineation of the Marfan phenotype associated with mutations in exons 23-32 of the FBN1 gene. Am J Med Genet 1998;82:233-242.
17. Liu W, Qian C, Comeau K, Brenn T, Furthmayr H, Francke U. Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGFlike domains disrupt microfibril assembly and cause severe Marfan syndrome. Hum Molec Genet 1996;5:1581-1587.
18. Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, et al. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. J Med Genet 2006;10:769-787.
19. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. Nature Genet 2003;33:407-411.
20. Mizuguchi T, Matsumoto N. Recent progress in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. J Hum Genet 2007;52:1-12.
21. Pyeritz RE. A small molecule for a large disease. New Eng J Med 2008;358:2829-2831.
22. Mcinnes RR, Byers PH. Biochemical genetics: examples of life after cloning. Current Opinion in Genet and Develop 1993;3:479-488.
23. Sidhar TC, Goldstein JS, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. Science 1985;228:815-822.
24. Huijgen R, Vissers MN, Defesche JC et al. Familial hypercholesterolemia: current treatment and advances in management. Expert Rev Cardiovasc Ther 2008;6:987-981.
25. Dickerson RE, Geis I. The structure and action of proteins. New York: Harper & Row; 1969.
26. Collins FS, Weissman SM. The molecular genetics of human hemoglobins. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1985;31:315-462.
27. Cressely M, Orkin SH. Regulation of the β-globin locus. Current Opin Genetics and Develop 1993;3:232-237.
28. Murayama M. Molecular mechanism of red cell "sickling". Science 1966;153:145-149.
29. Orkin SH, Kazazian HH. The mutation and polymorphisms of the human β-globin gene and its surrounding DNA. Ann Rev Genet 1984;18:131-171.

Capítulo 16

Genética del desarrollo embrionario y ciliopatías

Cascadas y genes regulatorios. Proteínas ligadoras de ADN. Genes HOX. Genes PAX. Genética del desarrollo de los miembros. Genes y ciliopatías. Transporte intraflagelar. Síndrome de Kartagener. Poliquistosis renal. Otras ciliopatías

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario obedece a un plan genético, que aún está lejos de comprenderse plenamente. Este tema forma parte de una disciplina en pleno desarrollo, la Embriología Molecular, y de la Biología del Desarrollo actual. Por tal motivo en este libro solamente se tratarán algunos aspectos generales de los genes del desarrollo embrionario y se verán ejemplos de algunos de los principales genes de esta categoría. En particular se tratarán algunos genes asociados con las cilias primarias de células embrionarias, cuyas alteraciones están involucradas en varias enfermedades. La comprensión del desarrollo ha progresado sobre todo en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*: en ella se conocen el mecanismo de determinación de los dos ejes principales del embrión (anteroposterior y dorsoventral), así como el mecanismo general de segmentación y el mecanismo de asignación del tipo de estructura segmentaria por los genes llamados "homeóticos" (para el desarrollo de antena, pata, ala, etc.).[1] Sin embargo, los resultados en *Drosophila* no son fácilmente extrapolables a los vertebrados, dadas las diferencias en el proceso de desarrollo entre un animal protostomado como la mosca y los deuterostomados como los vertebrados (se denominan protostomas aquellos animales en cuyo desarrollo temprano se forma un orificio primario que representa la boca, generalmente una gástrula formada por invaginación y un mesodermo formado a partir de dos células del endodermo; en los deuterostomas el esbozo de la boca es posterior a la formación de otro orificio que desemboca en el intestino primitivo y la gastrulación es mucho más compleja). A pesar de las grandes diferencias entre la mosca y los vertebrados, en estos últimos se encuentran también los mismos genes "homeóticos" de la mosca,[2] con una disposición en familia génica parecida a la de *Drosophila*. De esta manera, la investigación de estos genes "homeóticos" humanos, como los genes llamados *HOX* y *PAX* (que tienen equivalentes en la mosca, respectivamente, los genes "HOM-C" y el gen de segmentación "apareado"), se ha convertido en un tema central que ha dado los primeros ejemplos de perturbaciones del desarrollo humano temprano por alteración de genes reguladores. El estudio de los procesos genéticos del desarrollo es muy difícil en los mamíferos, dado que las mutaciones de

genes muy básicos para este proceso generalmente son *letales muy tempranas* y determinan un aborto que es difícil de detectar; por ello se ha propuesto un modelo de estudio en el pez "cebra" (*Danio rerio*), que –al ser un vertebrado– posee un desarrollo embrionario parecido al humano, pero con un embrión de vida libre y además transparente, lo cual permite seguir el proceso de gastrulación, formación del tubo neural y de los somitas bajo la lupa.[3]

Desde el punto de vista de la Genética Médica, los procesos genéticos de desarrollo mejor comprendidos en la especie humana son los del desarrollo de los miembros y algunos procesos de desarrollo particulares, como el ojo, por lo cual estos procesos serán resumidos aquí, junto a algunos ejemplos de los genes *PAX* y los mecanismos generales de regulación génica del desarrollo.

El común denominador de todos los temas de este capítulo es la intervención de *genes reguladores*. Es conveniente destacar que alrededor de la mitad de los genes humanos son de tipo regulador o son transductores de señales (por oposición a los genes de mantenimiento, los cuales codifican proteínas que quedan en el citoplasma y son el paso final de la codificación). Los genes reguladores funcionan de otra forma: su producto (o proteína, casi siempre; a veces su ARN) funciona *en el núcleo*, sobre otro gen, por lo general sobre el promotor o la región intensificadora-silenciadora del gen. Por su parte, los *productos de* genes transductores de señales intercelulares (que convierten la captación de una molécula mensajera en un estímulo de tipo bioquímico dentro de la célula receptora) por lo común modifican el estado de diferenciación de una célula y llevan a la activación o represión de ciertos genes. La gran cantidad de genes reguladores está en relación con la gran plasticidad y versatilidad de funciones del genoma humano.

Mecanismo general de los genes reguladores del desarrollo: cascadas regulatorias

En términos generales, se puede decir que los genes de desarrollo codifican proteínas que regulan otros genes, los que a su vez codifican otras proteínas; estas últimas pueden a su vez regular otros genes o simplemente funcionar, como paso final, en el citoplasma. De esta manera, se constituyen *cascadas regulatorias*, donde en cada nivel un gen maneja la función de otro gen, activándolo o reprimiéndolo (fig. 16-1). En forma más restringida, se puede decir que muchos genes del desarrollo codifican *factores de transcripción* (véase cap. 5), los cuales funcionan sobre otros genes que, a su vez, codifican otros factores de transcripción. Por ello es importante el concepto de "genes blanco" Se denomina genes blanco a aquellos cuya función depende del producto génico de otro gen (regulatorio); un gen blanco puede ser regulatorio (si a su vez tiene un "blanco") o ser un gen "final" cuya proteína queda y funciona en el citoplasma. Este mecanismo no es –como parece a primera vista– redundante, porque determina la existencia de "genes interruptores de función" o, simplemente, genes *interruptores* a diferentes niveles; además, sirve de cronograma para activar o silenciar una función en momentos predeterminados, a un número de horas o días de la fertilización.

La existencia de genes *interruptores* (a veces llamados también *conmutadores*) es fundamental porque permite resumir toda una serie de procesos bajo una sola señal directiva; esta señal, por ejemplo, puede determinar la formación de un miembro superior en vez de uno inferior o el establecimiento de la gónada masculina en vez de la gónada femenina (uno de los genes interruptores mejor conocidos es el gen *SRY* del cromosoma Y humano; véase cap. 10). La existencia de genes *interruptores* permite la constitución de *niveles* sucesivos de regulación génica; estos niveles permiten organizar un cronograma definido para la activación y el silenciamiento específico de ciertos genes en momentos determinados del desarrollo. Se requiere este tipo de mecanismos para hacer posible, por ejemplo, la activación de los genes para las cadenas ε y ζ de las hemoglobinas embrionarias en el embrión temprano y su silenciamiento a partir del tercer mes del desarrollo (véase cap. 15).

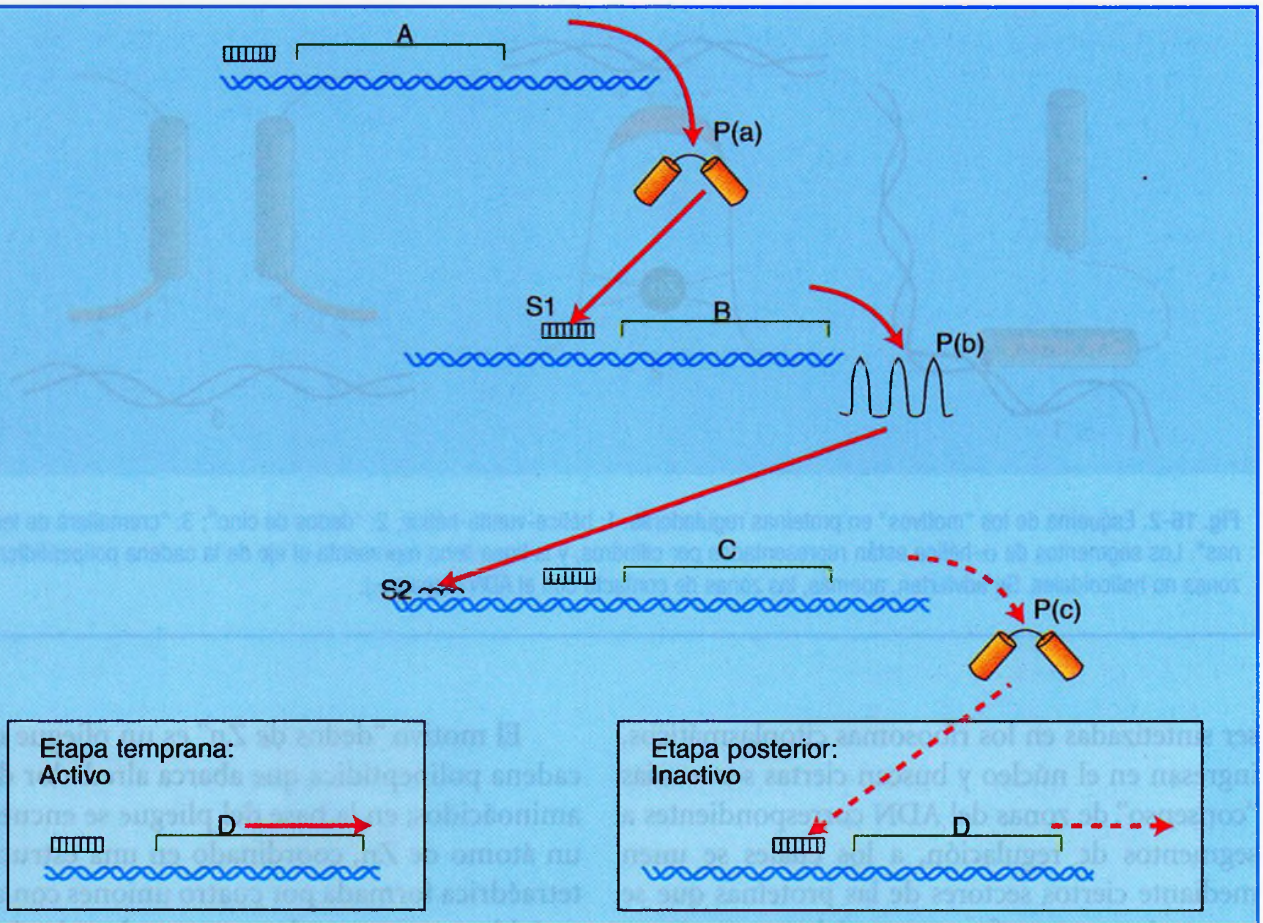


Fig. 16-1. Esquema de una cascada regulatoria ideal. El gen A, situado en el primer nivel, codifica la proteína reguladora P(a), con un motivo "hélice-vuelta-hélice" que le permite unirse específicamente a la secuencia S1 del ADN del promotor del gen B, por lo cual sirve para activar la transcripción del gen B. El gen B (2º nivel) codifica la proteína P(b), con "dedos de zinc", que le sirven para unirse específicamente a la secuencia S2 del intensificador-silenciador del gen C y determinar la represión de su transcripción y, por consiguiente, su producto, la proteína P(c), que activaba la transcripción del gen D, deja de sintetizarse, por lo cual cesa la producción de la proteína citoplasmática P(d); esto ocurre en un tiempo fijo, determinado por la duración de los procesos en los niveles 1 y 2 y el tiempo de agotamiento de la proteína P(c). De esta manera, queda determinado el momento del desarrollo en el que se "silenciará" al gen D y finaliza la expresión de una proteína exclusiva del desarrollo temprano.

Si bien el mecanismo general de estos genes es la constitución de cascadas regulatorias, el modo de operar es muy variado en cada caso; un producto de un gen regulatorio puede actuar como: a) un factor de transcripción, que activa la transcripción del gen *blanco*; b) un cofactor de transcripción, que se une a una de las proteínas del complejo de transcripción y activa o reprime la función total; c) un represor de transcripción, que se une a una secuencia del promotor del gen blanco e impide su transcripción; d) un activador del *intensificador*, que a su vez activa la transcripción del gen *blanco*; e) un silenciador del gen *blanco*, que actúa sobre la región *intensificadora-silenciadora*.

En todos los casos, el producto del gen regulador debe poseer la capacidad de reconocer una secuencia del ADN del gen *blanco* (en las regiones promotora o intensificadora-silenciadora) o un dominio proteínico de una proteína del complejo de transcripción del gen *blanco*. Esto lleva a resumir los "motivos" o secuencias especiales de proteínas que son capaces de reconocer secuencias de ADN e interactuar con ellas.

Proteínas ligadoras de ADN y sus "motivos"

Un numeroso grupo de proteínas es codificado por genes reguladores; estas proteínas, luego de

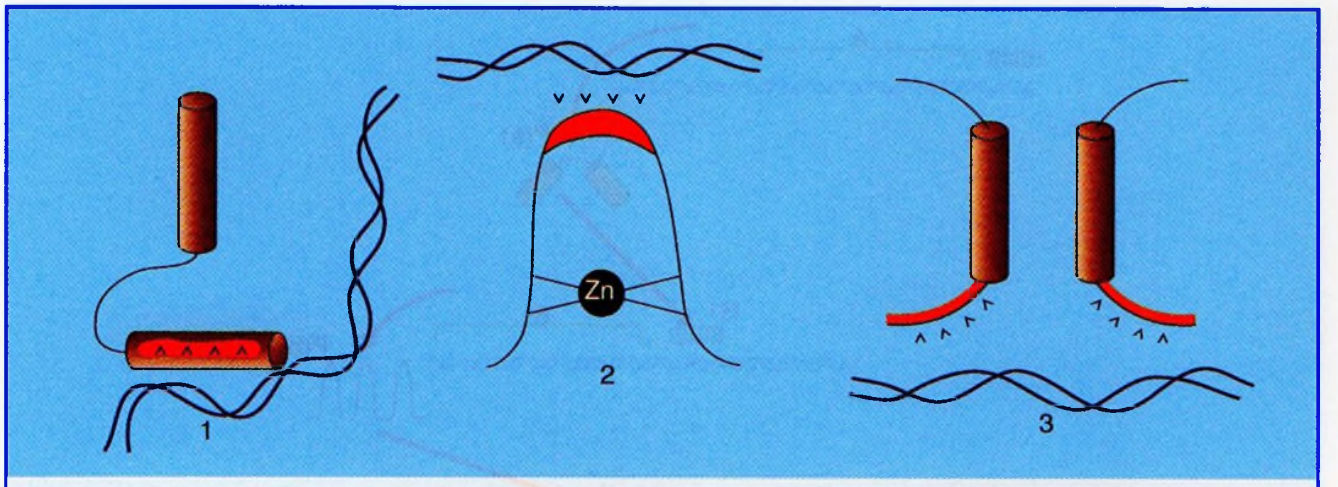


Fig. 16-2. Esquema de los "motivos" en proteínas reguladoras. 1: hélice-vuelta-hélice; 2: "dedos de cinc"; 3: "cremallera de leucinas" Los segmentos de α-hélice están representados por cilindros, y la línea llena representa el eje de la cadena polipeptídica en zonas no helicoidales. Se advierten, además, las zonas de contacto con el ADN (signos ^).

ser sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos, ingresan en el núcleo y buscan ciertas secuencias "consenso" de zonas del ADN correspondientes a segmentos de regulación, a los cuales se unen mediante ciertos sectores de las proteínas que se caracterizan por su forma espacial; estos sectores, que tienen la misma disposición espacial en diferentes proteínas, se denominan *motivos*. Hay tres tipos principales de motivos en las proteínas reguladoras: 1) hélice-vuelta- hélice; 2) "dedos de zinc" y 3) "cremallera de leucinas" (fig. 16-2).

El motivo hélice-vuelta-hélice (HVH) es el más común y se halla presente tanto en procariontes (represor del operón *lac*, represor del fago lambda) como en eucariontes: los productos de genes homeóticos, entre otros, tienen este motivo. Está formado por dos regiones de α-hélice separadas por un segmento no helicoidal que permite que las dos hélices estén perpendiculares entre sí. Una hélice se ubica en la ranura mayor del ADN y se fija allí en forma específica; la segunda hélice está dirigida en el sentido de la molécula de ADN pero se encuentra más lejos que la primera y no se une al ADN. Los homeodominios son las secuencias características de los productos de genes homeóticos, tanto de *Drosophila* como de los mamíferos (genes *HOX*); están constituidos por una variante de este tipo de "motivo", que tiene tres hélices y dos "vueltas" cercanas al extremo carboxilo.

El motivo "dedos de Zn" es un pliegue de la cadena polipeptídica que abarca alrededor de 30 aminoácidos; en la base del pliegue se encuentra un átomo de Zn, coordinado en una estructura tetraédrica formada por cuatro uniones con aminoácidos, que generalmente son dos cisteínas y dos histidinas (también puede estar formado por cuatro cisteínas). Por lo común, estas proteínas reguladoras tienen varios "dedos de Zn"; su número varía entre dos y nueve "dedos" Cada "dedo" hace contacto con una secuencia de ADN, y al haber varios "dedos" se establece una unión específica para una secuencia definida de ADN. Los dedos de Zn se encuentran en factores de transcripción y otros numerosos productos de genes reguladores.

La cremallera de leucinas es una región rica en leucinas en una α-hélice, de tal modo que las leucinas están siempre separadas por siete aminoácidos, lo cual hace que todas las leucinas estén en registro y orientadas hacia la misma cara externa. Dos cremalleras de leucinas, pertenecientes a dos proteínas reguladoras, interactúan por interdigitación y por interacción hidrofóbica para formar un dímero de proteínas ligadoras al ADN. La región adyacente a la cremallera es muy básica en cada una de las proteínas y es la región de asociación al ADN. Las cremalleras de leucinas son "motivos" en homodímeros o heterodímeros de proteínas

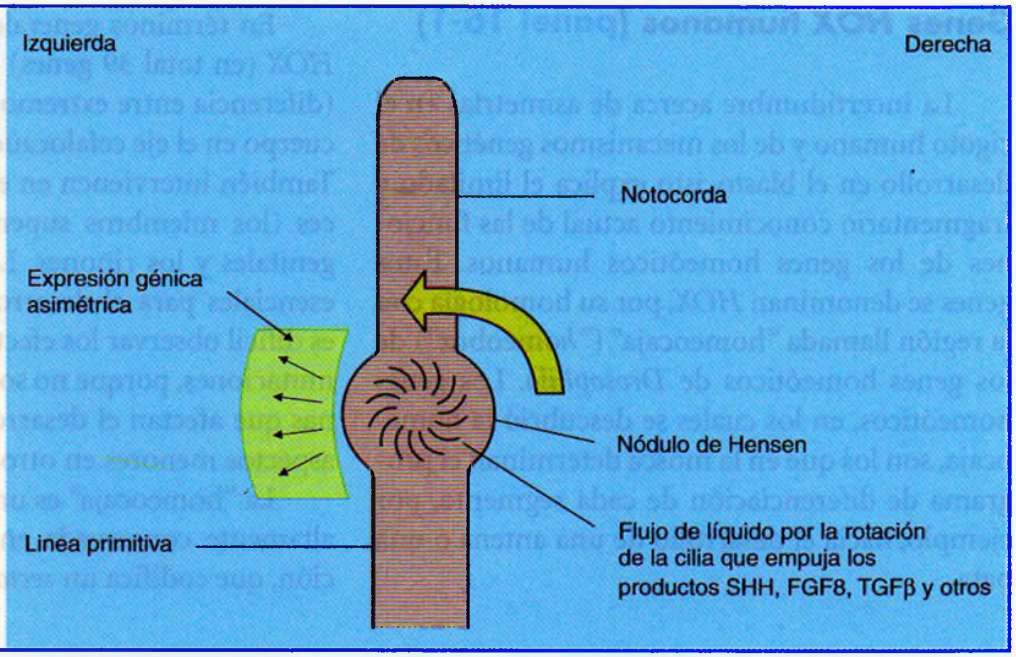


Fig. 16-3. Esquema del mecanismo de formación del eje izquierda-derecha por el flujo nodal.[7]

ligadoras al ADN, como ciertos factores de transcripción y ciertos productos de oncogenes.

Determinación de los ejes del embrión

El cigoto humano no presenta una asimetría evidente, como la que existe en casi todos los animales (excepto los mamíferos) y que da origen al primer eje embrionario, que por lo general es el eje anteroposterior o *cefalocaudal*. En el hombre y en los demás mamíferos, el primer eje es el dorsoventral; este eje surge luego de la cuarta división celular, por la formación de un macizo celular interno unido a un trofoblasto por lo que será la dirección dorsal del embrión;[4] el eje dorsoventral pasa por el centro del macizo celular interno y el polo del trofoblasto al cual se adhiere. El segundo eje del embrión humano es el anteroposterior. Se desconoce cuáles son los mecanismos de determinación de estos ejes; por consiguiente, no es posible generalizar los mecanismos más tempranos del desarrollo que ocurren en los cigotos asimétricos de *Drosophila* y de muchos vertebrados. En cambio, hay algunas evidencias sobre el control genético de la asimetría izquierda-derecha: 1) en el síndrome del cilio inmóvil (o de Kartagener), producido por la mutación de una proteína del axonema ciliar, generalmente la *dineína*, hay alrededor de un 50% de *situs inversus* total;[5] 2) en el ratón, la mutación recesiva *iv*, localizada a 3 cM del locus de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Igh-C), produce *situs inversus* en el 50% de los individuos, por lo cual se postula que esta mutación produce la pérdida de la función de determinación de asimetría izquierda-derecha y lleva a una condición aleatoria respecto de la simetría bilateral.[6]

Desde 2001 se han logrado importantes avances en el conocimiento de la determinación del eje izquierda-derecha.[7] Coincidiendo con la importancia del movimiento ciliar ya demostrada en el síndrome de Kartagener, en la actualidad la determinación de este eje se sabe que depende del movimiento de cilias primitivas localizadas en las células de revestimiento ventral del nódulo de Hensen en el embrión muy temprano. Estas células poseen una única cilia (monocilia) de tipo primitivo (no tiene el doblete central de microtúbulos) y, en vez del movimiento en un plano de las cilias comunes, tienen un movimento rotatorio, movimiento que depende de la proteína kinesina KIF3A y de la dineína. El movimiento rotatorio da lugar a un flujo de líquido intersticial embrionario, llamado "flujo nodal" y por las características del movimiento rotatorio en sentido único, el flujo da lugar a una distribución asimétrica de proteínas, de las cuales la erizo sónico SHH es un ejemplo (fig. 16-3).

Genes *HOX* humanos (panel 16-1)

La incertidumbre acerca de asimetrías en el cigoto humano y de los mecanismos genéticos de desarrollo en el blastocisto explica el limitado y fragmentario conocimiento actual de las funciones de los genes homeóticos humanos. Estos genes se denominan *HOX*, por su homología con la región llamada "homeocaja" ("*homeobox*") de los genes homeóticos de *Drosophila*. Los genes homeóticos, en los cuales se descubrió la homeocaja, son los que en la mosca determinan el programa de diferenciación de cada segmento, por ejemplo, hacia el desarrollo de una antena o una pata.

En términos generales, los grupos de genes *HOX* (en total 39 genes) organizan la polaridad (diferencia entre extremos) de los segmentos del cuerpo en el eje cefalocaudal (o anteroposterior). También intervienen en el desarrollo de apéndices (los miembros superiores e inferiores), los genitales y los riñones. Los genes *HOX* son tan esenciales para el desarrollo del organismo que es difícil observar los efectos de la mayoría de sus mutaciones, porque no son viables, excepto algunas que afectan el desarrollo de los miembros o aspectos menores en otros órganos.

La "homeocaja" es una secuencia de 180 pb, altamente conservada en el curso de la evolución, que codifica un *sector* de proteína, el cual se

Panel 16-1. Ácido retinoico y los genes *HOX*

El ácido retinoico es un derivado metabólico directo de la vitamina A, que es un producto necesario para la embriogénesis normal en todos los cordados, incluidos los vertebrados y, entre ellos, la especie humana y demás mamíferos; pero también esta sustancia es conocida como un poderoso agente teratógeno (productor de malformaciones) en embriones muy tempranos. Se han logrado evidencias de la relación entre el ácido retinoico (AR = RA en inglés) y la activación de algunos de los genes *HOX*, que a su vez están relacionados con la diferenciación de los segmentos del embrión en el eje anteroposterior (cabeza-cola o *cefalocaudal*). El ácido retinoico es sintetizado y segregado en el embrión temprano a nivel del *nódulo de Hensen* y de la *notocorda*;[8] este ácido es activador de genes que contengan regiones de control capaces de unirse a ciertos receptores nucleares proteínicos, los receptores de ácido retinoico y los receptores del retinoide X (receptores que se unen sólo a la forma 9-cis del ácido retinoico). Estas proteínas receptoras, que se unen al AR en sus diversas formas, pertenecen a la gran familia de proteínas receptoras de esteroides.[9] Es decir que el AR se une (es el "ligando") a receptores de dos tipos, que actúan como heterodímeros sobre secuencias especiales del ADN, situadas en regiones de control de algunos genes ("secuencias de respuesta al ácido retinoico" o ARRES = RARES en inglés, y secuencias de respuesta al retinoide X o RXRES):

(Activador)	(Proteína nuclear) (ADN)	
Ácido retinoico ⟶	Receptores AR (ARR) ⟶	ARRES
	Receptores RX (RXR) ⟶	RXRES

Entre los genes que poseen las secuencias de control de tipo ARRES o RXRES, se encuentran el *Hoxa1* y el *Hoxb1*, los cuales se transcriben en la región del rombencéfalo y en regiones axiales posteriores a éste, incluido el esqueleto axial. La acción teratogénica del AR se debería entonces a una hiperactivación de la familia génica *Hoxa* (en el ratón, en el que se han efectuado estas experiencias; en el hombre, la familia correspondiente es *HOX A*). Estas experiencias, así como las de "noqueo" de los genes *Hoxa*, muestran un típico efecto "homeótico". Esto significa que al "noquear" un gen *Hoxa* se hace "avanzar" un segmento del neuroeje en sentido más cefálico. En cambio el efecto homeótico tiene un sentido "posterior" o caudal en el caso de un tratamiento experimental con exceso de AR (hiperactivación de los genes *Hoxa*, que determina una "posteriorización" [en sentido caudal] de los segmentos axiales, en desmedro del mesencéfalo y el prosencéfalo). Estos datos, así como los relativos al desarrollo de los miembros, muestran el papel esencial de las familias *HOX* en el desarrollo del embrión temprano.

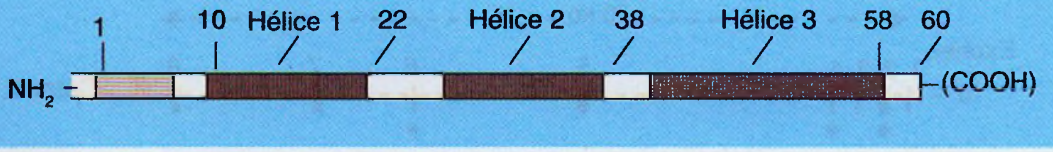


Fig. 16-4. Esquema de un homeodominio correspondiente al producto de un gen *HOX*.

denomina "homeodominio" de 60 aminoácidos, que forma 3 α-hélices y que es la parte que reconoce y se relaciona con una secuencia determinada de ADN. En la proteína HOX la parte que se asocia al ADN es en especial la tercera de las α-hélices (fig. 16-4).

Los genes *HOX* humanos se encuentran en cuatro familias génicas, las familias *HOX 1-HOX 4* (u *HOX A-HOX D*), que están localizadas respectivamente en las regiones cromosómicas 7p, 17q, 12q y 2q (fig. 16-5).[10]

Los genes *HOX* se activan en forma escalonada en segmentos del tubo neural, en segmentos de la cresta neural, en los esclerotomas de los somitas en desarrollo y en otros sectores del mesodermo paraxial;[11] esta activación escalonada sigue la misma disposición que la localización de los genes en cada familia génica *HOX* a lo largo de un cromosoma; por ejemplo, en el esbozo del cerebro posterior (rombencéfalo), que comprende ocho segmentos o rombómeras, asociados con los arcos branquiales 1-4, hay una activación escalonada de los genes *Hox b1-Hox b4* en el embrión del ratón.[12] Es decir que no solamente los genes *HOX* de una familia son físicamente colineales (están colocados en serie en un mismo cromosoma), sino que además son activados en un orden *temporal* que coincide con la colinearidad física.[13]

La función de los genes homeóticos humanos ha sido especialmente estudiada en el desarrollo de los miembros (véase más adelante).

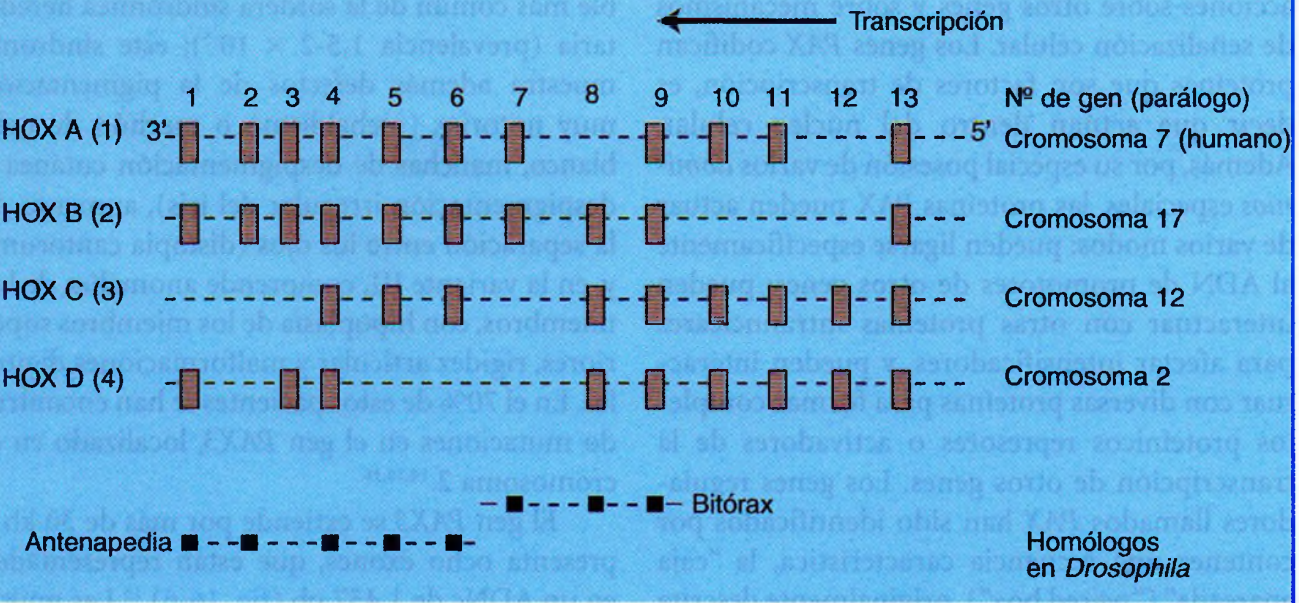


Fig. 16-5. Familias génicas *HOX* humanas. Cada familia génica contiene varios de los genes *HOX*, aunque pueden faltar algunos. Los genes homólogos de diferentes familias reciben el mismo número (arábigo) y se denominan "parálogos". Abajo se esquematizan los complejos génicos correspondientes de *Drosophila*. La dirección de la transcripción de cada gen está señalada por la flecha. El orden temporal en que se activan los genes es: primero los relacionados con segmentos cefálicos y últimos los relativos a segmentos caudales.

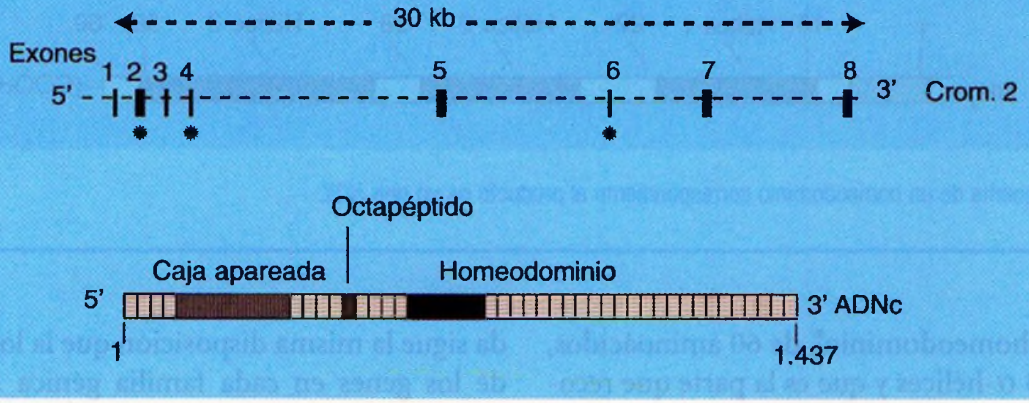


Fig. 16-6. Organización del gen *PAX3* (en el cromosoma 2). Los ocho pequeños exones están representados en el ADNc. En este último se señalan los sectores que codifican el dominio apareado, el octapéptido y el homeodominio. Los asteriscos en el ADN genómico (arriba) señalan la ubicación de mutaciones asociadas al síndrome de Waardenburg.[15]

Otros genes homeóticos, similares a ciertos genes de la segmentación, son los genes humanos *PAX*, cuyas alteraciones están asociados con ciertas malformaciones.

Genes *PAX*: síndrome de Waardenburg y gen *PAX3*

Los nueve genes *PAX* del desarrollo embrionario humano poseen poderosas y complejas acciones sobre otros genes y sobre mecanismos de señalización celular. Los genes *PAX* codifican proteínas que son factores de transcripción, es decir que actúan dentro del núcleo celular. Además, por su especial posesión de varios *dominios* especiales, las proteínas PAX pueden actuar de varios modos: pueden ligarse específicamente al ADN de promotores de otros genes; pueden interactuar con otras proteínas intranucleares para afectar intensificadores, y pueden interactuar con diversas proteínas para formar complejos proteínicos represores o activadores de la transcripción de otros genes. Los genes reguladores llamados *PAX* han sido identificados por contener una secuencia característica, la "caja apareada" ("*pa*ired bo*x*"), originalmente descrita en un gen de segmentación (*paired* = apareado) de *Drosophila*.[14]

La "caja apareada" (compuesta de dos subsegmentos, PAI y RED) es una secuencia que codifica el dominio "apareado" de 130 aminoácidos, que contiene una α-hélice y un motivo hélice-vuelta-hélice. Esta caja "apareada" tiene la propiedad de unirse a secuencias del ADN.

Desde 1993, se conocen nueve genes *Pax* (la nomenclatura en minúscula es del ratón) en el ratón, cuyo defecto produce anomalías del desarrollo temprano; esto llevó a la identificación de genes *PAX* humanos, asociados con malformaciones. El primer ejemplo humano corresponde al síndrome de Waardenburg, que es el responsable más común de la sordera sindrómica hereditaria (prevalencia 1,5-2 × 10^{-5}); este síndrome muestra además defectos de la pigmentación muy notorios (piebaldismo o mechón de pelo blanco, manchas de despigmentación cutánea y despigmentación irregular del iris), aumento de la separación entre los ojos (distopia cantorum) y, en la variante III, comprende anomalías de los miembros, con hipoplasia de los miembros superiores, rigidez articular y malformaciones digitales. En el 70% de estos pacientes se han encontrado mutaciones en el gen *PAX3*, localizado en el cromosoma 2.[14,15,16]

El gen *PAX3* se extiende por más de 30 kb y presenta ocho exones, que están representados en un ADNc de 1.437 pb (fig. 16-6).[15] Las múltiples funciones del gen *PAX3* se justifican por sus variantes producidas por empalme alternativo: en el ratón, el *Pax3* tiene siete isoformas por diferentes empalmes, que se activan en diferentes tejidos. Además, la proteína PAX3 puede asociar-

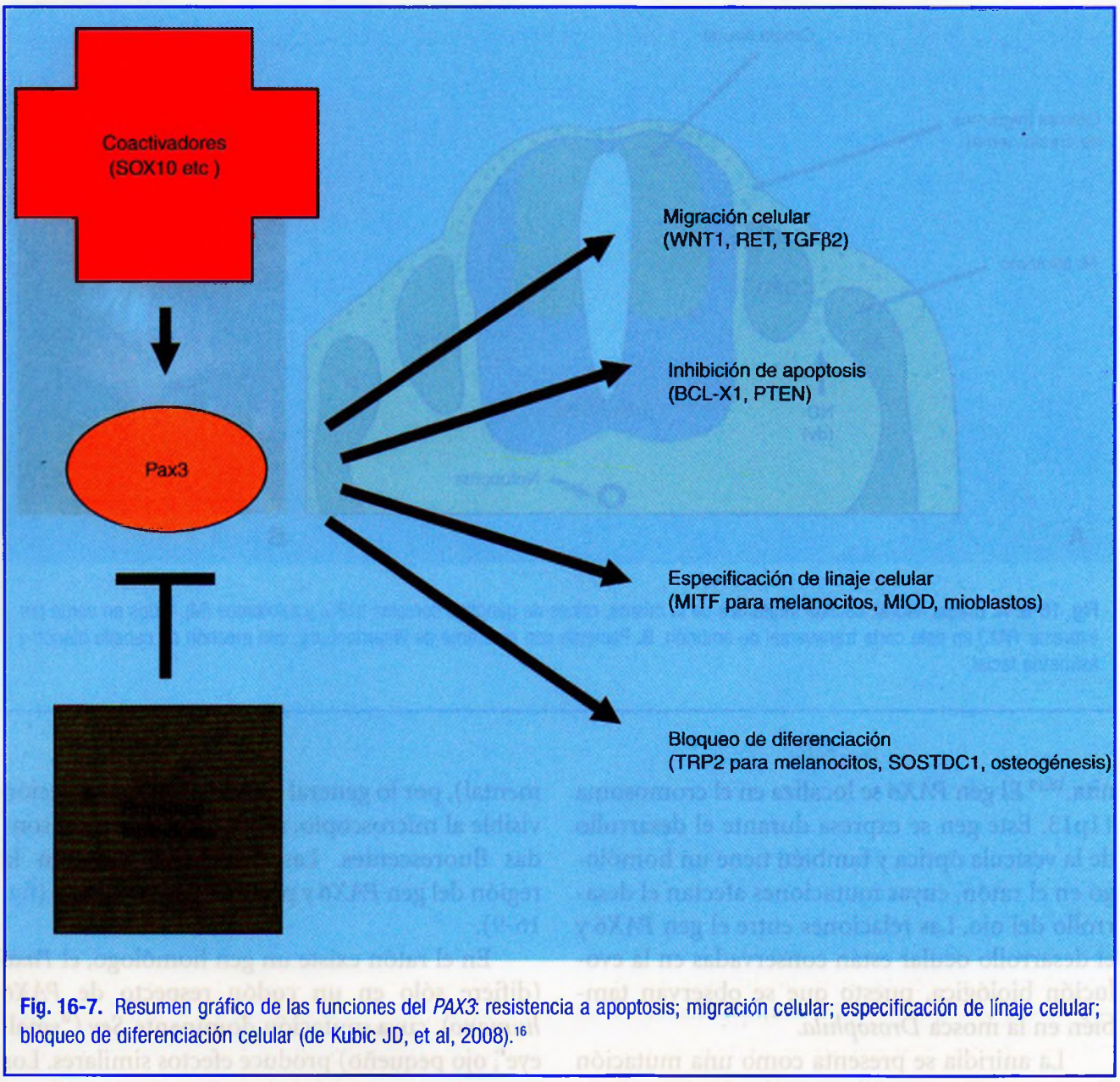


Fig. 16-7. Resumen gráfico de las funciones del *PAX3*: resistencia a apoptosis; migración celular; especificación de linaje celular; bloqueo de diferenciación celular (de Kubic JD, et al, 2008).[16]

se con múltiples proteínas y esto hace variar sus funciones.

Las mutaciones en el gen *PAX3* muestran que el síndrome de Waardenburg puede ser producido por mutaciones en varios de sus segmentos, en especial en el exón 2 que codifica el dominio apareado, de tal manera que el resultado se debe a una *pérdida de la función normal* del gen *PAX3*. Esta función se ejerce en el desarrollo temprano, a nivel del neuroepitelio y los dermatomiotomas, y en una subpoblación de las células de la cresta neural en el ratón.[16,17] Por consiguiente, se ha sugerido que la pérdida de la función del gen *PAX3* se traduce en: 1) progenies de melanocitos defectuosos, que dan la despigmentación en parches, 2) células defectuosas de la cresta neural en el oído interno, que producen la sordera y 3) información posicional errónea en células mesenquimáticas y de la cresta neural, que lleva al exceso de tejido interorbitario y a los defectos de los miembros. Todos estos efectos son mediados por genes "blanco" que son regulados por el gen *PAX3* (figs. 16-7 y 16-8).

La aniridia en el hombre: gen *PAX6*

El segundo ejemplo de un gen *PAX* anormal es el del gen *PAX6*, mutado en la aniridia congé-

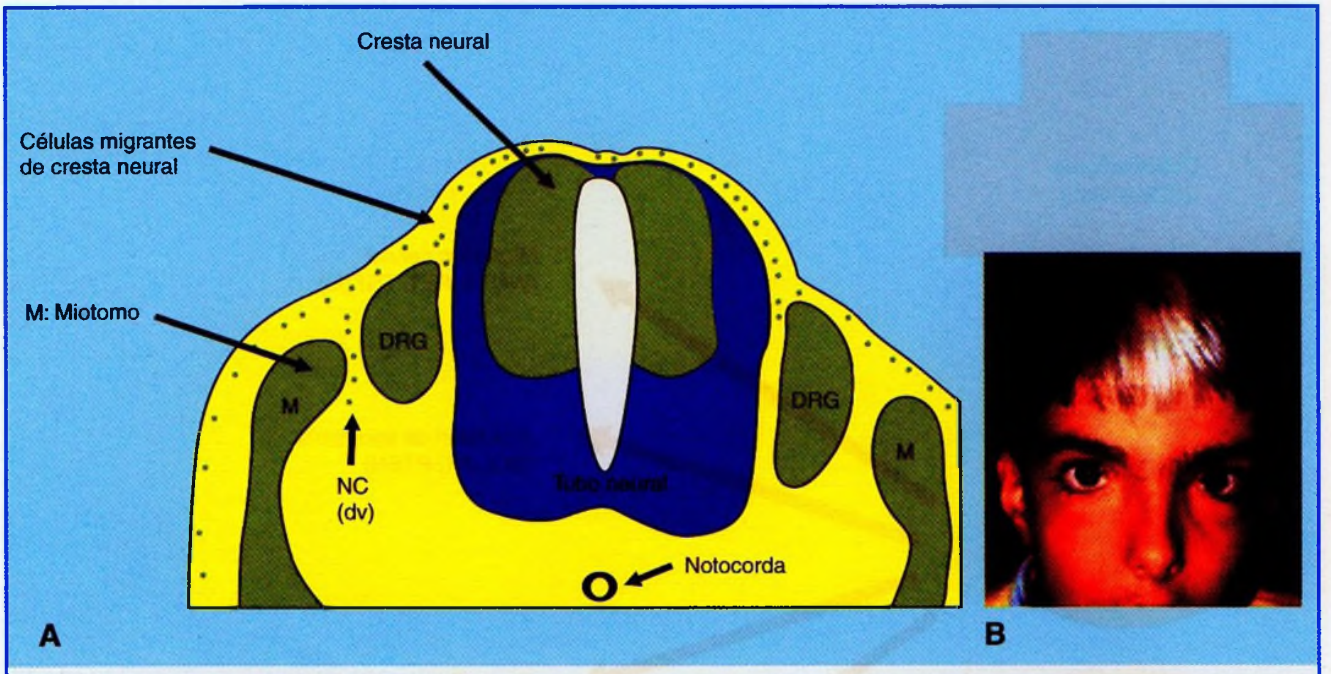


Fig. 16-8. A. Cresta neural, células migrantes de la misma, raices de ganglios dorsales (DRG) y miotomos (M), todos en verde por expresar *PAX3* en este corte transversal de embrión. **B.** Paciente con síndrome de Waardenburg, con mechón de cabello blanco y asimetría facial.

nita.[18,19] El gen *PAX6* se localiza en el cromosoma 11p13. Este gen se expresa durante el desarrollo de la vesícula óptica y también tiene un homólogo en el ratón, cuyas mutaciones afectan el desarrollo del ojo. Las relaciones entre el gen *PAX6* y el desarrollo ocular están conservadas en la evolución biológica, puesto que se observan también en la mosca *Drosophila.*

La aniridia se presenta como una mutación dominante (por insuficiencia haploide) y tiene una incidencia de 1:64.000. Es una malformación consistente en la falta de desarrollo del iris, lo cual da por resultado ya sea su ausencia total o la presencia de un vestigio. Se acompaña de otros defectos oculares, tales como catarata congénita, vascularización de la córnea y un grado variable de pérdida de la visión. Dos tercios de las veces, la aniridia es familiar y heredada, como mutación dominante con alta penetrancia; en un tercio (aproximadamente) es esporádica y en apariencia a causa de mutaciones "nuevas" En este último caso puede presentarse asociada con anomalías genitales, retraso mental y tumor de Wilms (renal), en lo que se denomina el síndrome WAGR (Wilms-aniridia-genital-retraso mental), por lo general causado por una deleción visible al microscopio, sobre todo si se usan sondas fluorescentes. Las deleciones incluyen la región del gen *PAX6* y parte de genes vecinos (fig. 16-9).

En el ratón existe un gen homólogo, el *Pax6* (difiere sólo en un codón respecto de *PAX6 humano*), cuya mutación dominante *Sey* ("small eye", ojo pequeño) produce efectos similares. Los homocigotas para la mutación de *Pax6* en el ratón no sobreviven, carecen de ojos y de cavidades nasales, y presentan defectos graves del desarrollo cerebral.[18]

Las mutaciones que producen la aniridia humana tienen un espectro característico; prácticamente todas ellas son de terminación de la cadena polipeptídica, de cambio de encuadre o de cambio de empalme, es decir que llevan a una pérdida de la codificación de una gran parte del gen, mientras que las mutaciones de cambio de sentido, que afectan un solo codón, muy raramente producen aniridia. Por otra parte, las deleciones que producen el síndrome WAGR no se diferencian de la aniridia simple en lo que respecta al ojo y, por consiguiente, la aniridia pare-

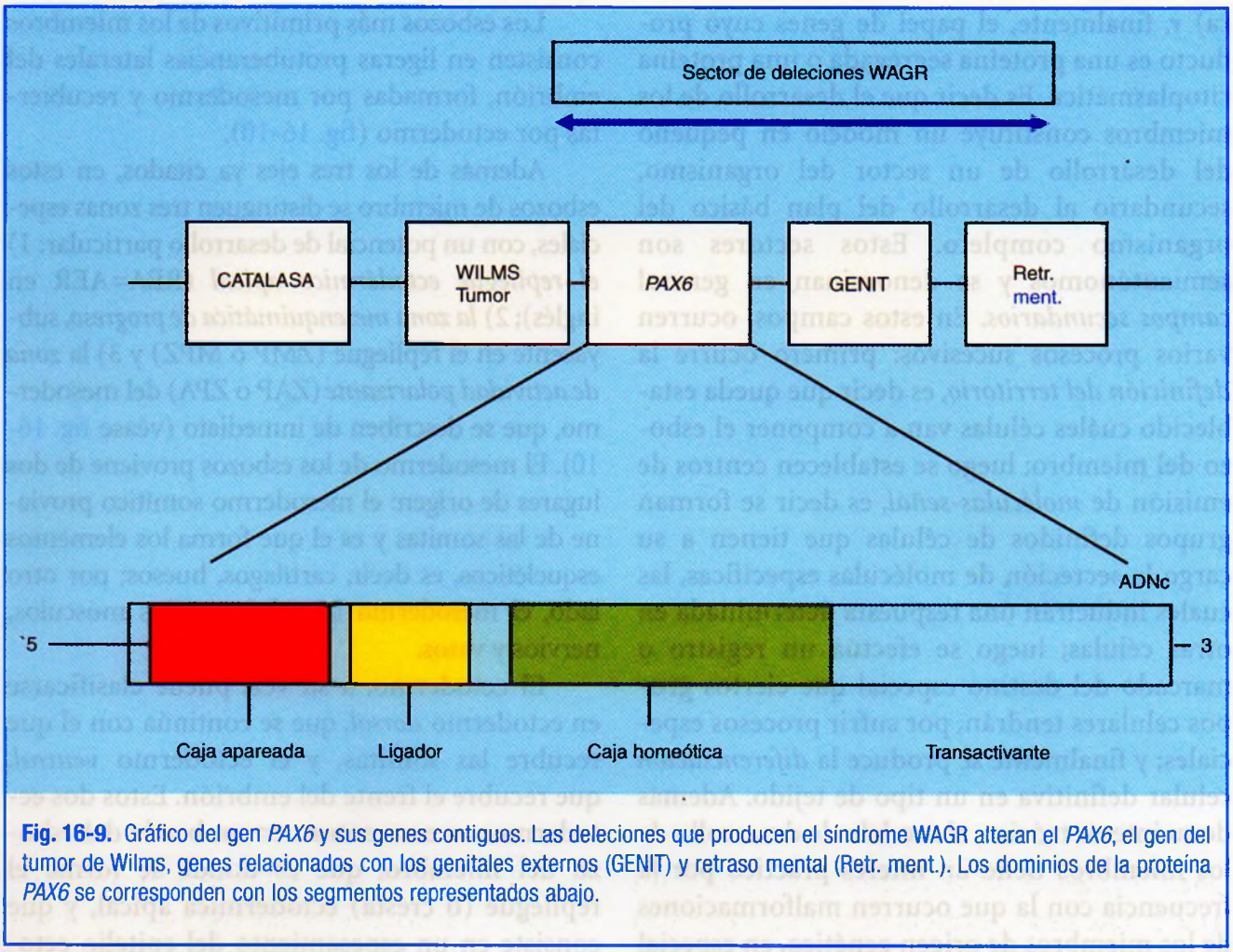


Fig. 16-9. Gráfico del gen *PAX6* y sus genes contiguos. Las deleciones que producen el síndrome WAGR alteran el *PAX6*, el gen del tumor de Wilms, genes relacionados con los genitales externos (GENIT) y retraso mental (Retr. ment.). Los dominios de la proteína *PAX6* se corresponden con los segmentos representados abajo.

ce ser el resultado de una pérdida total de la función de uno de los dos genes *PAX6* de las células.[18] Dado el carácter dominante de la mutación, es probable que el mecanismo patogénico sea por *insuficiencia haploide*, y teniendo en cuenta que en el ratón los homocigotas carecen de ojos y cavidades nasales, que se desarrollan de espesamientos del ectodermo o placodas, se ha sugerido que la función de *PAX6* se requiere para la transformación del epitelio en placoda, en forma cuantitativa, y que el desarrollo ocular es muy sensible a cambios en el nivel de la proteína derivada del gen *PAX6*.[18]

Por último, el hecho de que un gen de la mosca *Drosophila* sea homólogo del *PAX6* y que su mutación altere también el ojo compuesto de la mosca, ha llevado a sugerir que el gen *PAX6* ha aparecido en la evolución como un gen que dirige la formación de estructuras sensoriales en la región neural anterior.[18]

La expresión del gen *PAX6* no está restringida a los tejidos del ojo, sino que también se expresa en el tejido nervioso, en el desarrollo embrionario.[20] Por esta razón frecuentemente los pacientes con aniridia también muestran defectos neurológicos y cognitivos.[20]

Genética del desarrollo de los miembros

Dado que los miembros no son esenciales para la supervivencia del embrión y que poseen un plan de desarrollo similar en todos los mamíferos y las aves, sus mecanismos genéticos han sido más fáciles de estudiar desde el punto de vista experimental. Estos mecanismos genéticos muestran, en un primer nivel, el papel de genes de *segmentación* (homólogos a los de *Drosophila*); en un segundo nivel, el papel de genes *homeóticos* (también homólogos a los de la mos-

ca) y, finalmente, el papel de genes cuyo producto es una proteína segregada o una proteína citoplasmática. Es decir que el desarrollo de los miembros constituye un modelo en pequeño del desarrollo de un sector del organismo, secundario al desarrollo del plan básico del organismo completo. Estos sectores son semiautónomos y se denominan en general *campos secundarios*. En estos campos, ocurren varios procesos sucesivos: primero ocurre la *definición del territorio*, es decir que queda establecido cuáles células van a componer el esbozo del miembro; luego se establecen centros de emisión de *moléculas-señal*, es decir se forman grupos definidos de células que tienen a su cargo la secreción de moléculas específicas, las cuales inducirán una respuesta determinada en otras células; luego se efectúa un registro o marcado del destino especial que ciertos grupos celulares tendrán, por sufrir procesos especiales; y finalmente se produce la *diferenciación* celular definitiva en un tipo de tejido. Además de su interés teórico, el modelo de desarrollo de los miembros tiene un interés práctico por la frecuencia con la que ocurren malformaciones de los miembros de origen genético, en especial las *sindactilias* (fusiones de dedos), las *polidactilias* (presencia de dedos supernumerarios) y las manos hendidas o en pinza de cangrejo (*ectrodactilias*).

Los miembros aparecen como esbozos o yemas en el embrión humano de la quinta semana y, desde un punto de vista funcional, se considera que en estos esbozos hay tres ejes de desarrollo: el *proximal-distal* (P-D, de la raíz del miembro a su extremidad), el *anteroposterior* o *cefalocaudal* (A-P, del pulgar hacia el meñique) y el *dorsoventral* (D-V, del dorso de la mano hacia la palma). Cada eje está determinado por un proceso génico específico: en el proximal-distal interviene un *factor de crecimiento fibroblástico* (*FCF=FGF* en inglés), que puede ser uno entre varios (*FCF-10; FCF-4; FCF-8*). En el eje anteroposterior, intervienen el producto del importante gen erizo sónico (*SHH, sonic hedgehog*), y en el eje dorsoventral interviene el producto del gen *Wnt7a* y otros genes.[21-24]

Los esbozos más primitivos de los miembros consisten en ligeras protuberancias laterales del embrión, formadas por mesodermo y recubiertas por ectodermo (fig. 16-10).

Además de los tres ejes ya citados, en estos esbozos de miembro se distinguen tres zonas especiales, con un potencial de desarrollo particular: 1) *el repliegue ectodérmico apical* (REA=AER en inglés); 2) *la zona mesenquimática de progreso*, subyacente en el repliegue (ZMP o MPZ) y 3) la *zona de actividad polarizante* (ZAP o ZPA) del mesodermo, que se describen de inmediato (véase fig. 16-10). El mesodermo de los esbozos proviene de dos lugares de origen: el mesodermo somítico proviene de las somitas y es el que forma los elementos esqueléticos, es decir, cartílagos, huesos; por otro lado, el mesodermo lateral forma los músculos, nervios y vasos.

El ectodermo, a su vez, puede clasificarse en ectodermo *dorsal*, que se continúa con el que recubre las somitas, y el ectodermo *ventral*, que recubre el frente del embrión. Estos dos ectodermos se encuentran en un borde del esbozo del miembro, que es donde se forma el repliegue (o cresta) ectodérmica apical, y que consiste en un espesamiento del epitelio ectodérmico, con forma de cresta (véase fig. 16-10) y que es uno de los "centros de señalización" fundamentales de cada miembro, porque define el eje proximal-distal. El REA está formado por un epitelio seudoestratificado, debajo del cual está una zona especial de mesénquima, la zona de progreso, así llamada porque en ella se produce el crecimiento del esbozo en el sentido proximal-distal. Ambas regiones (REA y ZMP) se influyen mutuamente, ya que el REA mantiene a las células de la ZMP en estado indiferenciado, y esta zona induce la formación del REA. El REA puede ser sustituido por la implantación de un tipo de proteínas: los factores de crecimiento fibroblástico (FCF), de los cuales son conocidos al menos 17. Varios de los FCF (principalmente el FCF-4 y el FCF-8) pueden rescatar el desarrollo axial de un miembro luego de ser extirpado el REA. El blanco de la acción del FCF está en la zona subyacente (ZMP), donde se encuentran receptores específicos para los FCF, especialmente el receptor

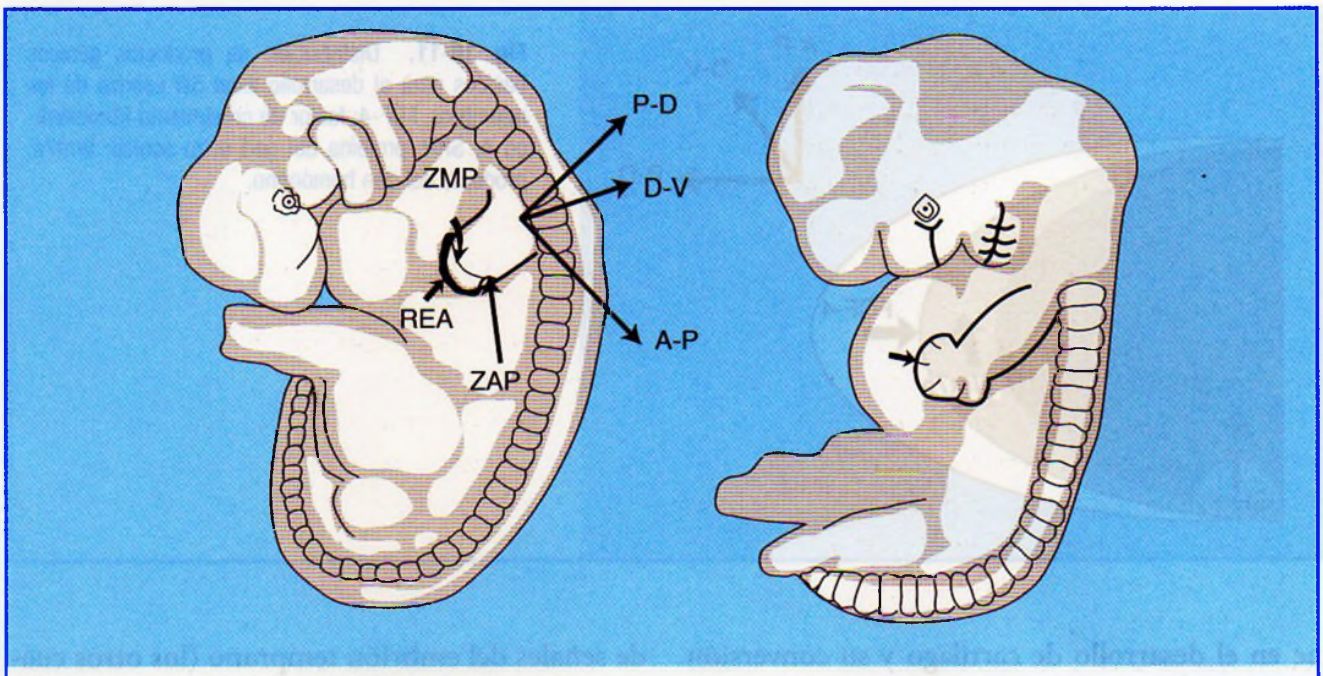


Fig. 16-10. Esbozo o yema de un miembro en el embrión de quinta semana del desarrollo, con las regiones especializadas: REA, repliegue ectodérmico apical; ZMP, zona mesenquimática de progreso; ZAP, zona de actividad polarizante. Los tres ejes están señalados. A la derecha, a la sexta semana, con los surcos radiales interdigitales.

R1FCF. Los receptores de los FCF son cuatro (R1FCF-R4FCF); son proteínas integrales de la membrana citoplasmática con actividad de quinasas de tirosinas, es decir, son transductores de señales. Los receptores implicados en el desarrollo de los miembros son los dos primeros (R1FCF y R2FCF) y su localización es diferente: el primero se encuentra en el mesénquima, mientras que el segundo se encuentra sobre todo en el epitelio y en menor proporción en el mesénquima. Esta disposición es apta para formar circuitos de retroalimentación entre el REA y la ZMP.

El REA se origina en el borde entre los ectodermos dorsal y ventral, y esta ubicación está determinada genéticamente. El ectodermo dorsal tiene activado el gen "franja radical" (*RFNG*), mientras que el ectodermo ventral tiene activado el gen "dentellado" *EN-1* (*engrailed*). El producto de este último es un factor de transcripción que parece inhibir la posible activación de genes dorsales de proteínas segregadas, como el producto de "franja radical" El REA es el sitio donde ambos epitelios se enfrentan, de modo que su aparición depende de la acción previa de los genes dorsales (*RFNG*) y ventrales (*EN-1*).

La zona de actividad polarizante y el gen "erizo sónico" *SHH*

En el extremo del esbozo y en la región más posterior (caudal) hay una región de mesénquima muy importante: la zona de actividad polarizante (ZAP), que da las señales de "posterioridad" a las células del esbozo; una ZAP trasplantada hacia adelante provoca duplicaciones de los dedos posteriores (cubitales: anular y meñique) en la región anterior. Las acciones de esta ZAP pueden ser duplicadas por el ARN de un gen llamado "erizo sónico" (*SHH*), gen que está activo en la ZAP y cuya activación depende de la proteína FCF sintetizada en el REA; a su vez, el producto del *SHH* activa al gen de FCF, lo cual determina un lazo de retroalimentación que mantiene el crecimiento y desarrollo en los dos ejes P-D y A-P (figs. 16-11 y 16-12).

El gen "erizo sónico" (*Sonic hedgehog*, *SHH*, nombre de fantasía creado por el investigador estadounidense C. J. Tabin) es un gen importante que pertenece a la familia "erizo" que consta de tres genes principales, el erizo sónico *SHH* (que interviene en el desarrollo de muchos tejidos y órganos; el erizo índico *IHH*, que intervie-

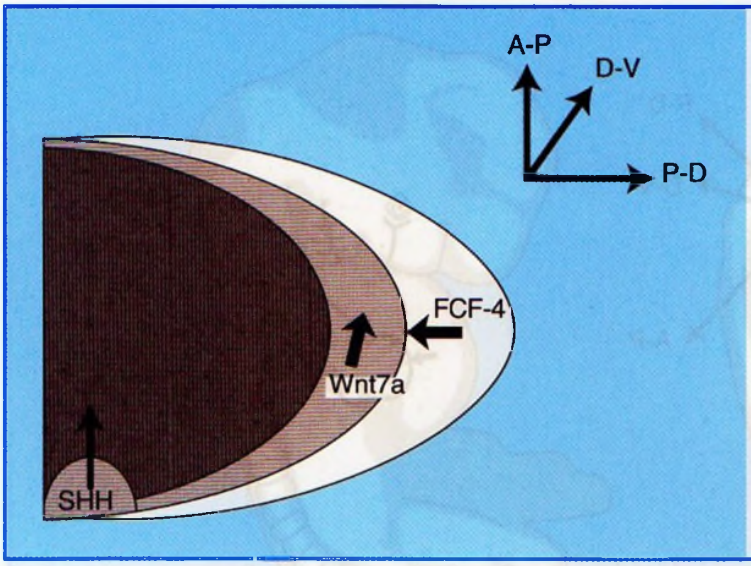


Fig. 16-11. Distribución de productos génicos básicos para el desarrollo axial del esbozo de los miembros. FCF-4: factor de crecimiento fibroblástico 4; SHH: proteína del gen erizo sónico; Wnt7a: producto del gen homónimo.

ne en el desarrollo de cartílago y su conversión en tejido óseo, y el erizo del desierto *DHH*, activo en tejido gonadal (células de Sertoli) y nervioso. Los genes "erizo" actúan como transductores de señales, es decir, en la transmisión y conversión de señales; y en especial, el camino de transducción de señales del erizo sónico *SHH* es uno de los cinco caminos principales de transducción de señales del embrión temprano (los otros cuatro corresponden a los productos de los genes *Wnt, TGF-β, Notch y RTK*). El gen humano *SHH*, situado en el cromosoma 7q36, posee tres exones y codifica una proteína (SHH) segregada, de 462 aa, que primero es cortada a nivel de su péptido señal, que es escindido y luego sufre un proceso autocatalítico de corte en dos piezas: la activa en

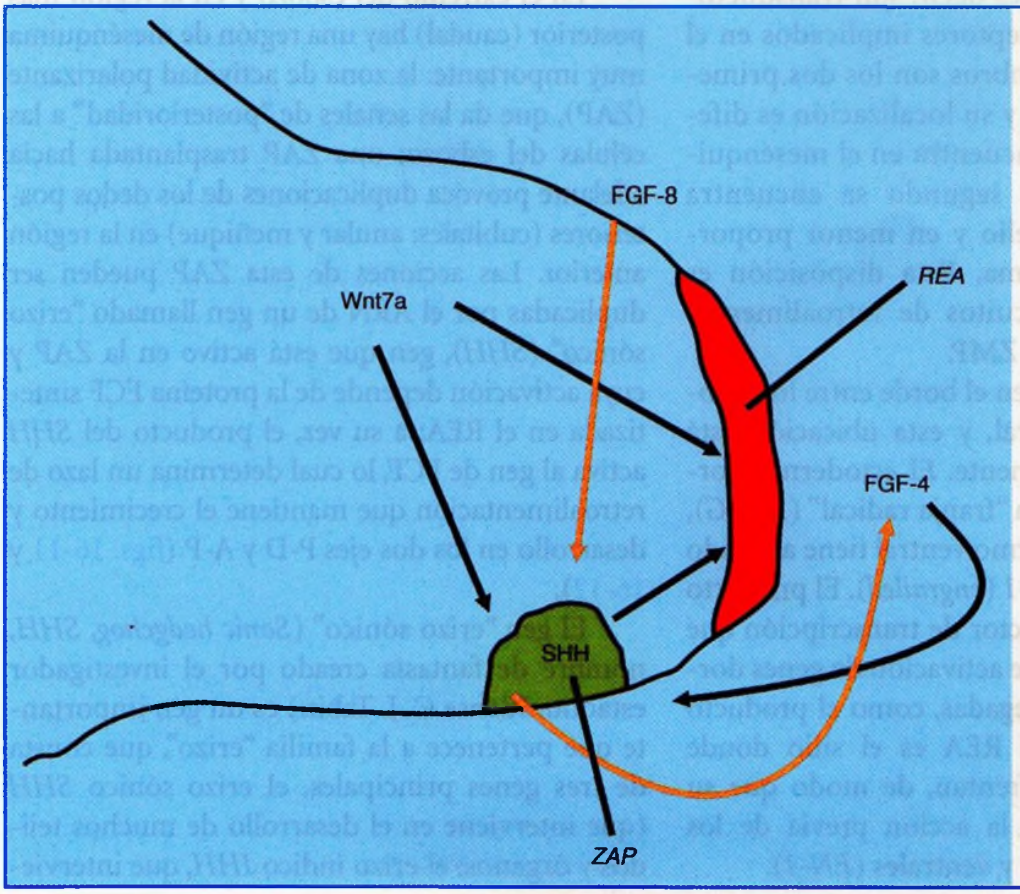


Fig. 16-12. Ciclos de realimentación de los productos génicos en el esbozo del miembro. Las flechas naranja señalan eventos inductores precoces; las negras muestran funciones de mantenimiento.

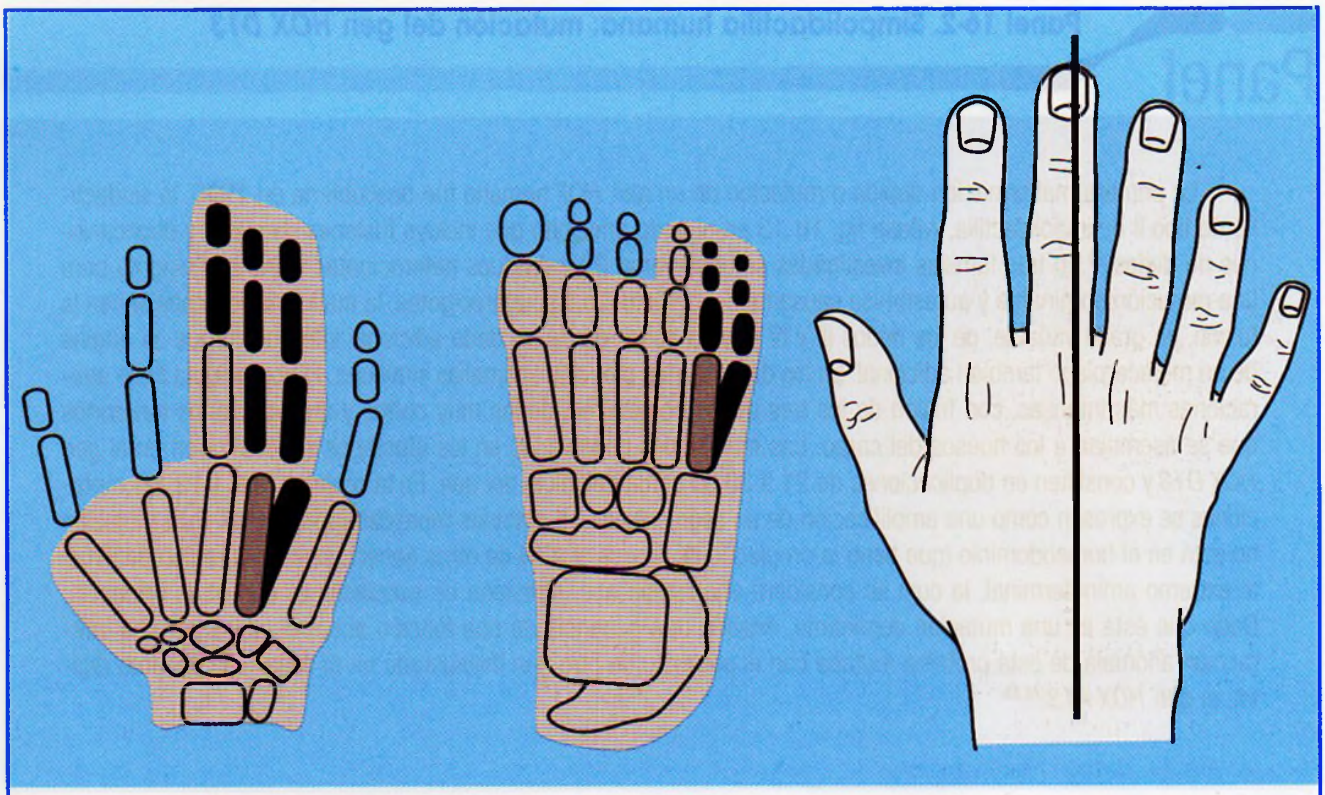


Fig. 16-13. Simpolidactilia. Mano afectada con polidactilia del dedo IV y fusión parcial de partes blandas de los III, IV y IV' y los metacarpianos IV-IV' Polidactilia del quinto dedo del pie con fusión parcial de los metatarsianos V y V'. A la derecha: esquema de polidactilia posaxial (el eje de la mano corresponde al dedo medio) (de Malik S, Grzeschik KH, 2008).

la señalización (20 kDa), que lleva el extremo aminoterminal y que se une a colesterol por su propio extremo carboxilo, y la inactiva, que lleva el extremo originario carboxilo (25 kDa), que lleva la actividad de clivaje y la de transferasa del colesterol, es decir que ayuda a la formación de la pieza activa.[26, 27]

La proteína activa (N-SHH) unida a colesterol, actúa como morfógeno tanto de contacto como difusible; se ha calculado que la acción del producto SHH alcanza por lo menos a 10 diámetros celulares o 100 micrometros.

El receptor de la proteína erizo sónico SHH es la proteína de membrana "parcheado" (*Patched*, gen *PTCH*). Esta proteína parcheado posee 12 segmentos intramembranosos, varios segmentos extracelulares (que se unen al ligando SHH) y segmentos intracelulares que en estado inactivo se unen a otra proteína de membrana, producto del gen *SMOH* (*smoothened*). Cuando la proteína erizo SHH se une como ligando a PTCH en una célula "blanco" de su acción, se libera la actividad de SMOH, la cual permite que las proteínas citoplasmáticas del grupo llamado GLI (de "glioma": tumor del sistema nervioso) puedan ingresar en el núcleo y funcionar como factores de transcripción.

Las proteínas codificadas por los genes *GLI1-GLI3* son factores de transcripción que poseen cinco dominios seguidos del tipo "dedos de zinc" es decir que pueden asociarse al ADN. Las acciones de las proteínas codificadas por los genes *GLI* son variadas y sus mutaciones producen diversos tumores; en el caso de la proteína Gli-3, pueden producir polidactilia posaxial (del lado cubital, fig. 16-13) o preaxial (del lado del pulgar) y malformación craneana (síndrome de Greig). En general, la acción de las proteínas Gli antagoniza la de las proteínas morfogenéticas de hueso (*BMP*).

El camino de señalización iniciado por la proteína SHH se conoce como: SHH-PTCH-GLI. En los esbozos de miembros, este camino es

Panel 16-2. Simpolidactilia humana: mutación del gen *HOX D13*

La primera malformación debida a mutación de un gen *HOX* humano fue descubierta en 1996: la sindactilia de tipo II o simpolidactilia, (véase fig. 16-13 en el texto principal) que incluye fusiones parciales y duplicaciones de dedos.[19] En tres familias investigadas se observaron 29 individuos heterocigotas y uno homocigota para una mutación dominante y autosómica causante del defecto: en los heterocigotas, la malformación consiste en la fusión, en grado variable, de los dedos III y IV y en la aparición de un dedo adicional interpuesto que se origina de un metacarpiano también adicional. En los dedos de los pies hay anomalías similares. El homocigota tiene alteraciones más intensas, con fusión de los tres dedos posteriores, dedos muy cortos y metacarpianos tan cortos que se asemejan a los huesos del carpo. Las mutaciones observadas en los afectados se localizaron en el gen *HOX D13* y consisten en duplicaciones de 21 a 30 pb cerca del inicio del gen. En la proteína HOX D13, las mutaciones se expresan como una amplificación de un segmento de 15 alaninas repetidas (polialanina). Esta mutación no está en el homeodominio (que tiene la propiedad de ligarse al ADN de otros genes), sino en la región proximal al extremo aminoterminal, la cual se considera una región que interviene en asociaciones con otras proteínas. Dado que ésta es una mutación dominante, existiría una ganancia de una función anormal, quizá por una interacción anómala de esta proteína mutada con el producto de otro gen involucrado en el desarrollo del arco digital, el gen *HOX A13*.[24,25]

propio de la zona de actividad polarizante (ZAP) que determina la dirección de "posterioridad" en el miembro, es decir, hacia el anular y el meñique, en el miembro superior. Existe a su vez un lazo de retroalimentación, porque la activación del gen *SHH* depende del factor de crecimiento fibroblástico (FCF) del repliegue REA, y a su vez el producto de SHH estimula al gen del FCF-4, de manera que los inductores de los ejes proximal-distal y anteroposterior están asociados para mantener el desarrollo en ambos ejes.

El gen *SHH* no es solamente importante en los miembros, sino que desempeña un papel fundamental en la placa del piso del tubo neural, en otras regiones del neuroeje y en muchos otros órganos. Algunas de las mutaciones del gen *SHH* producen *holoprosencefalia*, una anomalía mayor del embrión, en la cual existen grados diversos de falta de la división de los derivados del prosencéfalo, con producción de ciclopía (ojo único y central), un apéndice cefálico saliente (proboscis) y otras malformaciones.

En el tercer eje, el dorsoventral (además de los ya citados genes *EN-1* y *RFNG* activos en el ectodermo), el papel fundamental es desempeñado por el gen *Wnt7a*, correspondiente a la familia de genes *Wnt*, presente en invertebrados y vertebrados, los cuales codifican glucoproteínas segregadas, que son mediadoras de señales intercelulares y que desempeñan funciones en el desarrollo nervioso, en la génesis de tumores, en la segmentación y diferenciación axial. El nombre de la familia génica *Wnt* proviene de la fusión abreviada de "wing" (ala, por la mutación wg de *Drosophila* que cambia un ala en una muesca) y de "int" (por sitio de *integración* de un virus de tumor mamario del ratón).

La proteína Wnt7a activa al gen *SHH*, de tal manera que los tres genes básicos interactúan en el desarrollo de un miembro. El gen *FCF-4* parece ser "interruptor" porque basta para desatar el crecimiento de un miembro; su proteína colocada hacia el lado anterior induce un tipo de miembro diferente que cuando se la coloca más posteriormente, por lo cual se evidencia que el plan de desarrollo se debe completar con la función de otros genes, tales como el gen *PTX1* y el gen *TBX5*. En el eje anteroposterior y en un tiempo más avanzado se activan en el mesodermo, en forma diferencial, los genes *HOX* del grupo d, del *HOX D9* al *HOX D13* (panel 16-2).

Genes, cilias, cuerpos basales, centríolos y centrosomas

En la primera década del siglo XXI se fue gradualmente tomando conciencia de que las cilias son algo más que apéndices dedicados al movimiento. En realidad, el hecho de que prácticamente en todos los tipos celulares pueden encontrarse cilias, ya sea las clásicas y móviles, o las primitivas (una por célula y sin doblete de microtúbulos centrales) estaba desde ya sugiriendo que las cilias y sus estructuras subyacentes tenían funciones mucho más diversas y básicas que las supuestas originalmente. Por otra parte, en casi todos los organismos eucariontes, con la excepción de plantas superiores y hongos, se encuentran células ciliadas, de tal modo que estas estructuras y sus funciones son altamente conservadas en la evolución biológica. En la especie humana, varios tipos de las células sensoriales son derivados de células ciliadas: los fotorreceptores de la retina poseen un segmento externo que se continúa con una cilia modificada en el segmento intermedio, y los receptores odoríficos de la mucosa nasal son neuronas con cilias modificadas. Por otra parte, las cilias mótiles ejercen actividades desde estadios tempranos del embrión, como se vio en un párrafo precedente, con consecuencias importantes para la asimetría en el eje izquierda-derecha. Actualmente se considera que las cilias y su aparato adyacente, además de su función de motilidad, son importantes sensores de los cambios que ocurren en el medio intercelular, es decir que son como "antenas" de la célula. De esa manera tienen funciones sensoriales y de transducción de señales que, partiendo del medio intercelular, producen efectos sobre la propia célula, entre otros, un factor de regulación del ciclo celular.[28] Las cilias pueden recoger y transducir señales de diversos tipos, tales como concentración de hormonas y factores de crecimiento, grado de osmolaridad, intensidad del flujo de líquido, impulsos luminosos y estímulos odoríficos.[28] De tal manera, las disfunciones de las cilias y sus estructuras adyacentes se reflejan en enfermedades tan disímiles como la poliquistosois renal dominante, ciertos tipos de hidrocefalia, el *situs inversus*, la degeneración de los fotorreceptores retinianos (en especial la retinitis pigmentaria) y ciertas polidactilias. Por otra parte, las cilias y sus anexos intervienen en dos importantes sistemas de señalización intercelular en el embrión: el sistema de señales del producto (morfógeno) del gen erizo sónico (*SSH*) y el sistema de señales WNT. Las proteínas ciliares (más de 58)[28,29] a su vez dependen de sus genes codificadores y de la activación de estos genes por genes reguladores, como el *RXF3*.[29]

El transporte intraflagelar en las cilias (fig. 16-14)

La cilia forma un subcompartimento celular debido a la presencia de las fibras de transición que se extienden entre el cuerpo basal y la membrana citoplasmática. En este compartimento hay una elevada relación entre la superficie de membrana citoplasmática y el contenido de la cilia, lo cual favorece sus funciones sensoriales. Al mismo tiempo, la cilia precisa proteínas y sustancias del citoplasma general, por lo cual existe un flujo anterógrado hacia el ápice de la cilia, que depende de las proteínas quinesina 3a y quinesina 3b (genes *KIF3A* del cromosoma 5q31y *KIF3B* del cromosoma 20q11.21), más una subunidad no motriz llamada KAP, y un flujo retrógrado, hacia la base, que depende de la dineína 1B citoplasmática (gen *DYNC2H1*, del cromosoma 11q21)[29] (véase fig. 16-14) que a su vez está constituida por las cadenas pesada, intermedia y liviana.

Aparte del transporte intraflagelar, la cilia depende, para su motilidad, de las dineínas del axonema (que forman parte de los "brazos" que emergen de los microtúbulos A en cada doblete periférico). Las dineínas forman una familia con numerosos componentes, de los cuales la DNAH5, la DNAH11 y la DNAI1 son componentes de esos "brazos".[29]

Funciones sensoriales de las cilias

Con respecto a las funciones de sensor y transductor de señales, se ha comprobado que en

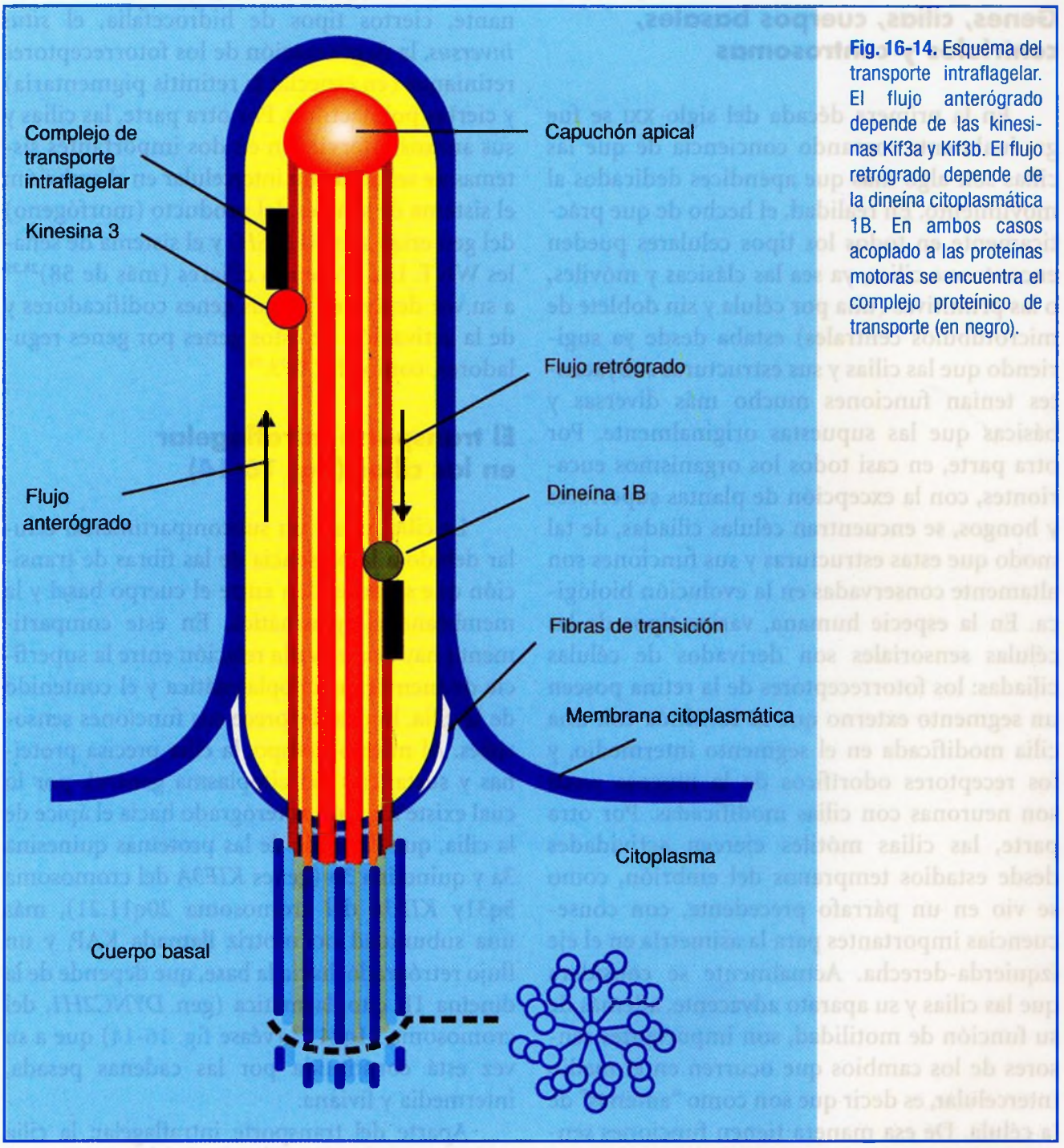


Fig. 16-14. Esquema del transporte intraflagelar. El flujo anterógrado depende de las kinesinas Kif3a y Kif3b. El flujo retrógrado depende de la dineína citoplasmática 1B. En ambos casos acoplado a las proteínas motoras se encuentra el complejo proteínico de transporte (en negro).

la membrana ciliar se encuentran alojadas un número de proteínas integrales involucradas en diversos mecanismos de transducción. También los cuerpos basales contienen proteínas involucradas en estos procesos, por lo cual se deben analizar conjuntamente (fig.16-15).

Varias de estas proteínas son defectuosas por mutación de sus genes codificantes en un número de enfermedades rotuladas como "ciliopatías"

Síndrome de Kartagener o disquinesia primaria de las cilias

La primera de las ciliopatías fue descubierta en la segunda mitad del siglo XX sobre la base de observaciones de cilias móviles con microscopia electrónica. El axonema de estas cilias carecía de los "brazos" de dineína o éstos eran anormales. Los pacientes con síndrome de Kartagener o dis-

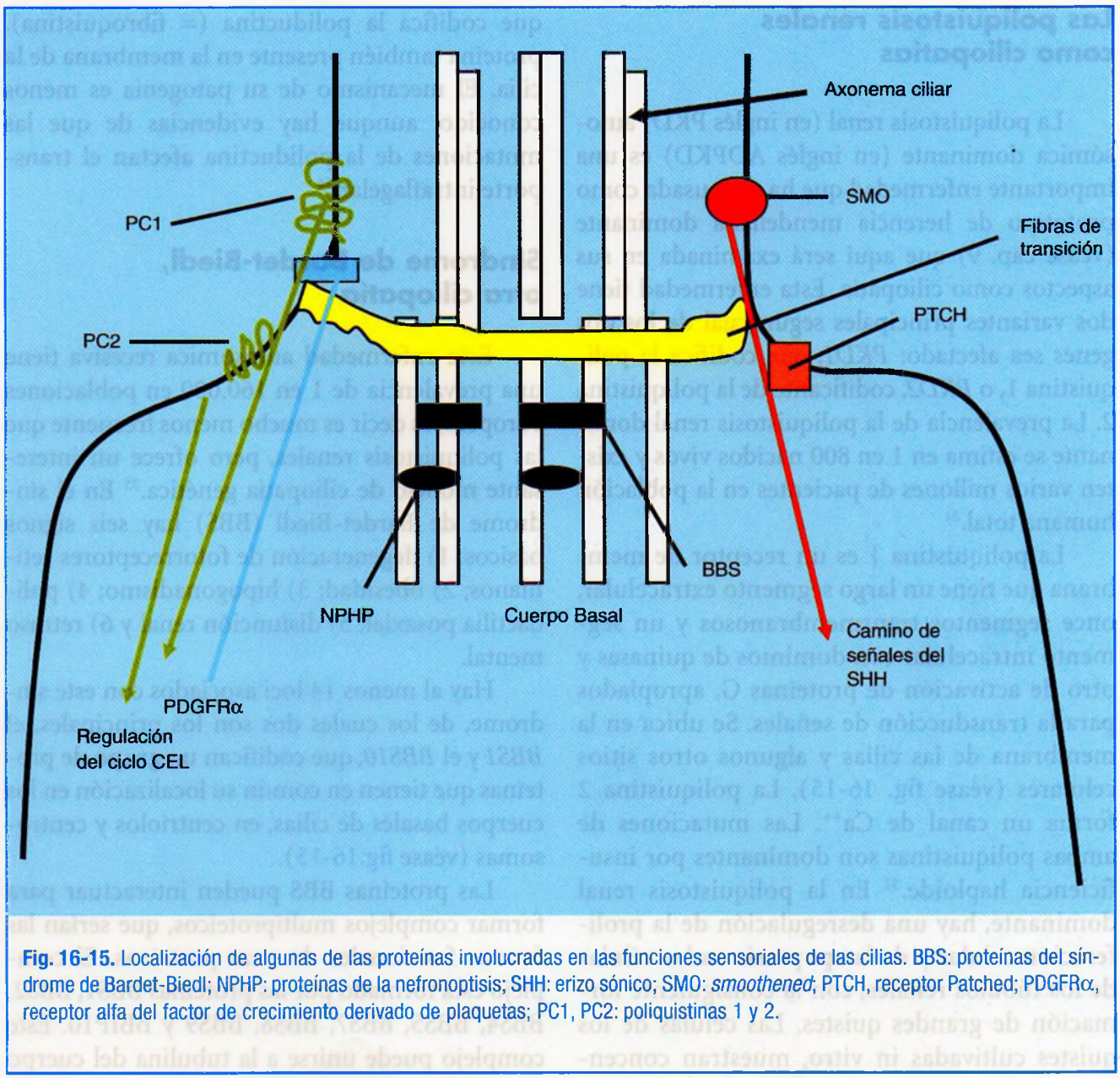


Fig. 16-15. Localización de algunas de las proteínas involucradas en las funciones sensoriales de las cilias. BBS: proteínas del síndrome de Bardet-Biedl; NPHP: proteínas de la nefronoptisis; SHH: erizo sónico; SMO: *smoothened*; PTCH, receptor Patched; PDGFRα, receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas; PC1, PC2: poliquistinas 1 y 2.

quinesia ciliar primaria tienen cilias inmóviles, que dan por resultado muchos de los síntomas respiratorios, del oído, infertilidad masculina (espermatozoides inmóviles) y además un llamativo *situs inversus*, es decir, una anomalía en la lateralidad de los órganos internos, corazón, bazo y otros.[30]

La inmovilidad ciliar impide la movilización del mucus en el aparato respiratorio y de esa manera lleva a infecciones crónicas pulmonares, bronquiectasias, sinusitis y finalmente a insuficiencia respiratoria. La prevalencia de esta ciliopatía se estima en 1 cada 30.000 individuos y se hereda como autosómica recesiva aunque hay heterogeneidad genética (varios diferentes loci asociados). Los principales genes afectados son el de la dineína intersticial *DNAI1* (del cromosoma 9p13-21) y la dineína h5 (cadena pesada, gen *DNAH5* del cromosoma 5p15). La mayoría de las mutaciones halladas corresponden a estos genes, pero como existen otros genes de dineínas, el análisis mutacional es complicado. El diagnóstico se hace por videomicroscopia de muestras de epitelio vivo y también por microscopia electrónica. El *situs inversus* se explica porque también las cilias primitivas del nodo de Hensen del embrión son inmóviles (véase párrafo anterior).

Las poliquistosis renales como ciliopatías

La poliquistosis renal (en inglés PKD) autosómica dominante (en inglés ADPKD) es una importante enfermedad que ha sido usada como prototipo de herencia mendeliana dominante (véase cap. 9) que aquí será examinada en sus aspectos como ciliopatía. Esta enfermedad tiene dos variantes principales según cuál de los dos genes sea afectado: *PKD1*, que codifica la poliquistina 1, o *PKD2*, codificante de la poliquistina 2. La prevalencia de la poliquistosis renal dominante se estima en 1 en 800 nacidos vivos y existen varios millones de pacientes en la población humana total.[31]

La poliquistina 1 es un receptor de membrana que tiene un largo segmento extracelular, once segmentos transmembranosos y un segmento intracelular con dominios de quinasas y otro de activación de proteínas G, apropiados para la transducción de señales. Se ubica en la membrana de las cilias y algunos otros sitios celulares (véase fig. 16-15). La poliquistina 2 forma un canal de Ca^{++}. Las mutaciones de ambas poliquistinas son dominantes por insuficiencia haploide.[32] En la poliquistosis renal dominante, hay una desregulación de la proliferación celular y de la apoptosis en las células de los túbulos renales, con la consiguiente formación de grandes quistes. Las células de los quistes cultivadas in vitro, muestran concentraciones intracelulares de Ca^{++} reducidas con respecto a las normales, por lo cual se propuso que la poliquistina 1 es un mecanosensor que detecta cambios de flujo líquido y que regula el canal de Ca^{++} de la poliquistina 2, reduciendo su concentración y afectando numerosos procesos (fig. 16-16).[33]

Las poliquistinas 1 y 2 también actuarían por un mecanismo directo o indirecto (a través de la variación de concentración de Ca^{++} sobre las uniones intercelulares, es decir, la *zonula adherens*.[31]

La forma autosómica recesiva de la poliquistosis renal también es una ciliopatía (a pesar de su origen diferente). En esta especial poliquistosis (ARPKD), el gen alterado es el *PKHD1*, que codifica la poliductina (= fibroquistina), proteína también presente en la membrana de la cilia. El mecanismo de su patogenia es menos conocido, aunque hay evidencias de que las mutaciones de la poliductina afectan el transporte intraflagelar.[34]

Síndrome de Bardet-Biedl, otra ciliopatía

Esta enfermedad autosómica recesiva tiene una prevalencia de 1 en 160.000 en poblaciones europeas, es decir es mucho menos frecuente que las poliquistosis renales, pero ofrece un interesante modelo de ciliopatía genética.[35] En el síndrome de Bardet-Biedl (BBS) hay seis signos básicos: 1) degeneración de fotorreceptores retinianos; 2) obesidad; 3) hipogonadismo; 4) polidactilia posaxial; 5) disfunción renal y 6) retraso mental.

Hay al menos 14 loci asociados con este síndrome, de los cuales dos son los principales, el *BBS1* y el *BBS10*, que codifican un grupo de proteínas que tienen en común su localización en los cuerpos basales de cilias, en centríolos y centrosomas (véase fig.16-15).

Las proteínas BBS pueden interactuar para formar complejos multiproteicos, que serían las formas funcionales de estas proteínas. El complejo está formado por las proteínas BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 y BBIP10. Este complejo puede unirse a la tubulina del cuerpo basal, a la gamma-tubulina del centrosoma o a los microtúbulos del axonema. Aunque los mecanismos no están completamente identificados, las evidencias actuales sugieren que los complejos BBS intervienen en diversos fenómenos de transporte intracelular mediado por microtúbulos.[35] En las cilias propiamente dichas, las proteínas BBS son necesarias para el transporte intraflagelar y para el crecimiento ciliar, de tal modo que las mutaciones de BBS1 y de BBS10 provocan deformidades ciliares y defectos funcionales de éstas.

La degeneración retiniana en este síndrome se explica por un defecto del transporte intraflagelar: el segmento externo de los fotorreceptores degenera, la rodopsina se acumula en el segmen-

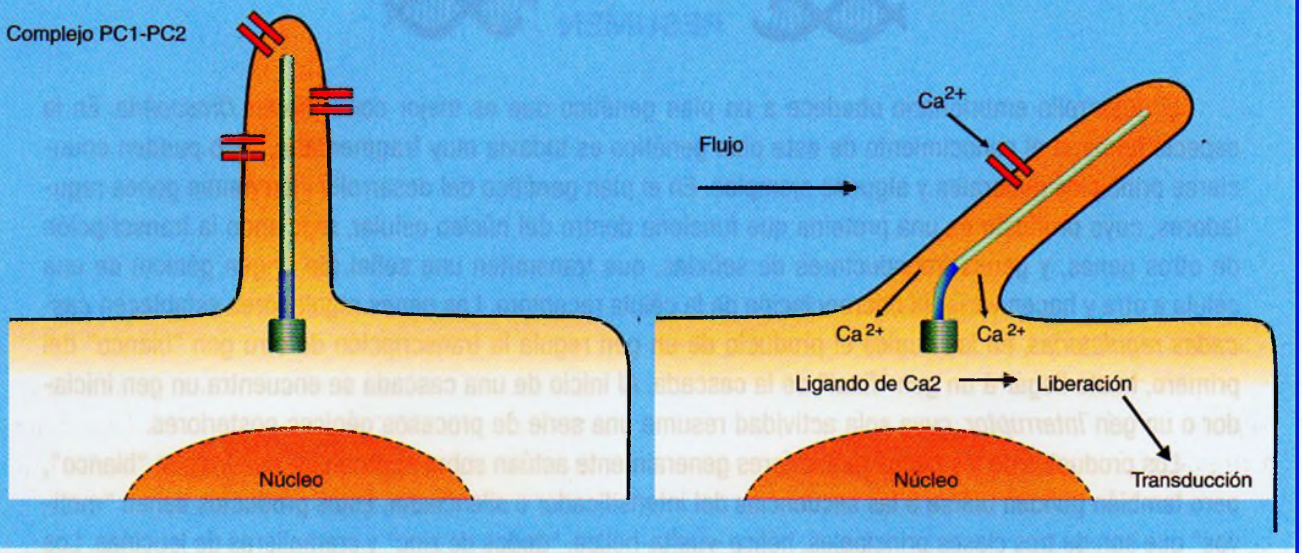


Fig 16-16. Esquema de la hipótesis mecanosensorial de la función de las poliquistinas 1 y 2 en la superficie de la cilia primitiva de las células renales.

to interno y el cilio de conexión entre ambos segmentos es disfuncional, porque hay un déficit del transporte vesicular a su nivel.[35] La obesidad propia de este síndrome plantea interrogantes aún no resueltos; ratones con genes BBS anulados ("noqueo génico") muestran obesidad y altos niveles de la hormona leptina. La polidactilia en estos pacientes parece estar relacionada con una alteración del camino de señales del morfógeno erizo sónico (SHH) que, desde la zona de actividad polarizante (ZAP) del esbozo del miembro en el embrión, es segregado e induce la formación de las estructuras de la mano en el eje anteroposterior (véase sección respectiva). A ese respecto, en las cilias primitivas están presentes los receptores *Smoothened* (SMO) y *Patched* (PTCH) (véase fig. 16-15) propios del camino del morfógeno SHH. La polidactilia en el síndrome BBS es posaxial.

Los defectos renales en el síndrome BBS son de menor magnitud pero similares a los de la poliquistosis renal. Las cilias primitivas de los tubos renales son más cortas y defectuosas en su función, que aparece relacionada con una incrementada tendencia a la proliferación celular en esos tubos. Finalmente, el retraso mental no está bien explicado, aunque la importancia de las cilias primitivas en la neurogénesis y su presencia en las células ependimarias sugieren que el defecto ciliar lleva a una morfogénesis neuronal anormal. Este síndrome continúa siendo un modelo para investigar los defectos de las ciliopatías.

Retinitis pigmentaria y otras ciliopatías

Las retinitis pigmentarias son un conjunto de enfermedades hereditarias que muestran una gran heterogeneidad genética (más de 63 genes pueden originarlas)[36] y constituyen una importante enfermedad que lleva paulatinamente a la ceguera alrededor de la sexta década de la vida. Los fotorreceptores degeneran en mutaciones de uno de los genes, el *RP2*, cuyo producto, una proteína activadora de GTPasa, se localiza en el centríolo adjunto al cilio de conexión del fotorreceptor. La proteína RP2 es importante para el transporte intraflagelar y también para la interrelación entre el aparato de Golgi y el conjunto del centríolo y cilio de conexión.[37] Otras ciliopatías son objeto de investigación, como el síndrome oro-facial-digital, la nefronoptisis, el síndrome de Ellis-Van-Creveld, el síndrome de Joubert y otras que se van agregando.

RESUMEN

El desarrollo embrionario obedece a un plan genético que es mejor conocido en *Drosophila*. En la especie humana el conocimiento de este plan genético es todavía muy fragmentario, pero pueden enunciarse principios generales y algunos ejemplos. En el plan genético del desarrollo intervienen genes reguladores, cuyo producto es una proteína que funciona dentro del núcleo celular, regulando la transcripción de otros genes, y genes transductores de señales, que transmiten una señal (de origen génico) de una célula a otra y hacen variar la diferenciación de la célula receptora. Los genes reguladores establecen *cascadas regulatorias*, en las cuales el producto de un gen regula la transcripción de otro gen "blanco" del primero, hasta llegar a un gen "final" de la cascada. Al inicio de una cascada se encuentra un gen iniciador o un gen *interruptor*, cuya sola actividad resume una serie de procesos génicos posteriores.

Los productos de los genes reguladores generalmente actúan sobre el promotor de otro gen "blanco" pero también pueden unirse a las secuencias del intensificador o silenciador. Estos productos tienen "motivos" que son de tres clases principales: hélice-vuelta-hélice, "dedos de zinc" y cremalleras de leucinas. Los genes llamados *HOX* en el hombre, que son homólogos a los *HOM-C* de *Drosophila*, forman cuatro familias génicas, *HOX A-HOX D*, cada una de las cuales posee 13 posibles loci. Estos genes se caracterizan por una secuencia de 180 pb llamada "homeocaja" que codifica un "homeodominio" de 60 aminoácidos. Los genes *HOX* humanos se activan en forma escalonada en las estructuras segmentarias y neurales del embrión temprano. Los genes humanos *PAX* se caracterizan por codificar productos con dos dominios típicos: un dominio "apareado" de 130 aminoácidos y un homeodominio. El gen humano *PAX3* está alterado en el síndrome de Waardenburg (sordera, defectos de pigmentación y óseos), atribuido a la falta de regulación del gen *PAX3* sobre genes "blanco". El gen *PAX6* está mutado en la aniridia congénita y el síndrome WAGR; estos efectos se deben a la insuficiencia haploide de la función del alelo restante para regular genes "blanco" necesarios para la formación de placodas sensoriales en el embrión. El desarrollo de los miembros se establece por la acción de genes específicos que actúan en cada uno de los tres ejes del miembro: en el eje proximal-distal actúa inicialmente el factor de crecimiento fibroblástico FCF-4; en el eje anteroposterior, el producto del gen "erizo sónico" *SHH*, y en el eje dorsoventral, el producto del gen *Wnt7a*, que es una glucoproteína segregada.

El producto del gen *FCF-4* actúa como interruptor, iniciando el proceso de desarrollo. Con posterioridad, los genes *HOX D9 a 13* se activan en la región terminal y sobre territorios solapados en sentido anteroposterior para la determinación de los campos en que se activarán otros genes.

Las ciliopatías han emergido como un grupo de enfermedades relacionadas con mutaciones que afectan no sólo la motilidad ciliar sino sus funciones sensoriales. El síndrome de Kartagener, producido por mutaciones o deleciones de varias dineínas del axonema lleva a la inmovilidad de cilias y espermatozoides, con disfunciones respiratorias, esterilidad masculina y *situs inversus*. La poliquistosis renal autosómica dominante, en sus dos variantes PKD1 y PKD2, es producida por mutaciones de los genes de las poliquistinas 1 y 2, localizadas en la membrana ciliar y que actúan como mecanosensores del flujo líquido, regulando el transporte de ión calcio a la cilia y provocando alteraciones de la señalización intracelular que determinan una desregulación de la proliferación celular en los tubos renales. En otras ciliopatías, como el síndrome de Bardet-Biedl, los genes *BBS* afectados codifican proteínas localizadas a nivel del cuerpo basal y que son esenciales para el transporte intraflagelar. La cualidad de receptor sensorial y transductor de señales reconocida actualmente para las cilias ha permitido explicar un número importante de síndromes genéticos.

REFERENCIAS

1. Lewin B. Genes IX. Jones and Bartlett Publisher: Sudbury, MA; 2008.
2. Carrasco AE, McGinnis W, Gehring WJ, de Robertis EM. Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis that codes for a protein domain homologous to *Drosophila* homeotic genes. Cell 1984; 37:409-411.
3. Mullins MC, Nüsslein-Volhard C. Mutational approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. Current Opin Genetics and Develop 1993; 3:648-654.
4. Gurdon JB. The generation of diversity and pattern in animal development. Cell 1992; 68:185-199.
5. Afzelius BA. Genetic disorders of cilia. In: Schweiger HG (ed), International Cell Biology 1980-1981. Berlin: Springer Verlag; 1981. p. 440-447.
6. Brueckner M, D'Estachio P, Horwich AL. Linkage mapping of a mouse gene iv, that controls left-right asymmetry of the heart and viscera. Proc Nat Acad Sci USA 1989; 86:5035-5038.
7. Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y. Left-right determination: Involvement of molecular motor KIF3, cilia and nodal flow. Coid Spring Harb Perspect Biol 2009; 1: 000802.
8 Shimeld SM. Retinoic acid, HOX genes and the anterior-posterior axis in chordates. BioEssays 1996; 18:613-616.
9. Conlon RA. Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. Trends in Genet 1995; 11:314-319.
10. Acampora D, D'Esposito M, Faiella A, Pannese M, Migliaccio E, Morelli F, et al. The human HOX gene family. Nucleic Acids Res 1989; 17:10385.
11. Krumlauf R. Mouse Hox genetic functions. Current Opin Genet Develop 1993; 3:621-625.
12. Bronner-Fraser M. Segregation of cell lineage in the neural crest. Current Opin Genet Develop 1993; 3:641-647.
13. Duboule D. The rise and fall of Hox gene clusters. Development 2007;134:2549-2560.
14. Noll N. Evolution and role of *Pax* genes. Current Opin Genet Develop 1993; 3:595-605.
15. Lalwani AK, Brister JR, Fex J, Grundfast KM, Ploplis B, San Agustín TB, et al. Further elucidation of the genomic structure of PAX 3, and identification of two different point mutations within the PAX 3 homeobox that cause Waardenburg Syndrome type I in two families. Am J Hum Genet 1995; 56:75-83.
16 Kubic JD, Kacey P, Young RS et al. Pigmentation PAX ways: the role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance and disease, Pigment Cell Mel Res 2008, 21:627-645.
17. Pierpoint JW, Erikson RP. Invited editorial: Facts on PAX. Am J Hum Genet 1993; 52:451-454.
18. Hanson I, Van Heyningen V. Pax 6: more then meets the eye. Trends in Genet 1995; 11:268-272.
19. Lee H, Khan R, O'Keefe M. Aniridia: current pathology amnd management. Acta Ophtalmol 2009;86:708-715.
20. Dansault A, David G, Schwartz C, et al. Three new PAX 6 mutations including one causing an unusual ophthalmic phenotype associated with neurodevelopmental abnormalities. Molec Vision 2007;13:511-523.
21. Roberts DJ, Tabin C. The genetics of human limb development. Am J Hum Genet 1995;55:1-6.
22 Morgan BA, Tabin CJ. The role of homeobox genes in limb development. Current Opin Genet Develop 1993;3:668-674.
23. Tickie C. Vertebrate limb development. Current Opin Genet Develop 1995; 5:478-484.
24. Muragaki Y, Mundlos S, Upton J, Olsen BR. Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. Science 1996; 272:548-551.
25. Rijli FM, Chambon P. Genetic interactions of Hox genes in limb development: learning from compound mutants. Current Opin Genet Dev 1997; 7:481-487.
26. Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic-hedgehog-Patched-Gli pathway in human development and disease. Am J Hum Genet 2000; 67:1047-1054.
27. Briscoe J. Making a grade: Sonic hedgehog signalling and the control of neural cell fate. EMBO J 2009;28 (5):457-465.
28. Marshall WF, Nonaka S. Cilia: tuning in to the cell`s antenna. Curr Biol 2006;16:604-614.
29. Bisgrove BW, Yost HJ. The roles of cilia in developmental disorders and disease. Development 2006;133:4131-4144.
30. Morillas HN, Zariwaia M, Knowles MR. Genetic causes of bronchiectasis: primary ciliary dyskinesia. Respiration 2007;74:252-263.
31. Wilson PD. Polycystic kidney disease. New Eng J Med 2007;350:151-164.
32. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. Lancet 2007;369:1287-1301.
33. Yoder BK. Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol 2007;18: 1381-1388.
34. Menezes LF, Onuchic LF. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal recessive polycystic kidney disease. Braz J Med Biol Res 2006;39:1537-1548.
35. Zaghloul NA, Katzanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. J Clin Invest 2009;119:428-437.

36. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan SL. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. Arch Ophtalmol 2007;125:151-158.
37. Evans RJ, Schwarz N, Nagel-Wolfrum K, et al. The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. Hum Mol Genet 2010 (en prensa).

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Manouvrier-Hanu S, Holder-Espinasse M, Lyonnet S. Genetics of limb anomalies in humans. TIG 1999; 15:409-417.

Tickle C, Munsterberg A. Vertebrate limb development- the early stages in chick and mouse. Curr Opin Genet Dev 2001; 11:476-481.

Xu X, Weinstein M, Li C, Deng C-X. Fibroblast growth factor receptors (FCFRs) and their roles in limb development. Cell Tissue Res 1999; 296:33-43.

Odent S, Attie-Bitach T, Blayau M, et al. Expression of the *sonic hedgehog (SHH)* gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. Hum Mol Genet 1999;8:1683-1689.

Goodman FR, Scambler PJ. Human *HOX* gene mutations. Clin Genet 2001;59:1-11.

Wilkie AOM. Bad bones, absent smell, selfish testes: The pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. Cytokine & Growth Factor Reviews 2005;16:187-203.

Barham G, Clarke NMP. Genetic regulation of embryological limb development with relation to congenital limb deformity in humans. J Chil Orthop 2008;2:1-9.

Biesecker LG. The Greig cephalopolysyndactyly syndrome Orphanet J Rare Dis 2008;24;3:10.

Malik S, Grzeschik K-H. Synpolydactyly: clinical and molecular advances. Clin Genet 2008;73:113–120.

Cardenas-Rodriguez M, Badano JL. Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. Am J Medical Genet Part C (Seminars in Medical Genetics) 2009;151C:263-280.

Baker K, Beales PL. Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. Am J Medical Genet Part C (Seminars in Medical Genetics) 2009;151C:281-295.

Capítulo 17

Cariotipo humano y cromosomopatías

Cariotipo humano. Bandeado cromosómico. Hibridación in situ. Cromosomopatías. Trisomías. Síndromes de Down, de Edwards y de Patau. Síndromes de Turner y de Klinefelter. Condición XYY

INTRODUCCIÓN

El material genético nuclear, descrito en el capítulo 4 desde el punto de vista molecular, constituye los cromosomas visibles con el microscopio de luz común. El análisis de las características de los cromosomas es el objeto de estudio de la Citogenética Humana. Esta disciplina es más reciente que la Genética, ya que sólo en 1956 fue determinado el número de cromosomas humanos (46).[1] En 1959 se describió la primera anormalidad cromosómica humana, la trisomía del cromosoma 21 en el síndrome de Down,[2] y a partir de entonces se constituyó en un campo propio de estudio dentro de la Genética Médica, especialmente mediante el uso de técnicas de bandeado que permiten caracterizar zonas específicas de cada cromosoma. Actualmente, la Citogenética Médica usa metodologías derivadas de la Genética Molecular, especialmente las técnicas de *hibridación in situ y fluorescencia* (HISYF=FISH en inglés), que permiten la localización de secuencias específicas del ADN en una región cromosómica,[3] y de esta manera los estudios microscópicos convergen con los estudios moleculares y se complementan mutuamente.

El estudio de los cromosomas revela información valiosa acerca de la constitución genética de una persona, porque cada cromosoma normal tiene una morfología y un tamaño muy constantes. Cada cromosoma posee una morfología tan típica como las que tienen el eritrocito o un órgano macroscópico, la cual refleja su constitución a partir de una molécula específica de ADN (la cromátida de ese cromosoma). La longitud del cromosoma mayor (el número 1) es cercana a 10 µm, y la del menor (el número 21) es de casi 2 µm. El conjunto de los cromosomas constituye el *cariotipo*. El conocimiento del cariotipo es básico para la Genética Humana y para la evaluación de las enfermedades de causa cromosómica o *cromosomopatías*. Si bien el estudio de estas enfermedades ya está incorporado al currículo médico, investigaciones recientes han contribuido significativamente a completar el análisis de su origen y patogenia.

Las cromosomopatías se observan en un 0,5 a un 1% de los recién nacidos vivos; se encuentran en un 6% de los fallecimientos en la época

perinatal y en un 39 a 54% de los abortos espontáneos.

Métodos de estudio de los cromosomas

Es posible realizar un análisis cromosómico con una variedad de tejidos, pero el de elección es el cultivo de linfocitos de sangre periférica. Este método es rápido, económico y provee un número adecuado de células en división.[4] Se puede usar sangre venosa entera (1 mL o menos) con 0,1 mL de solución de heparina (500 UI), la cual se emplea como anticoagulante; o alternativamente se puede centrifugar (a 115 g) sangre heparinizada y separar la capa de leucocitos. En cualquiera de los casos, esta muestra se siembra en un frasco de cultivo, con un medio esencial mínimo y 10% de suero, o también en un medio de cultivo sintético con suplementos, y se agregan antibióticos para garantizar que no haya contaminación bacteriana. Al cultivo se le incorpora fitohemaglutinina u otro mitógeno, que son glucoproteínas vegetales (lectinas), las cuales se acoplan a proteínas de la membrana de los linfocitos y estimulan su transformación en linfoblastos en las primeras 24 horas del cultivo; luego los propios linfocitos segregan interleuquina 2, que estimula su división. Los cultivos duran sólo 3 días (72 horas) y no requieren otra instalación que una estufa de 37 °C. A su término, se agrega colchicina o su derivado "colcemid", para detener las mitosis en metafase (debido a su acción antimicrotubular), en baja concentración (0,1-0,5 µg/mL) durante una hora, con lo cual la mayoría de las células que entran en mitosis en ese lapso quedan detenidas en metafase y así se logra un número adecuado de ellas. Antes de realizar las preparaciones, se somete a las células a un "choque hipotónico" con ClK 0,075 M, con el objeto de que los cromosomas se separen entre sí para su mejor observación.

Los preparados se realizan utilizando un fijador para la cromatina de las células (etanol 3 partes, ácido acético 1 parte) y luego se gotea la suspensión celular sobre un portaobjetos y se seca al aire. Estos preparados se pueden teñir con colorantes básicos como el colorante de Giemsa, lo cual da una coloración homogénea ("sólida") de los cromosomas, o se pueden usar para cualquiera de los métodos de bandeado y también para el método de HISYF. El objetivo de esta técnica de preparación es obtener el conjunto de todos los cromosomas humanos de la célula bien dispersados para que puedan ser contados y analizados sin superposiciones, conservando su morfología y dispuestos en un solo plano, de modo que en una única microfotografía se obtenga el total del conjunto cromosómico (cariotipo). Obviamente, la calidad de las preparaciones es vital para poder realizar el análisis del cariotipo.

Además de linfocitos, es posible realizar cultivos (más laboriosos) de fibroblastos dérmicos, de células exfoliadas de mucosas, de células del feto presentes en el líquido amniótico y en las vellosidades coriales, y de otros tejidos. Por otra parte, se pueden efectuar preparaciones *directas* (sin cultivo) de células de médula ósea obtenidas por punción; aunque la calidad de estas preparaciones es menor que la de los cultivos, tienen la ventaja de ser analizables el mismo día de la toma de la muestra.

Bandeado cromosómico: significado del patrón fundamental G y Q

Mediante ciertas técnicas de tinción, es posible detectar a lo largo de cada cromosoma bandas alternantes de mayor y menor tinción (o fluorescencia), que forman un patrón estable y característico para cada cromosoma. Este patrón de bandas es de gran utilidad práctica porque permite la identificación precisa de cada cromosoma y, además, permite la caracterización de regiones particulares dentro de cada brazo cromosómico. El patrón de bandas forma la base para la confección del diagrama estandarizado del conjunto de cromosomas humanos (cariotipo). Además, varía según el estado de elongación de los cromosomas: en los cromosomas más acortados, propios de la metafase (y también acortados por mayor tiempo transcurrido en presencia de colchicina), el número total de bandas detectables en todo el cariotipo humano no pasa de 400; cuando se observan células en pro-

metafase, con cromosomas más elongados, el número de bandas visibles puede llegar a sobrepasar las mil (este patrón de bandas se llama "de alta resolución"). Las diferencias entre el primer patrón y el segundo consisten en el desdoblamiento de bandas metafásicas en sub-bandas en la prometafase.

El primer tipo de bandeado fue el llamado "Q" (por la sustancia fluorescente empleada, *quinacrina*), que produce uno de los patrones de bandas más informativos, aunque requiere microscopia de fluorescencia; con posterioridad, se comprobó que el mismo patrón de bandeado podía ser obtenido mediante la extracción selectiva de componentes cromosómicos por la enzima tripsina o por soluciones salinas, y una tinción con el colorante de Giemsa (usado habitualmente en hematología). Este patrón de bandas, llamado G (de *Giemsa*), es el usado como estándar con mayor frecuencia; es idéntico al bandeado Q, excepto en las zonas heterocromáticas de los cromosomas 1, 9 y 16 y en los satélites de los acrocéntricos, que dan una tinción variable.

El bandeado Q y el bandeado G producen bandas que están relacionadas con la composición predominante de bases en el ADN de las regiones bandeadas. Las bandas oscuras del bandeado G y las brillantes (fluorescentes) del bandeado Q representan regiones cuyo ADN es rico en el par A-T (o T-A), de manera que su coloración es proporcional a la concentración de A+T. Esto ha sido corroborado por los resultados obtenidos con sustancias estrictamente específicas por su afinidad por el par de bases A-T, tales como la daunomicina y el "Hoechst 33258" mientras que las sustancias que se unen preferencialmente al par GC, como la cromomicina A3, dan un patrón de bandeado fluorescente inverso al bandeado Q y al G.

Además de poseer riqueza en el par A-T, las bandas oscuras del bandeado G se caracterizan por replicar su ADN en la segunda mitad del período S del ciclo celular (aunque no tan tardíamente como las regiones de heterocromatina constitutiva, tales como los centrómeros); se corresponden además con los "cromómeros" o grumos de cromatina de los cromosomas meióticos, y por último, se considera que contienen relativamente pocos genes respecto de las bandas claras (no coloreadas) y que contienen proteínas diferentes de las que integran las bandas claras. Todas estas particularidades hacen que el patrón de bandeado adquiera una importancia funcional; de esta manera, se ha propuesto que el patrón de bandas G (o Q) responde a un empaquetamiento diferencial de las regiones cromosómicas axiales, ricas en A-T, las cuales están más apretadamente dispuestas en las bandas oscuras que en las bandas claras.[5] Estas regiones axiales son la base de los lazos de cromatina que forman un nivel intermedio de empaquetamiento del ADN en la cromatina (véase cap. 4) y se caracterizan por unirse a proteínas no histónicas del llamado "armazón cromosómico" rico en la enzima topoisomerasa II.[5] En resumen, se puede considerar que las bandas G oscuras (= las Q fluorescentes) representan regiones del ADN cromosómico relativamente pobres en genes (sólo contienen el 20% del total de genes); desde el punto de vista funcional son regiones que tienden a la represión génica, mientras que las bandas G claras contienen la mayoría de los genes de mantenimiento, son funcionalmente activas y se replican tempranamente.

Otros tipos de bandeado: bandeado C, bandeado R y bandas N

El bandeado C (de constitutivo) tiñe exclusivamente la heterocromatina constitutiva, compuesta por ADN de tipo satélite, muy repetido (véase cap. 4). Por consiguiente, difiere completamente del bandeado G y Q, y sólo tiñe las regiones centroméricas y los bloques de heterocromatina C de los cromosomas 1, 9 y 16 y del brazo largo del cromosoma Y. El procedimiento tiene una base diferente del bandeado clásico, ya que se desnaturaliza y extrae el material cromosómico con álcali, y se incuba en solución salina para teñir después con Giemsa u otros colorantes; las bandas C indican los sitios donde hay ADN altamente repetitivo que no se ha extraído, como sucede en el resto del cromosoma. Dado que las regiones de bandas C son altamente polimórficas en la población humana, este bandeado

es indicado para la búsqueda de polimorfismos de heterocromatina.

El bandeado R es simplemente el inverso del bandeado clásico (G o Q); las bandas claras de un tipo de bandeado son oscuras en el otro tipo. Se usa la cromomicina A3 y las bandas fluorescentes son las ricas en C-G.

El bandeado N o de los organizadores nucleolares tiñe con exclusividad las regiones que contienen organizadores nucleolares (constricciones secundarias en los cromosomas 13-15 y 21-22) y también es totalmente ajeno al bandeado clásico, ya que se basa en la presencia de proteínas argentafines en esas regiones; se tiñe con nitrato de plata.

Los diferentes bandeados citados pueden combinarse entre sí, y con ciertas modificaciones, como las del procedimiento de replicación diferencial, pueden revelar las zonas de replicación más temprana o más tardía. De este modo, es posible analizar cada cromosoma humano con considerable detalle. Sin embargo, la técnica de mayor potencialidad para el análisis cromosómico es la hibridación in situ y fluorescencia (HISYF = FISH).

Aplicaciones de la hibridación in situ y fluorescencia

La técnica HISYF o FISH consiste en la identificación de la región cromosómica en la que se encuentra una secuencia determinada de un ácido nucleico, detectada finalmente por una señal fluorescente. Es, por consiguiente, una combinación de una técnica molecular y una técnica de microscopia, que ha reemplazado a la técnica primitiva, en la cual se localizaba la secuencia mediante un isótopo radiactivo y radioautografía (por ello se llaman en general técnicas de hibridación in situ no isotópicas).

Para realizar este procedimiento se pueden utilizar las preparaciones convencionales empleadas para el estudio del cariotipo y descritas previamente, lo cual es sumamente práctico. La base del procedimiento es lograr que la secuencia buscada del ADN celular se hibride (véase cap. 4) con una secuencia preparada in vitro y rotulada con nucleótidos marcados especialmente con *biotina* o con *digoxigenina*, sustancias ambas que reaccionan específicamente con otras (la biotina reacciona con avidina y la digoxigenina con su anticuerpo, antidigoxigenina) que pueden ser acopladas a una sustancia fluorescente (fluoresceína, rodamina y otras). Es decir, se logra la hibridación molecular de la secuencia del ADN con la de la *sonda* (véase cap. 3) marcada que permitirá su detección mediante la señal fluorescente.

La HISYF permite localizar en qué cromosoma y en cuál región está presente una secuencia de ADN, lo cual es de gran utilidad para el mapeo del genoma humano, pues inmediatamente se puede relacionar esa secuencia con todos los genes y secuencias marcadoras ya conocidas en ese cromosoma. Además, la HISYF permite la identificación inmediata y precisa de cada cromosoma, por medio de "sondas" preparadas con secuencias específicas de ese cromosoma. Una de las formas de identificar cada cromosoma humano es mediante sondas centroméricas, específicas para el tipo de secuencias satélite presentes en cada uno. De manera similar, se ha desarrollado el llamado "pintado cromosómico" que se realiza con una mezcla de varias sondas, cada una específica para un cromosoma; cada sonda es detectable por medio de un colorante fluorescente de distinto color, con lo cual se obtiene en la misma preparación, por ejemplo, la localización de dos cromosomas, identificables por su color de fluorescencia, o de distintas regiones del mismo cromosoma, identificadas por colores diferentes (paneles 17-1 y 17-2).

La HISYF no está limitada a cromosomas de células mitóticas y es posible realizarla en células interfásicas; esto permite reconocer, por ejemplo, la presencia de una trisomía (como la del síndrome de Down) por la señal triple que da una sonda para ese cromosoma. Por lo tanto, presenta ventajas obvias de rapidez y economía, al no precisarse cultivos ni un número de células en mitosis.

Otra aplicación importante es su uso en los preparados histológicos de rutina, en especial los obtenidos por biopsia. En estos preparados realizados mediante cortes de parafina, es posible realizar HISYF para detectar, por ejemplo, la pre-

Panel 17-1. Aplicaciones de la hibridación in situ y fluorescencia (HISYF = FISH)

La técnica de HISYF no debe ser confundida con una técnica de coloración: se trata de una técnica de *detección específica de secuencias* de bases del ADN (o ARN). En una reacción de HISYF, hay cuatro tipos posibles de híbridos: a) de las dos cadenas del ADN propio del tejido entre sí, es decir, una renaturalización del ADN del tejido, que no está rotulado y no se visualiza; b) de moléculas de la sonda entre sí (son de tamaño pequeño y se arrastran con los lavados); c) híbridos estables entre sonda y ADN del tejido (son específicos y se detectan), y d) híbridos inestables, inespecíficos, con homología parcial con la sonda (deben eliminarse para no dar señales equivocadas).[7] De ahí se deduce que la HISYF debe practicarse en condiciones cuidadosamente estandarizadas (véase hibridación, cap. 4).

Las aplicaciones de la HISYF son numerosas: se emplea en el diagnóstico clínico rápido de las anomalías cromosómicas, en la toxicología, en el mapeo génico y en muchas otras áreas. La detección de espermatozoides aneuploides con HISYF ha sido mencionada en el capítulo 9. Se ha vuelto usual el empleo del *pintado cromosómico* por medio del cual un cromosoma específico se identifica con un color de fluorescencia determinado. Para ello se emplean sondas especiales para "pintado cromosómico" que se obtienen a partir del uso de cromosomas aislados por citometría de flujo (p. ej., se aísla el cromosoma 1); con el cromosoma aislado y el uso de primeros oligonucleotídicos "degenerados" (POD = DOP en inglés), se amplifican numerosas secuencias de ese cromosoma aislado (incorporando un rotulador como un nucleótido con biotina) en una reacción en cadena de la polimerasa (RCP, véase cap. 3). Esto constituye una *sonda de pintado cromosómico* específica, por ejemplo, para el cromosoma 1, que se provee comercialmente. Diversas sondas de "pintado cromosómico" para diferentes cromosomas pueden ser detectadas por sustancias llamadas *reporteras*, porque detectan específicamente una sonda. Estas reporteras son macromoléculas, como la avidina, que reacciona específicamente con la biotina, o anticuerpos, como la antidigoxigenina, y pueden estar acopladas a diversos fluorocromos. El número de fluorocromos (colorantes fluorescentes) usados es cada vez mayor; aunque por lo general se usan dos o tres, pueden usarse siete o más simultáneamente. Por su parte, mediante filtros especiales (de *paso de banda múltiple*) es posible visualizar varios colores de fluorescencia en el mismo campo microscópico. Estos adelantos permiten realizar cariotipos completos por pintado cromosómico, en una metodología que se ha denominado "rotulación combinatoria por múltiples fluorocromos". Con esta metodología, empleando cinco o más fluorocromos diferentes, es posible identificar los 24 cromosomas (22 autosomas, el X y el Y), cada uno de los cuales posee una "firma" única, dada por su fluorescencia en una o más bandas de longitud de onda. De esta forma, es detectable cualquier tipo de reordenamiento cromosómico.

Panel 17-2. Procedimiento y resultados del "pintado" cromosómico

La técnica de hibridización in situ y fluorescencia es la técnica de mayor potencialidad para el análisis cromosómico, complementando y/o reemplazando cada vez más a las técnicas convencionales de bandeos cromosómicos. Es muy versátil para detectar secuencias determinadas de ADN y ARN en cromosomas, núcleos interfásicos, citoplasma u organelas de diferentes materiales biológicos. Como lo indica su nombre (hibridización in situ y fluorescente), esta técnica permite localizar in situ una secuencia determinada de ácidos nucleicos, detectándola mediante una señal fluorescente.

Para entender la técnica de hibridización in situ es necesario tener conocimientos de biología molecular, genética, inmunoquímica e histoquímica.

Los diferentes pasos para seguir deben ser llevados a cabo en condiciones muy controladas (fig. 1), y en el caso de obtener la sonda comercialmente, es el fabricante quien propone el protocolo óptimo para cada tipo de sonda. Podemos resumir los pasos más importantes:

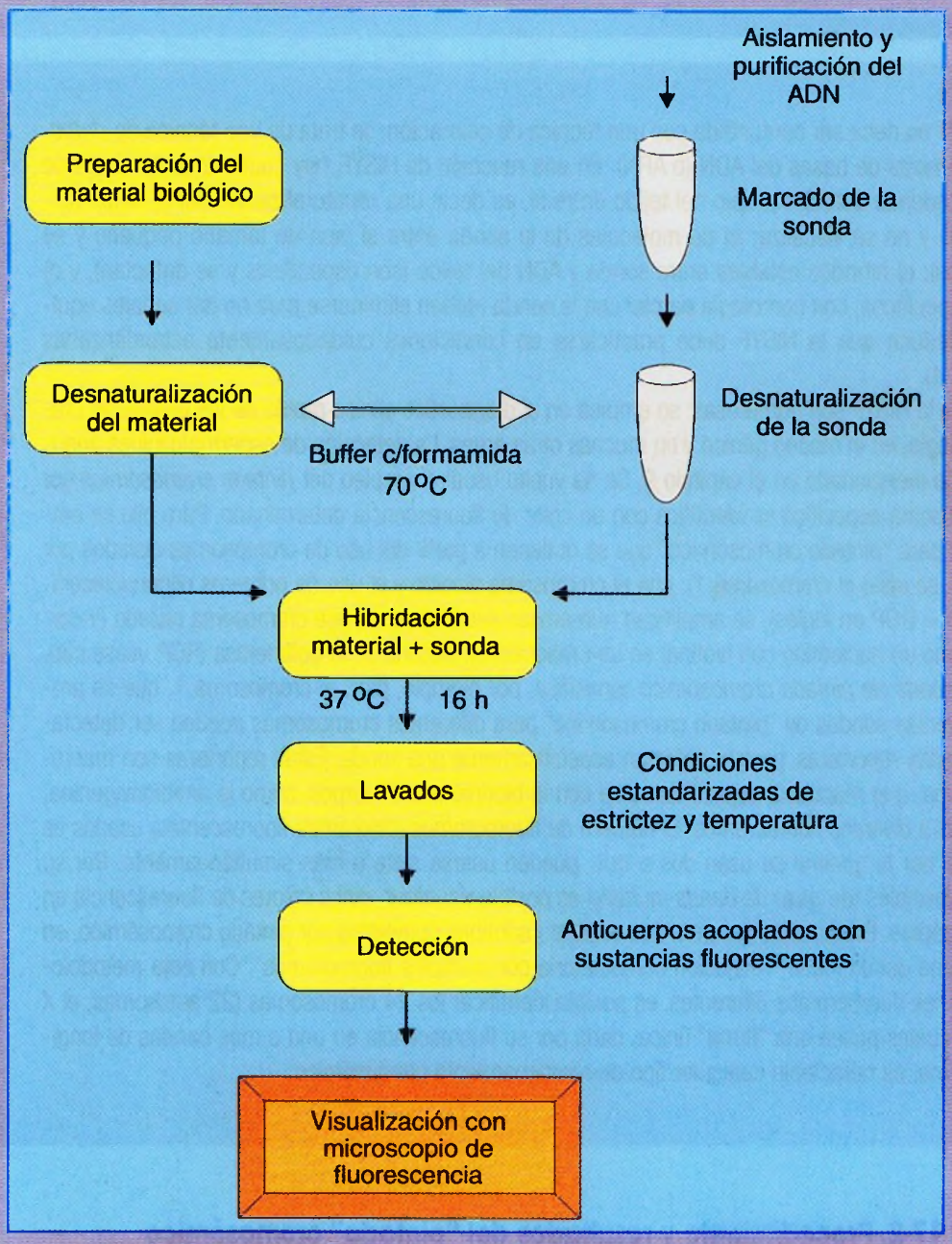


Fig. 1. Esquema de los pasos necesarios para la técnica de FISH y "pintado" cromosómico.

1. La preparación del material biológico que se desea hibridar (cromosomas mitóticos, meióticos, núcleos, cortes histológicos, etc.), se realiza con técnicas convencionales, teniendo ciertas precauciones en cuanto al fijado o envejecimiento del material.
2. Por otro lado se prepara la secuencia de ADN rotulada por medio de la técnica de PCR (véase cap. 3) o con la técnica alternativa de "traslado de melladura = *nick translation*", con nucleótidos marcados especialmente con biotina o con digoxigenina.
3. El siguiente paso es el de *desnaturalización* tanto de la sonda como del material celular (véase cap. 3). Para ello se usa un *buffer* de hibridización que contiene formamida, sustancia que al bajar la temperatura de fusión (Tm: *melting* en inglés) del ADN de 95 °C a alrededor de 72 °C facilita su desnaturalización (separación de la doble cadena a cadena simple).
4. Una vez que se desnaturalizó a alta temperatura tanto el material celular como la sonda, se obtienen las cadenas separadas de ADN y se procede a realizar la hibridización, poniendo ambas en contacto duran-

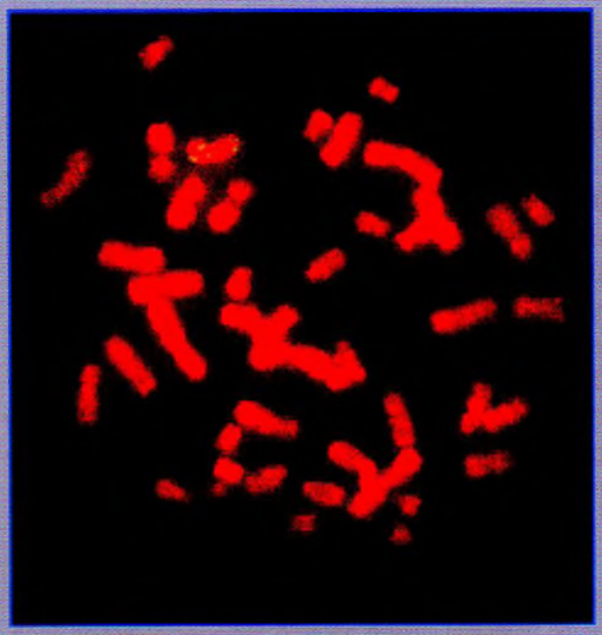


Fig. 2. Pintado cromosómico del X normal en un caso de un varón azoospérmico (con rearreglos cromosómicos que no afectan el X). (Solari AJ, et al., inédito.)

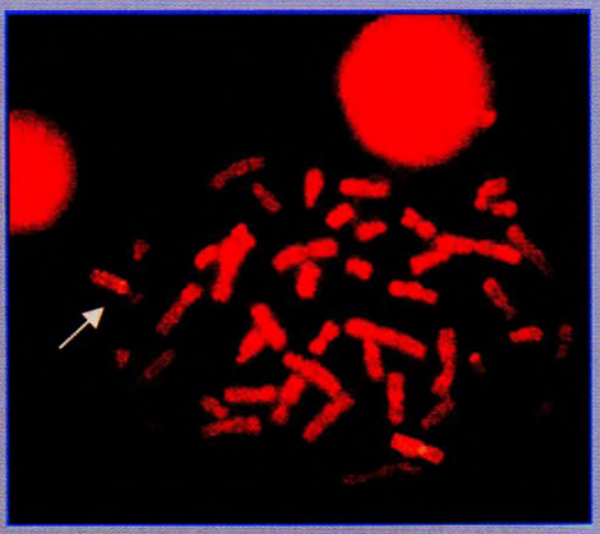


Fig. 3. Pintado cromosómico del X en un caso de una niña afectada por una translocación del cromosoma 21 al cromosoma X con pérdida de Xp (la flecha blanca señala el sitio en que el X "pintado" de amarillo se continúa con un brazo corto anormal [autosómico] en color rojo). (Solari AJ, et al. Biocell 2001; 25:155-166.)

te unas 12-16 h a 37 °C en cámara húmeda. Durante este procedimiento se irán alineando las cadenas de ADN, formando los cuatro tipos de híbridos señalados más arriba, de los cuales los buscados son los híbridos estables entre el ADN celular y las sondas marcadas, que son los que se detectan en los siguientes pasos.

5. Luego, bajo condiciones muy controladas de estrictez y temperatura, se deben lavar los preparados, para lograr que todas aquellas cadenas híbridas inestables, inespecíficas o pequeñas (b y c de paso 4) que no interesen sean eliminadas, quedando además de las cadenas propias del ADN los híbridos estables entre el ADN celular y las sondas marcadas.
6. Finalmente se detectan los sitios donde se localizan las sondas marcadas. Las sustancias reaccionan específicamente con otras (biotina con avidina y digoxigenina con antidigoxigenina), las cuales pueden estar acopladas a su vez con sustancias fluorescentes, como la fluoresceína, la rodamina, etcétera.
7. Los sitios de hibridización son visualizados con un microscopio de fluorescencia.

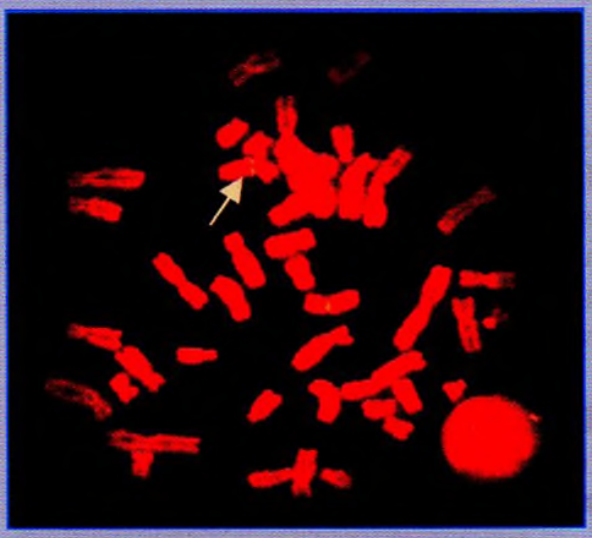


Fig. 4. Pintado cromosómico del X centromérico en un caso de una niña afectada por una translocación del cromosoma 21 al cromosoma X con pérdida de Xp, con la particularidad de encontrarse un centrómero bipartito (*flecha blanca*). Se observa además un núcleo en interfase con un centrómero condensado (el del X inactivo) y otro disperso (Solari AJ, et al., Biocell 2001; 25:155-166).

Las aplicaciones en el diagnóstico citogenético y en la investigación son cada vez más amplias:

1. El análisis de la estructura cromosómica y la construcción de mapas físicos de los mismos. A causa de ello pueden localizarse espacialmente secuencias determinadas de ADN y relacionarlas con los genes, lo cual es muy útil para el mapeo del genoma humano.
2. Se puede identificar en forma inmediata y precisa cada uno de los cromosoma por medio de sondas preparadas con secuencias específicas de ese cromosoma (fig. 2). La técnica de pintado es muy versátil, rápida y concluyente para resolver casos de alteraciones estructurales y anomalías numéricas, como se puede observar en algunos ejemplos de rearreglos cromosómicos complejos (fig. 3). También en una misma preparación se pueden identificar dos, o más, o todos los cromosomas por medio de un color distinto para cada uno de los cromosomas, o se pueden identificar regiones diferentes del mismo cromosoma por medio de colores diferentes. Otra forma de identificación de cada cromosoma humano se realiza mediante sondas centroméricas específicas para el tipo de secuencias satélite presentes en cada uno (fig. 4). Al poder realizar la HISYF no sólo sobre células mitóticas sino también sobre células interfásicas y aun espermatozoides (véase panel 12-1), es posible determinar el sexo, como también aberraciones numéricas y/o estructurales sin la necesidad de realizar cultivos celulares para tal fin.
3. Es posible localizar un gen determinado o secuencias transformadas u oncogenes sobre preparados histológicos de rutina mediante cortes de parafina obtenidos de biopsias, incluso en preparaciones de varios años atrás.
4. Ya en investigación básica, en estudios evolutivos se pueden analizar los rearreglos cromosómicos ocurridos en diferentes especies que se quieren comparar, pudiéndose analizar similitudes o diferencias entre sus cariotipos.

sencia de un gen determinado o de un oncogén en las células de una biopsia efectuada varios años atrás.[6] En estos casos, para mejorar la detección, puede combinarse la HISYF con la aplicación in situ de la reacción en cadena de la polimerasa (véanse paneles 17-1 y 17-2).

Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa: técnica SISP (= PRINS)

En lugar de utilizar una sonda marcada para localizar una secuencia en el ADN, se ha diseñado un procedimiento que, esencialmente, es una reacción en cadena de la polimerasa (RCP, véase cap. 3) realizada en el portaobjetos con las células fijadas (*S*íntesis *I*n *S*itu mediante *P*rímeros, SISP): se coloca una solución con primeros para la secuencia que se desea localizar, se agregan los reactivos de la RCP (con un nucleótido marcado con biotina) y se coloca el portaobjetos en un termociclador para efectuar la síntesis in situ, utilizando como templado el ADN celular. En las condiciones establecidas, el producto de la síntesis es la secuencia del ADN celular multiplicada miles de veces y retenida (mayormente) en el lugar de origen. La detección se realiza igual que con la HISYF. De esta manera, se pueden obtener señales muy intensas de fluorescencia que indican el lugar original donde se encuentra la secuencia.[8]

El cariotipo humano. Clasificación de SINCH (= ISCN)

Se ha establecido un "Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana" (SINCH = ISCN en inglés),[9] por medio del cual la descripción del cariotipo normal y patológico está estandarizada.

Esta clasificación está basada en el tamaño de los cromosomas y en la posición relativa del centrómero; si el centrómero es central, el cromosoma es metacéntrico; cuando está muy cerca

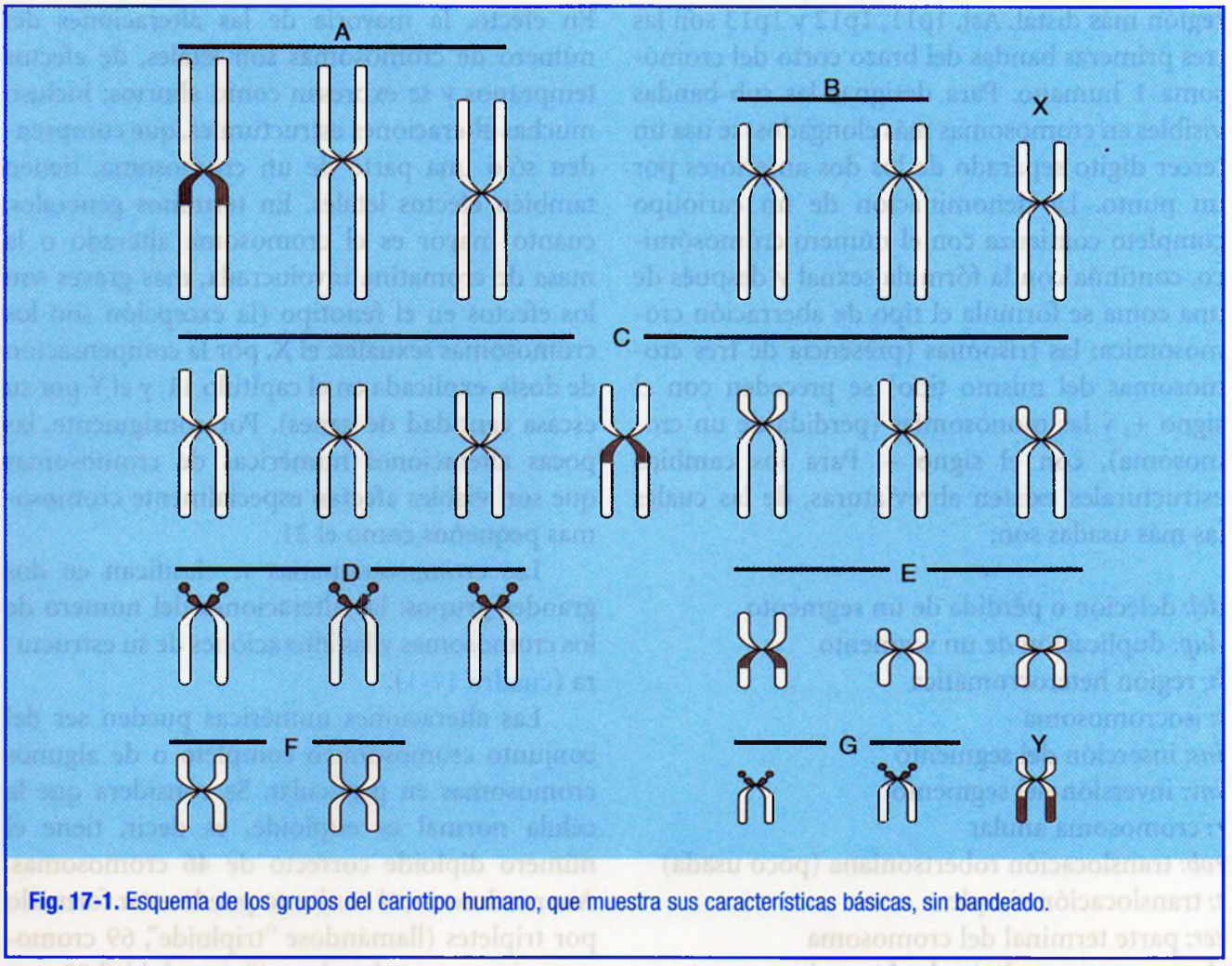


Fig. 17-1. Esquema de los grupos del cariotipo humano, que muestra sus características básicas, sin bandeado.

de un extremo, es acrocéntrico; los casos intermedios son los submetacéntricos. En la especie humana no hay cromosomas con el centrómero en un extremo (telocéntricos). La clasificación básica de los cromosomas humanos comprende siete grupos (fig. 17-1):

Grupo A: cromosomas 1-3. Son grandes y metacéntricos (1 y 3) o submetacéntricos (2).

Grupo B: cromosomas 4 y 5. Son submetacéntricos menores que el 2 y parecidos en tamaño.

Grupo C: cromosomas 6-12 y X. Son submetacéntricos de tamaño mediano. El X es uno de los dos mayores del grupo.

Grupo D: cromosomas 13-15. Son acrocéntricos con satélites y la región del organizador nucleolar (NOR), de tamaño mediano.

Grupo E: cromosomas 16-18. Son cortos; el 16 es metacéntrico y el 17 y el 18 son submetacéntricos.

Grupo F: cromosomas 19-20. Son pequeños y metacéntricos.

Grupo G: cromosomas 21-22 e Y. Son acrocéntricos con satélites y NOR, salvo el Y, que no tiene NOR ni satélites y cuyo brazo corto es más notorio.

En todos los cromosomas, su brazo corto se llama *p* (del francés *petit*) y su brazo largo se llama *q*. Los centrómeros, los telómeros y la parte media de bandas importantes se usan como "hitos" para definir regiones principales, que se expresan como el primer dígito después del brazo; por ejemplo p1, p2 y p3 son las tres regiones del brazo corto en el cromosoma 1, siempre comenzando la numeración por el centrómero. Luego se designan las bandas de cada región, de proximal a distal (alejada del centrómero), que son el segundo dígito. La banda usada como hito se considera por completo perteneciente a la

región más distal. Así, 1p11, 1p12 y 1p13 son las tres primeras bandas del brazo corto del cromosoma 1 humano. Para designar las sub-bandas visibles en cromosomas más elongados, se usa un tercer dígito separado de los dos anteriores por un punto. La denominación de un cariotipo completo comienza con el número cromosómico, continúa con la fórmula sexual y después de una coma se formula el tipo de aberración cromosómica: las trisomías (presencia de tres cromosomas del mismo tipo) se preceden con el signo +, y las monosomías (pérdida de un cromosoma), con el signo –. Para los cambios estructurales existen abreviaturas, de las cuales las más usadas son:

del: deleción o pérdida de un segmento
dup: duplicación de un segmento
h: región heterocromática
i: isocromosoma
ins: inserción del segmento
inv: inversión del segmento
r: cromosoma anular
rob: translocación robertsoniana (poco usada)
t: translocación simple
ter: parte terminal del cromosoma
der: cromosoma derivado, formado por un reordenamiento complejo.

De esta manera, el cariotipo de un varón con síndrome de Down por trisomía libre se formula: 47,XY,+21, y el de un síndrome de Down por translocación robertsoniana entre dos cromosomas 21, es 46,XY,t(21q;21q). En el caso de las translocaciones robertsonianas, sólo se escriben los brazos que forman el cromosoma fusionado.

Cromosomopatías. Clasificación

Las enfermedades producidas por la alteración de los cromosomas, tanto en su número como en su estructura interna o en la disposición de sus partes, son las cromosomopatías. Resulta lógico esperar que las cromosomopatías se expresen por alteraciones fenotípicas múltiples y de acentuada gravedad, dado que involucran, cada una de ellas, bloques de millares de genes. En efecto, la mayoría de las alteraciones del número de cromosomas son letales, de efectos tempranos y se expresan como abortos; incluso muchas alteraciones estructurales, que comprenden sólo una parte de un cromosoma, tienen también efectos letales. En términos generales, cuanto mayor es el cromosoma alterado o la masa de cromatina involucrada, más graves son los efectos en el fenotipo (la excepción son los cromosomas sexuales: el X, por la compensación de dosis, explicada en el capítulo 11, y el Y por su escasa cantidad de genes). Por consiguiente, las pocas alteraciones numéricas de cromosomas que son viables afectan especialmente cromosomas pequeños como el 21.

Las cromosomopatías se clasifican en dos grandes grupos: las alteraciones del número de los cromosomas y las alteraciones de su estructura (cuadro 17-1).

Las alteraciones numéricas pueden ser del conjunto cromosómico completo o de algunos cromosomas en particular. Se considera que la célula normal es euploide, es decir, tiene el número diploide correcto de 46 cromosomas. Anormalmente, el conjunto puede estar formado por tripletes (llamándose "triploide" 69 cromosomas) o por cuadrupletes ("tetraploide" 92 cromosomas) de cromosomas homólogos; éstos son casos de *poliploidía*, o sea de multiplicación del conjunto cromosómico. Se debe recordar que el conjunto cromosómico básico, presente en un gameto humano, se llama conjunto *haploide*, de 23 cromosomas.

Cuando el conjunto cromosómico no es un múltiplo exacto del número haploide, la anomalía se llama *aneuploidía*. Así, uno o más cromosomas excedentes, o uno o más cromosomas faltantes, son casos de aneuploidía. Cuando existe un cromosoma excedente y homólogo de uno de los normales, hay un triplete de ese tipo de cromosoma y la anomalía se llama trisomía. La trisomía más común es la del cromosoma 21 (síndrome de Down). Cuando falta un cromosoma, hay un solo homólogo y esta anomalía es una *monosomía*. La única monosomía viable en la especie humana es la del cromosoma X (síndrome de Turner). Las poliploidías humanas son letales tempranas, aunque algunos casos raros

Cuadro 17-1. Clasificación de las cromosomopatías

I. ALTERACIONES NUMÉRICAS A. Del conjunto	1. Poliploidía	1a: Triploidía 1b: Tetraploidía 1c: Mosaicos con componente poliploide
	2. Parentales	2a: Diandria 2b: Diginia
B. Parciales, autosómicas (aneuploidías autosómicas)	1. Trisomías autosómicas	1a: Trisomía 21 (síndrome de Down) 1b: Trisomía 18 (síndrome de Edwards) 1c: Trisomía 13 (síndrome de Patau) 1d: Trisomías menos frecuentes (8 y otras) (Letales)
	2. Monosomías	
	3. Mosaicos aneuploides	3a: 47/46, +21
C. Parciales, sexuales (aneuploidías sexuales)	1. Trisomías sexuales	1a: XXY (síndrome de Klinefelter) 1b: XXX (triple X o trisomía del X) 1c: XYY (síndrome XYY)
	2. Monosomías sexuales	2a: X0 (síndrome de Turner)
	3. Polisomías sexuales	3a: XXXY (variante del síndrome de Klinefelter) 3b: XXXXY 3c: XXXX (tetrasomía del X)
	4. Mosaicos aneuploides	4a: XXY/XY; XXXY/XY 4b: X0/XX
II. ALTERACIONES ESTRUCTURALES (REORDENAMIENTOS)	1. Deleciones	(Cromosomas varios)
	2. Duplicaciones	
	3. Translocaciones	
	4. Inversiones	
	5. Isocromosomas	
	6. Otras (cromosomas anulares, derivados complejos, etc.)	
	7. Sitios cromosómicos frágiles	

sobreviven hasta la época perinatal. Otro tipo de anomalía de todo el conjunto de cromosomas (aunque el número sea euploide, 46) es la *diandria*, es decir que el conjunto cromosómico proviene íntegramente del padre (desapareció el conjunto cromosómico materno y está duplicado el del padre). Esta anomalía no sólo es letal temprana, sino que en vez de embrión se desarrolla una *mola hidatidiforme*. A su vez, si el conjunto cromosómico proviene sólo de la madre, el resultado es una diginia, que también es letal temprana.

Cuando en el organismo, en vez de haber un único tipo de conjunto cromosómico en todas las células somáticas, existen algunas células que muestran un cariotipo, en tanto que otras muestran un cariotipo distinto, se dice que existe un *mosaicismo*. Los mosaicismos son relativamente frecuentes e implican que hay (al menos) dos líneas celulares desde el embrión temprano; con frecuencia, una de las líneas celulares es totalmente normal y la otra es aneuploide. En cierta manera, la línea celular normal atempera los efectos patológicos de la línea aneuploide.

Por su parte, las alteraciones estructurales son variadas y sus efectos son más complejos.

Tipos de alteraciones estructurales de los cromosomas

Las aberraciones estructurales (véanse detalles en el capítulo 18) son más difíciles de reco-

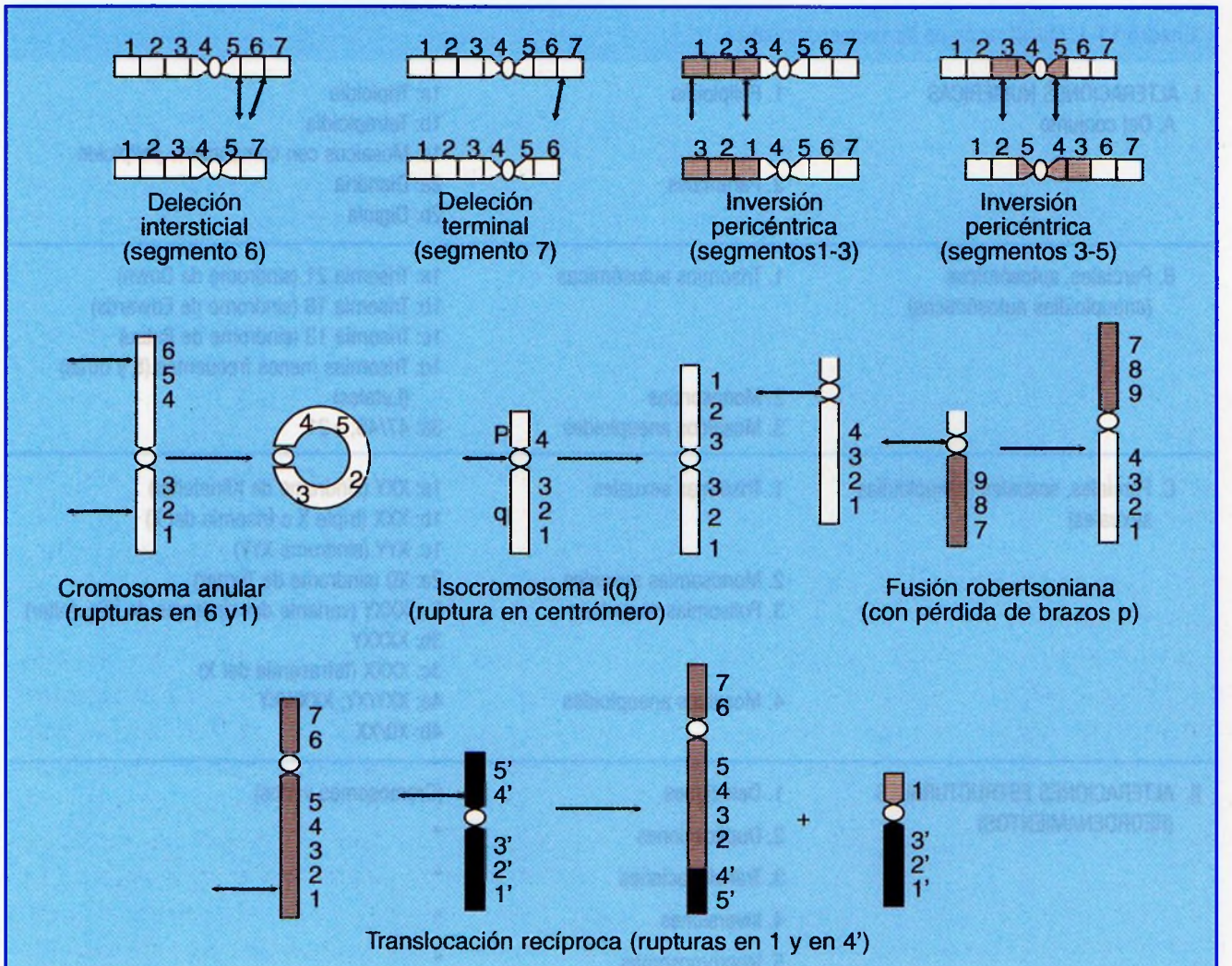


Fig. 17-2. Esquema de las alteraciones estructurales de los cromosomas. Las dobles flechas simbolizan rupturas en el cromosoma.

nocer que las numéricas y en general permanecieron poco definidas hasta la aparición de métodos sofisticados de bandeado. Los principales tipos de aberraciones estructurales se definen a continuación (fig. 17-2).

Las *deleciones* (o "pérdidas") son regiones, bandas o sub-bandas faltantes en un cromosoma; generalmente el cromosoma homólogo es normal, por lo que la deleción es "heterocigota" y es equivalente a una *monosomía parcial* de ese cromosoma (las monosomías completas de los autosomas son letales, como se dijo antes). El campo de las deleciones se ha ampliado con las "microdeleciones" en las cuales sólo está faltante una sub-banda perceptible con los bandeados de alta resolución, y a veces sólo demostrable con HISYF (véase antes). Las deleciones y microdeleciones han sido muy útiles para el mapeo de genes, porque contienen grupos de genes estrechamente ligados (véase ligamiento en cap. 11). A pesar de su pequeñez, al observarlas al microscopio, los efectos fenotípicos de las deleciones pueden ser múltiples y variados, porque pueden dejar en estado monosómico un grupo de centenares o decenas de genes. El origen de las deleciones es diverso, pero se considera que la mayoría se origina en la meiosis de un progenitor, por un entrecruzamiento anormal, que produce un gameto con una deleción y otro con una duplicación. A veces, una microdeleción coincide con una mutación génica puntual que es heterogénea, es decir que

el efecto (enfermedad) puede originarse en una mutación génica ordinaria (como sería una transversión de una base) o en una microdeleción que hace desaparecer parcial o totalmente a ese gen.

Las *duplicaciones* por lo general tienen el mismo origen y características similares a las deleciones; además, el segmento duplicado puede estar en la orientación normal ("duplicación directa") o puede encontrarse en la orientación opuesta ("duplicación invertida"). Un tipo muy especial de deleción y duplicación concurrentes es un *isocromosoma*. Se trata de un cromosoma anormal compuesto por dos brazos idénticos (es un brazo duplicado), con la pérdida del otro brazo. Se considera que un isocromosoma se origina primero por una ruptura a nivel del centrómero, con la pérdida de uno de los brazos; luego las dos cromátidas del brazo restante quedan organizadas como dos brazos idénticos unidos por la porción remanente (y funcional) del centrómero. El isocromosoma más frecuente es el isocromosoma Xq (i Xq).

Las *inversiones* no involucran una pérdida o una ganancia de sustancia, sino sólo un reordenamiento de partes del cromosoma. Las inversiones pueden ser *pericéntricas* (las más frecuentes), cuando invierten un segmento que comprende el centrómero, o pueden ser *paracéntricas*, cuando involucran exclusivamente un segmento de un brazo. Las inversiones pericéntricas pequeñas son consideradas inocuas, aunque existen evidencias de que pueden inducir infertilidad o esterilidad, especialmente en el varón. Las *translocaciones* son anomalías en las que intervienen dos cromosomas diferentes (no homólogos), en las cuales estos cromosomas se intercambian segmentos. Las translocaciones llamadas *robertsonianas* (por el citólogo W. R. Robertson) involucran dos cromosomas acrocéntricos diferentes, por ejemplo, el 13 y el 21, y las dos fracturas de los cromosomas se producen a nivel de los dos centrómeros y originan dos productos: uno, viable, compuesto por los dos brazos largos unidos por las regiones centroméricas, y el otro, que se pierde, formado por los dos brazos cortos. Dado que estos brazos cortos están compuestos por heterocromatina constitutiva y genes ribosómicos redundantes, su pérdida no se traduce en un efecto fenotípico. Sin embargo, los portadores de estas translocaciones (heterocigotas) muestran efectos de ellas en su reproducción (abortos) y en ciertas ocasiones los portadores varones son estériles.

Las *translocaciones recíprocas* constituyen el intercambio de segmentos entre dos cromosomas y dan por resultado dos cromosomas derivados, que generalmente tienen una forma diferente de aquella de los dos cromosomas originales. Una translocación recíproca es, en principio, *balanceada*, porque cuando se produjo la translocación, la célula no perdió (ni ganó) ningún segmento. Sin embargo, en la meiosis, el destino de los productos de la translocación y sus homólogos normales puede separarse; entonces, puede ir a los gametos, un conjunto cromosómico que luego de la fertilización da lugar a una translocación *desbalanceada*, que conforma una monosomía parcial o una trisomía parcial. Dado que las translocaciones son relativamente frecuentes en la población (1 cada 1.000 nacidos vivos), representan una fuente significativa de aberraciones estructurales en su progenie.

Anomalías numéricas. Trisomía 21 y síndrome de Down

La trisomía del cromosoma 21 es la anomalía cromosómica más frecuente de los autosomas, ya que su prevalencia es de 1 cada 700 nacidos vivos en las razas blancas o caucásicas (hay algunas diferencias en otras poblaciones), sin distinción del ambiente geográfico o de la clase social. En cambio, es muy significativa la relación entre la edad materna durante la gestación y la frecuencia de la incidencia de esta y otras trisomías. La trisomía 21 produce el síndrome de Down ("mongolismo"), descrito en 1866 por el médico de ese nombre. En 1932, P. J. Waardenburg sugirió que ocurría a causa de una anomalía cromosómica, lo cual fue demostrado por J. Lejeune y cols. en 1959.[2,10] El 95% de los pacientes con este síndrome tiene una trisomía directa o "libre" del cromosoma 21, y el 5% res-

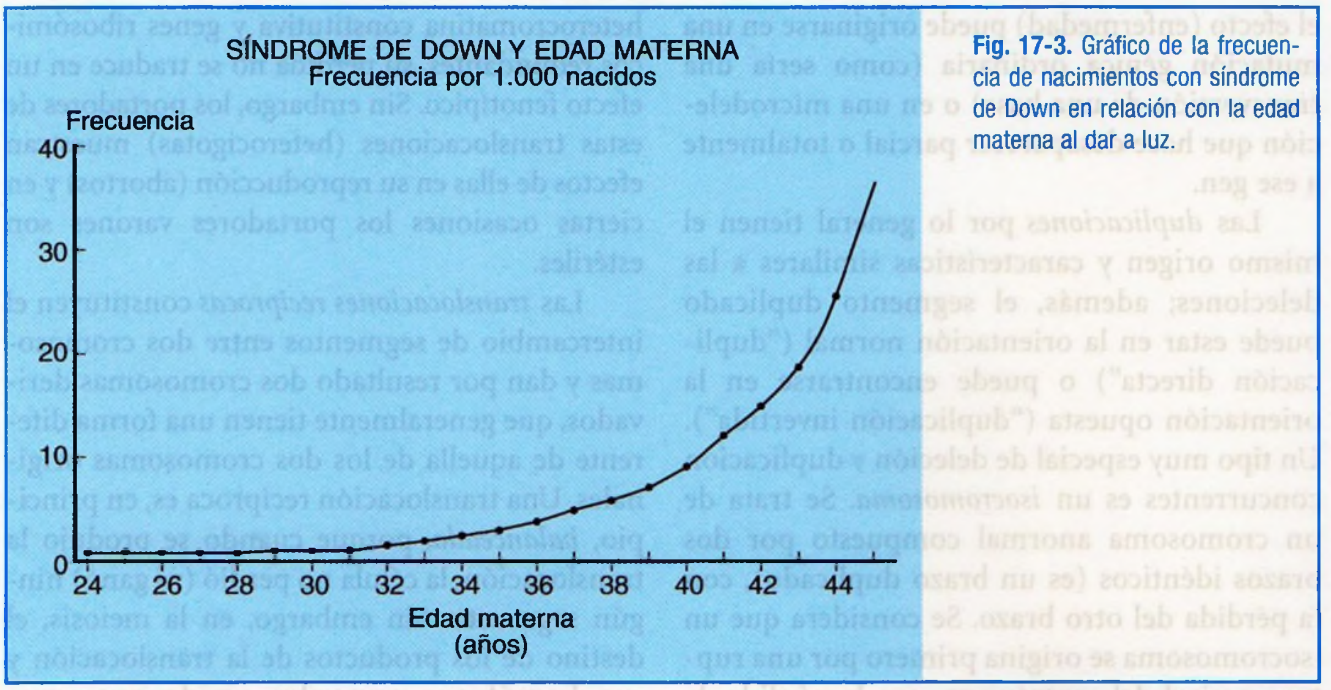


Fig. 17-3. Gráfico de la frecuencia de nacimientos con síndrome de Down en relación con la edad materna al dar a luz.

tante presenta una translocación cromosómica que determina una condición trisómica para el brazo largo del cromosoma 21 o para su parte distal. El mecanismo de origen es totalmente diferente en las trisomías y en las translocaciones, así como el riesgo de recurrencia (volver a dar a luz un niño con el síndrome) es distinto, por lo cual es fundamental el estudio cromosómico para determinar si es un síndrome de Down por trisomía o por translocación. La relación entre la edad materna y el riesgo de dar a luz a un trisómico está firmemente establecida: el riesgo aumenta alrededor de 40 veces entre la edad de 20 años y las edades mayores de 45 años. El gráfico de la frecuencia *versus* edad materna (fig. 17-3) se mantiene lineal hasta aproximadamente los 32 años y luego va aumentando en forma casi exponencial; sin embargo, a la edad de mayor riesgo (más de 45 años) la frecuencia no excede del 3% (comparada con una frecuencia cercana al 0,07% a los 20 años). Esta relación entre edad materna y trisomía sugiere inmediatamente que el origen de esta anomalía estriba en la meiosis materna. En efecto, la trisomía 21 se origina de manera preponderante por una no disyunción en la meiosis de la madre (fig. 17-4) (véase cap. 12).

La frecuencia de no disyunción aumenta correlativamente con la edad materna; en la mujer, todos los ovocitos ya están formados en el momento del nacimiento y algunos de ellos se van activando en los ciclos menstruales sucesivos hasta la menopausia. En contraposición, la producción de espermatocitos es continua durante la vida adulta del varón, lo cual no significa que el varón esté totalmente libre de que ocurra no disyunción en sus espermatocitos. Si bien la mayoría (90%) de las trisomías 21 suceden a causa de una no disyunción materna, una minoría (< 10%) se debe a una no disyunción en el padre (Hulten MA, et al., 2010) (véase cap. 12).

La no disyunción es esencialmente un suceso esporádico, de manera que si una mujer ha tenido un hijo con síndrome de Down por trisomía, el riesgo de tener otro está relacionado solamente con su edad. En cambio, si una mujer ha tenido un niño enfermo por translocación, uno de los padres probablemente es portador de una translocación balanceada, y el riesgo de recurrencia es mucho mayor que el proporcional a su edad. Adicionalmente, es importante realizar el estudio del cariotipo porque hay un 2% de pacientes con mosaicismo, cuyo pronóstico es más benigno. El mosaicismo por lo común consiste en una línea celular con trisomía y una línea diploide normal, es decir, por ejemplo, 47,XY,+21/46,XY.

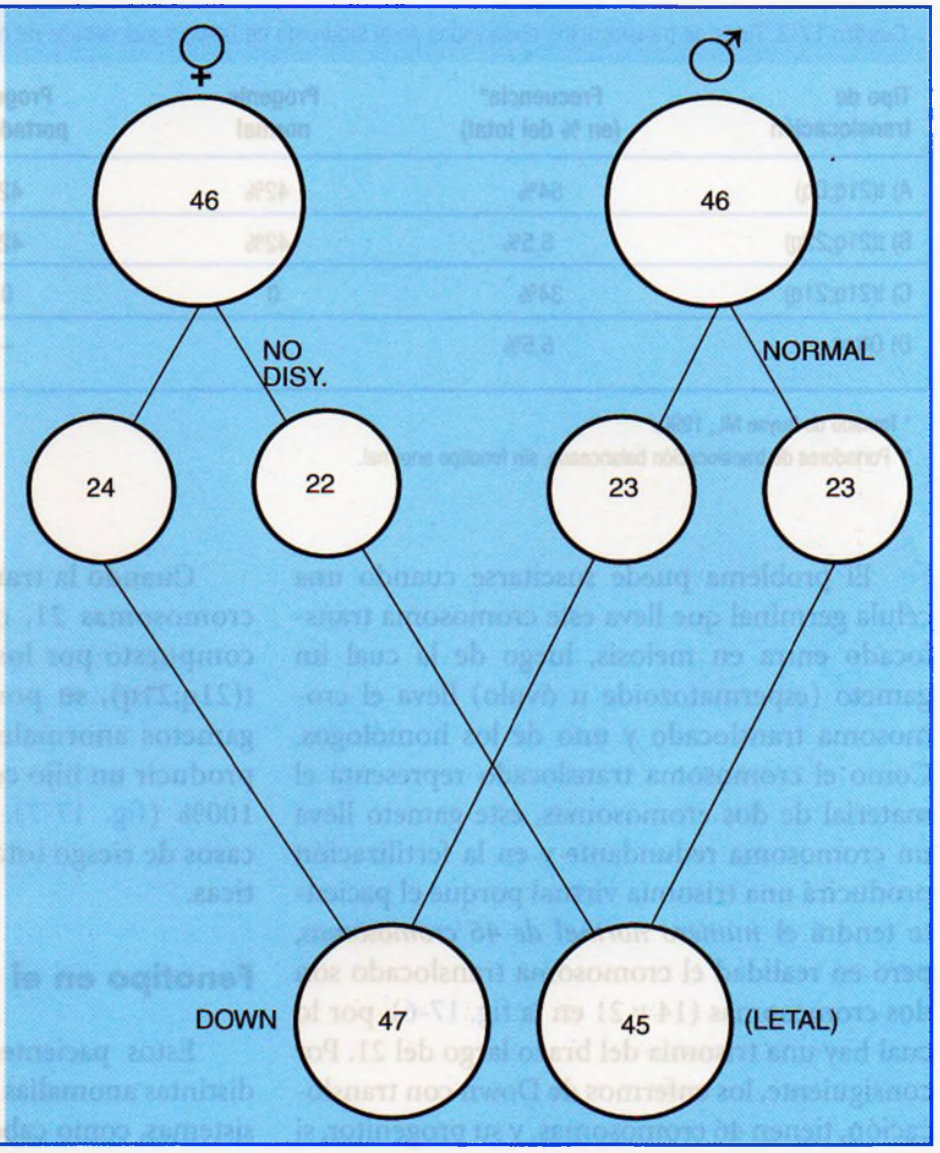


Fig. 17-4. Origen de la trisomía 21 por no disyunción materna en la primera división meiótica (la causa más frecuente).

Síndrome de Down por translocación

Hay varios tipos de translocaciones que dan lugar al síndrome de Down; prácticamente todas son de tipo robertsoniano. Las más frecuentes son las que involucran un cromosoma acrocéntrico grande (del grupo D) y el 21, y las que afectan dos cromosomas acrocéntricos pequeños (cuadro 17-2).

Las translocaciones observadas en el síndrome de Down involucran casi siempre cromosomas acrocéntricos; dos cromosomas acrocéntricos sufren rupturas cerca del centrómero y se recomponen en dos nuevos cromosomas: uno compuesto por los dos brazos largos y el otro por los dos brazos cortos; este último es un cromosoma muy pequeño y compuesto por heterocromatina, que generalmente se pierde sin efectos fenotípicos. El otro cromosoma derivado de esta translocación robertsoniana es un cromosoma diferente de los normales, metacéntrico o submetacéntrico, que al contener casi todo el material genético de los cromosomas que intervinieron en la translocación, no expresa tampoco efectos fenotípicos en la célula original o en su clon de descendientes; se trata de una translocación *balanceada*, porque no sobra ni falta material (salvo el pequeño trozo de heterocromatina perdida). Se denomina balanceada cuando no hay trisomía o monosomía parcial, es decir que el cromosoma derivado representa a dos acrocéntricos y la célula tiene además los homólogos íntegros que no intervinieron en la translocación (fig. 17-5).

Cuadro 17-2. Tipos de translocación observados en el síndrome de Down y sus riesgos de recurrencia teóricos

Tipo de translocación	Frecuencia* (en % del total)	Progenie normal	Progenie portadora**	Progenie trisómica
A) t(21q;Dq)	54%	42%	42%	16%
B) t(21q;22q)	6,5%	42%	42%	16%
C) t(21q;21q)	34%	0	0	100%
D) Otras	5,5%			

* Tomado de Buyse ML, 1990.

** Portadores de translocación balanceada, sin fenotipo anormal.

El problema puede suscitarse cuando una célula germinal que lleva este cromosoma translocado entra en meiosis, luego de la cual un gameto (espermatozoide u óvulo) lleva el cromosoma translocado y uno de los homólogos. Como el cromosoma translocado representa el material de dos cromosomas, este gameto lleva un cromosoma redundante y en la fertilización producirá una trisomía virtual porque el paciente tendrá el *número normal de 46 cromosomas*, pero en realidad el cromosoma translocado son dos cromosomas (14 y 21 en la fig. 17-6), por lo cual hay una trisomía del brazo largo del 21. Por consiguiente, los enfermos de Down con translocación, tienen 46 cromosomas, y su progenitor, si es portador, tiene 45 cromosomas (fig. 17-6).

Cuando la translocación involucra los dos cromosomas 21, que forman un cromosoma compuesto por los dos brazos largos, es decir t(21q;21q), su portador sólo puede producir gametos anormales, es decir que el riesgo de producir un hijo con síndrome de Down es del 100% (fig. 17-7). Éste es uno de los pocos casos de riesgo total en las enfermedades genéticas.

Fenotipo en el síndrome de Down

Estos pacientes presentan un cuadro con distintas anomalías que abarcan varios órganos y sistemas, como cabe esperar en un desequilibrio que afecta numerosos genes.

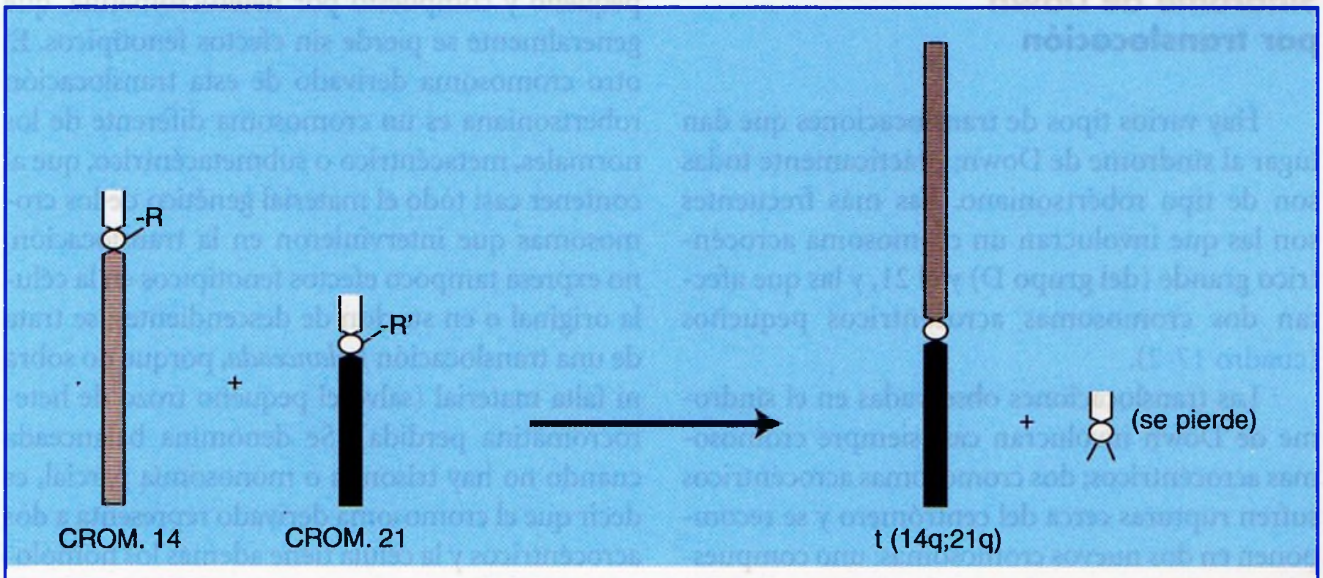


Fig. 17-5. Esquema de la formación de un cromosoma con translocación que podría producir síndrome de Down. R: rupturas.

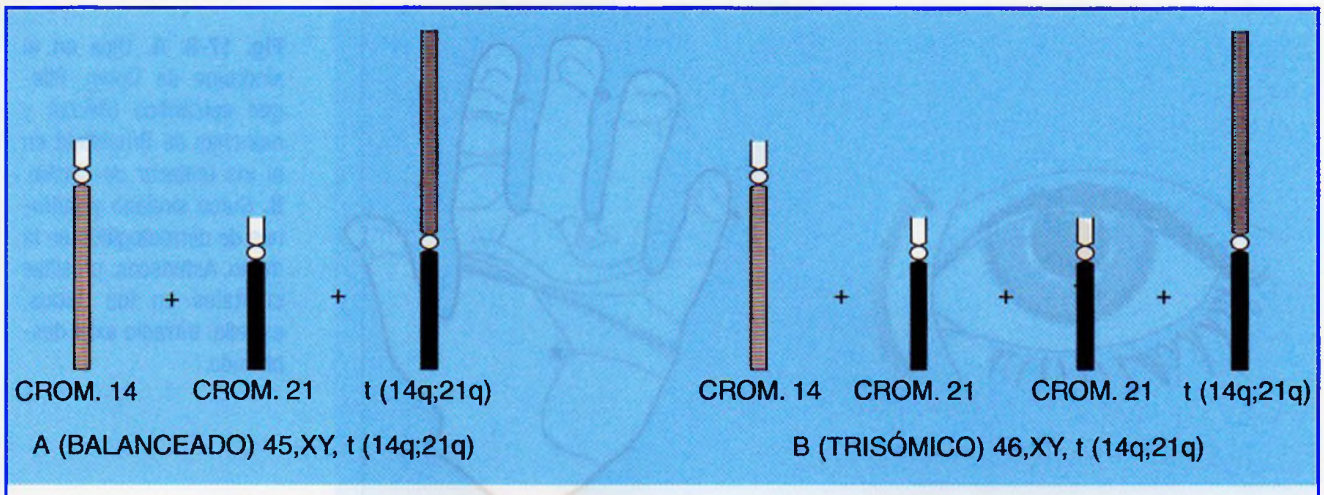


Fig. 17-6. Diferencia entre el portador de una translocación balanceada (A) y su hijo, trisómico por transmisión del cromosoma translocado.

Los signos y síntomas más importantes son: hipotonía muscular marcada, retraso mental, facies característica, con pliegues epicánticos y abertura palpebral sesgada hacia arriba y afuera, hipoplasia maxilar y del paladar que determinan la protrusión de la lengua, anomalías internas (del corazón: defectos del tabique ventricular, conducto arterioso permeable; atresia o estenosis duodenal), dedos cortos con hipoplasia de la falange media del quinto dedo, dermatoglifos característicos y otros. Algunos signos son muy frecuentes o típicos, tales como la hipotonía muscular, los dermatoglifos con el surco simiesco en la palma, y, en el caso de color de ojos claro (azul-verde), las manchas de Brushfield, que son manchitas blancas situadas en forma concéntrica en el tercio más interno del iris (no se observan en ojos oscuros; fig. 17-8).

El retraso mental es el signo mayor en el síndrome de Down. Por lo común, los adultos tienen un coeficiente intelectual (CI) de 25 a 50, pero se considera que el nivel alcanzable puede variar de acuerdo con los estímulos que recibe de sus familiares y de su entorno. El CI varía durante la infancia, para obtener su máximo relativo al normal, entre los 3 y los 4 años

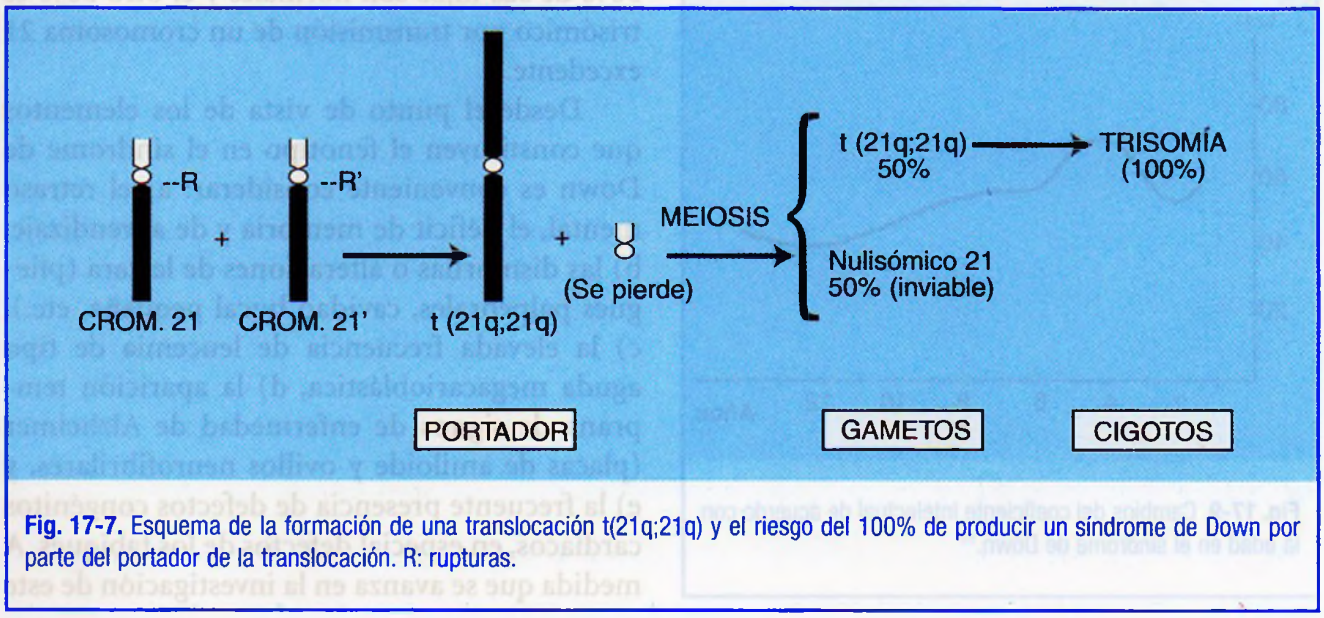


Fig. 17-7. Esquema de la formación de una translocación t(21q;21q) y el riesgo del 100% de producir un síndrome de Down por parte del portador de la translocación. R: rupturas.

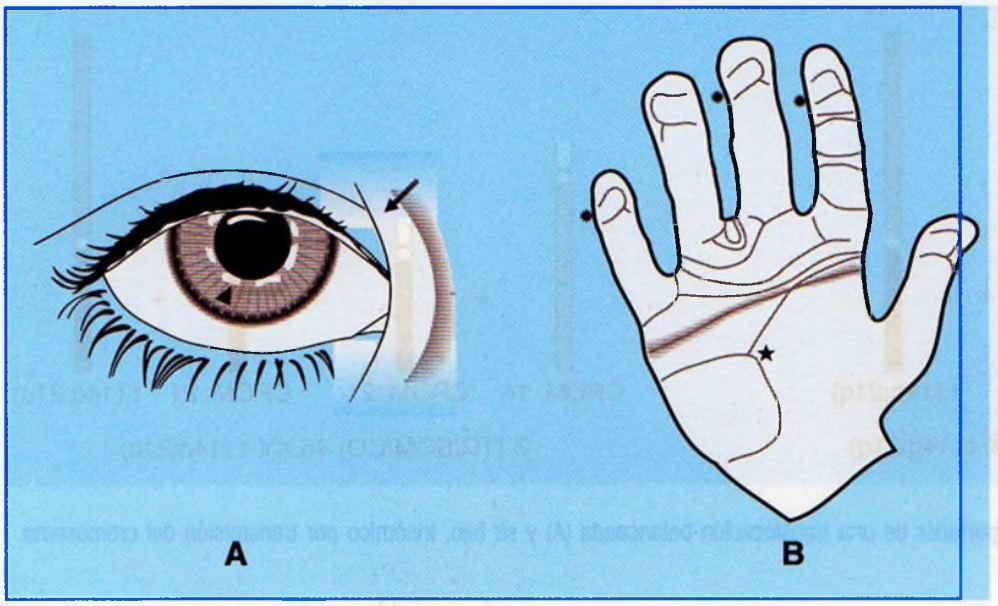


Fig. 17-8. A. Ojos en el síndrome de Down. Pliegue epicántico (*flecha*) y manchas de Brushfield en el iris (*cabeza de flecha*). **B.** Surco simiano y patrones de dermatoglifos en la mano. Asteriscos: presillas cubitales en los dedos; estrella: trirradio axial desplazado.

de edad, luego de lo cual declina más o menos uniformemente (fig. 17-9). Desde el punto de vista psicológico son alegres, obedientes, pueden tener sentido musical y no tienden a la violencia.

La supervivencia de los pacientes con síndrome de Down depende básicamente de la gravedad de las malformaciones viscerales que puedan tener; estas malformaciones determinan el fallecimiento de muchos en los primeros años, de modo que los mayores de 5 años tienen expectativas de vida razonablemente largas (55 años). Los peligros secundarios que amenazan a los niños mayores y a los adultos son el frecuente desarrollo de leucemias (su riesgo está aumentado 20 veces respecto del normal) y una enfermedad de Alzheimer muy precoz, con la formación de placas amiloides diseminadas visibles desde edades cercanas a los 30 años. Desde un punto de vista bioquímico, los pacientes tienen un elevado nivel de purinas en la sangre.

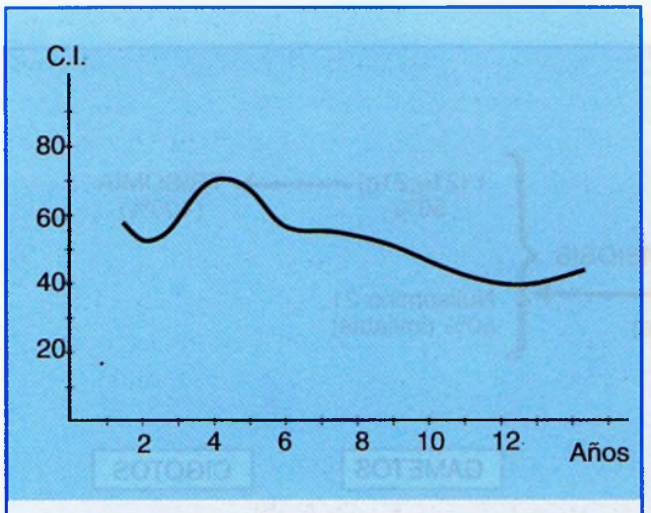


Fig. 17-9. Cambios del coeficiente intelectual de acuerdo con la edad en el síndrome de Down.[11]

La fertilidad de los pacientes es totalmente diferente en los dos sexos: mientras que en el varón con síndrome de Down la espermatogénesis se bloquea en la etapa meiótica y son estériles, las mujeres son fértiles. La descendencia de una paciente con síndrome de Down se ajusta a las predicciones teóricas, puesto que alrededor del 50% de sus hijos son normales y el otro 50% es trisómico por transmisión de un cromosoma 21 excedente.

Desde el punto de vista de los elementos que constituyen el fenotipo en el síndrome de Down es conveniente considerar: a) el retraso mental, el déficit de memoria y de aprendizaje, b) las dismorfias o alteraciones de la cara (pliegues palpebrales, cavidad bucal pequeña, etc.), c) la elevada frecuencia de leucemia de tipo aguda megacarioblástica, d) la aparición temprana de signos de enfermedad de Alzheimer (placas de amiloide y ovillos neurofibrilares, y e) la frecuente presencia de defectos congénitos cardíacos, en especial defectos de los tabiques. A medida que se avanza en la investigación de este

síndrome, se trata de asociar genes definidos a estas características.[12]

La anatomía patológica del encéfalo en estos enfermos muestra que hay una reducción del volumen cerebral, un aumento de la apoptosis neuronal y una reducción del número de sinapsis y del número de espinas dendríticas, lo que revela una disminución de la plasticidad neuronal en estos pacientes. Se han diseñado ratones portadores de una trisomía del cromosoma 16 (del ratón) que contiene un segmento homólogo al cromosoma 21 humano y que presenta signos parecidos a esta enfermedad; en estos ratones la histología cerebral es muy parecida a la de los enfermos. Todo esto ha llevado a considerar que existe una "región crítica" en el cromosoma 21 humano, que es básica para el desarrollo de la enfermedad (fig. 17-10).

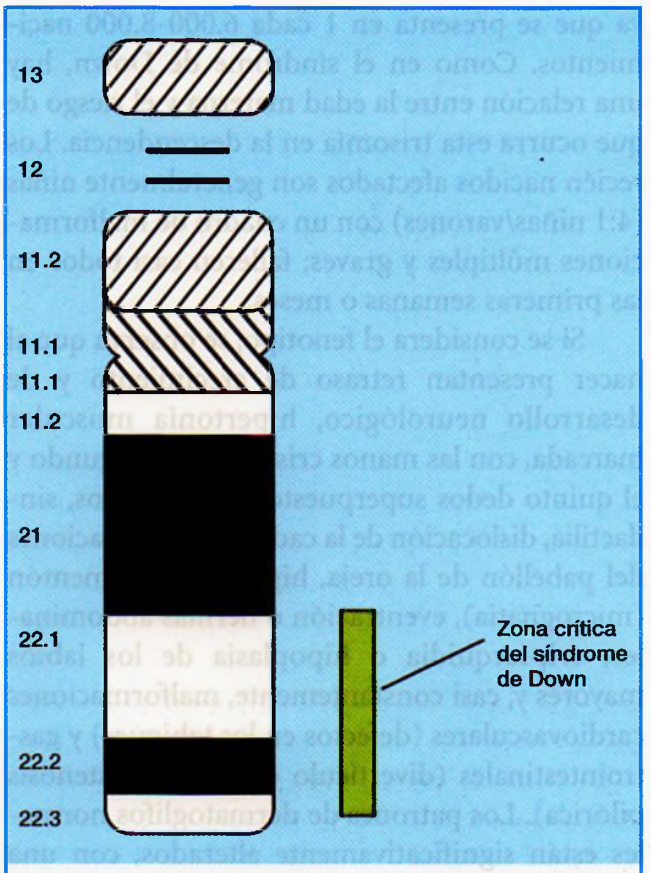


Fig. 17-10. Localización de la "zona crítica" para el desarrollo del síndrome de Down.

Patogenia del síndrome de Down

El síndrome de Down se produce a causa del desbalance génico originado por la presencia de tres grupos de genes homólogos, correspondientes a la mitad terminal del brazo largo del cromosoma 21. Cuando ocurre una trisomía 21 limitada a la parte proximal de 21q, si bien hay retardo mental y otras anomalías, no se produce el cuadro típico del síndrome de Down; éste se halla caracterizado por la trisomía de la región que incluye las bandas q22.1, q22.2 y q22.3. Esta idea de una "zona crítica" del cromosoma 21, donde están localizados los genes sensibles a la presencia de más de dos alelos (sensibles a dosis génica) se ha consolidado con los avances en la histopatología de los pacientes y sobre todo en los "modelos" de ratón para esta enfermedad.[12, 13, 14]

El gen *DYRK1A*, localizado en la región "crítica" codifica una quinasa que fosforila un número de "blancos" importantes entre ellos la proteína Tau y la APP, involucradas en la enfermedad de Alzheimer, así como la alfa sinucleína presináptica, y al menos dos proteínas de señalización intracelular. La expresión exagerada de este gen provoca una serie de signos en el ratón "modelo" y también se expresa exageradamente (con respecto a controles) en varios tejidos de los pacientes. Esta sobreexpresión de *DYRK1A* ha sido interpretada como un factor importante en la desregulación de las neuronas del hipocampo relacionadas con la memoria y el aprendizaje.[12] De manera similar, *RCAN1*, el gen regulador de la calcineurina 1, también es sensible a la dosis génica, y es sobreexpresado en los pacientes y en los modelos experimentales de ratón y probablemene interviene en el déficit neuronal en esta enfermedad.[12,14] El aspecto de mayor interés para la Medicina es que no sólo se comprueba que no todos los genes del cromosoma 21 intervienen para esta patología, sino que, al identificar los genes realmente involucrados en este fenotipo, se abre una perspectiva terapéutica para esta enfermedad hasta ahora considerada incurable.

Trisomía del cromosoma 18 (síndrome de Edwards)

Esta trisomía es aproximadamente diez veces menos frecuente que el síndrome de Down,

ya que se presenta en 1 cada 6.000-8.000 nacimientos. Como en el síndrome de Down, hay una relación entre la edad materna y el riesgo de que ocurra esta trisomía en la descendencia. Los recién nacidos afectados son generalmente niñas (4:1 niñas/varones) con un cuadro de malformaciones múltiples y graves; fallecen casi todos en las primeras semanas o meses.

Si se considera el fenotipo, se observa que al nacer presentan retraso de crecimiento y de desarrollo neurológico, hipertonía muscular marcada, con las manos crispadas y el segundo y el quinto dedos superpuestos a los vecinos, sindactilia, dislocación de la cadera, malformaciones del pabellón de la oreja, hipoplasia del mentón (micrognatia), eventración o hernias abdominales, criptorquidia o hipoplasia de los labios mayores y, casi constantemente, malformaciones cardiovasculares (defectos en los tabiques) y gastrointestinales (divertículo de Meckel, estenosis pilórica). Los patrones de dermatoglifos normales están significativamente alterados, con una elevada frecuencia de arcos en los dedos.

Durante la gestación y el parto hay ciertas características: es frecuente el polihidramnios y la placenta es de menor tamaño que el habitual; el feto es posmaduro, de menor tamaño y es común la detección ecográfica de malformaciones. Los defectos cardíacos están presentes en el 95% de los casos;[15] las malformaciones encefálicas, en el 65% de los recién nacidos, mientras que el 70% necesita asistencia respiratoria, lo cual indica la extrema gravedad de esta trisomía. El diagnóstico prenatal es por ecografía, y su detección por este método oscila entre el 70% y el 85% de certeza.[13] Cuando no se tiene un diagnóstico prenatal y estos niños nacen vivos, se plantean dilemas éticos, dado el corto plazo de sobrevida que pueden tener aun con cuidados intensivos.[15]

Trisomía del cromosoma 13 (síndrome de Patau)

La trisomía libre del cromosoma 13 ocurre 1 vez cada 12.000 nacidos vivos, y, si se consideran también las trisomías por translocación robertsoniana, el total de incidencia es de 1 cada 8.000 nacimientos. Esta trisomía, como la del 18, tiene mal pronóstico, con una mortalidad mayor del 90% en los primeros meses; también la mortalidad intrauterina es elevada. En su fenotipo son ostensibles las malformaciones graves de variada localización. Con frecuencia hay paladar hendido con labio leporino, aparente microftalmia, polidactilias, criptorquidia, microcefalia, profundo retraso del desarrollo neurológico, implantación baja de las orejas con pabellón malformado, malformaciones cardíacas (defectos de tabiques), anomalías renales (riñón poliquístico), anomalías gastrointestinales y graves malformaciones cerebrales (agenesia de los bulbos olfatorios y del cuerpo calloso, hipoplasia cerebelosa); los patrones de dermatoglifos están pronunciadamente alterados.

El origen de la anomalía es la no disyunción durante la meiosis de uno de los progenitores, más frecuentemente la madre. Las translocaciones entre el 13 y otro cromosoma del grupo D –la más habitual es la t(13q;14q)– sólo involucran un 2% de los casos. El diagnóstico es ecográfico en la mayoría de los casos y se confirma con el estudio del cariotipo.

Alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales: síndrome de Turner (45,X)

El síndrome de Turner fue originalmente descrito antes de conocerse su vinculación con una anormalidad cromosómica; desde ese punto de vista clínico, se caracteriza por amenorrea primaria (falta de ciclo) con ausencia de los cambios puberales femeninos, estatura anormalmente baja, cuello membranoso o en esfinge (*pterigium colli*) y cúbito valgo. En 1959 se comprobó la asociación entre este síndrome y la presencia de un único cromosoma sexual (X), es decir, la fórmula 45,X. Sin embargo, esta fórmula con monosomía total y libre del cromosoma X no tiene una mayoría aplastante en los cariotipos, como en otras aberraciones numéricas, sino que se presenta en el 55% de los casos de este síndrome, en tanto que los restantes casos corresponden a mosaicismos, aberraciones estructurales del cromosoma X y otras variaciones cromosómicas

Cuadro 17-3. Cariotipos en el síndrome de Turner y sus frecuencias*

Cariotipo	Categoría de la anomalía	Frecuencia
45,X	Numérica (monosomia libre)	55%
46,XX/45,X	Numérica (mosaicismo +/monosómico)	
47,XXX/45,X	Numérica (mosaicismo trisómico/monosómico)	10% (todos los mosaicismos)
47,XXX/46,XX/45,X	Numérica (mosaicismo, triple)	
46,X,i(Xq)	Estructural (isocromosoma Xq)	
46,X,i(Xp)	Estructural (isocromosoma Xp)	20% (todos los que tienen isocromosoma X)
46,X,i(Xq)/45,X y otros	Numérica y estructural (mosaicismos del isocromosoma X)	
46,X, del (Xp) o del (Xq) o mosaicos	Estructural (deleciones con mosaicismo o sin él)	5% (todos los que tienen deleción en el X)
46,X,r(X)/45,X	Estructural y numérica (cromosoma X anular y mosaicismo)	5%
Otros (46,XY, etc.)	Estructural, mutacional, etc.	5%

* Frecuencias respecto del total de pacientes con síndrome de Turner.[11]

(cuadro 17-3).[11,16] La incidencia del síndrome de Turner, al contrario de las trisomías mayores, no presenta relación con la edad materna; por el contrario, las evidencias muestran que una mayoría de los casos se origina en un accidente durante la meiosis del padre, posiblemente por la tendencia a irregularidades en la disyunción del par XY (véase cap. 12). Éste no es el único aspecto atípico de tal cromosomopatía, porque desde hace tres décadas está planteado el enigma de la gravedad de este síndrome, que en animales como el ratón no sólo no afectan la viabilidad y el fenotipo, sino que tampoco causan esterilidad, puesto que el ratón X0 es fértil.[17]

La viabilidad del síndrome de Turner (monosomía del X humano) está muy disminuida en la vida intrauterina; se considera que hasta un 99% de los cigotos 45,X humanos mueren antes del parto,[18,19] sobre todo antes del tercer mes del embarazo, por lo cual este síndrome puede ser considerado como letal relativo. La muerte de los embriones y fetos 45,X está relacionada con los defectos cardíacos y los higromas y es característica de los embriones con monosomía sexual completa; no ocurre así con los que presentan mosaicismos o la presencia de un X delecionado o un isocromosoma X. La incidencia de este síndrome en recién nacidos es de 1 en 2.500 nacimientos;[16] pero la incidencia de la monosomía del X en abortos es mucho mayor, alrededor del 7%, es decir 350 veces mayor que la incidencia en nacimientos. Es manifiesto que la letalidad relativa de la monosomía libre del X es mayor que la de las aberraciones estructurales del X, lo cual justificaría la frecuencia de estas últimas en los sobrevivientes. La letalidad de la constitución 45,X en la vida intrauterina no es fácilmente explicable por el fenotipo de los sobrevivientes que nacen y constituyen el síndrome clínico, por lo cual se supone que el segundo cromosoma sexual desempeña un papel importante en la vida embrionaria temprana.

Por otra parte, el único X presente en fetos 45,X y en pacientes de Turner con 45,X, es materno en el 80% de los casos, y sólo es de origen paterno en el 20% de ellos.[19] Esto significa que el error que dio origen a la enferma con Turner es principalmente una meiosis anormal paterna, lo cual se explica si se tiene en cuenta que el par XY tiene sólo una región homóloga donde puede formarse un quiasma, la región seudoautosómica 1 o principal (véase cap.10). La separación anormal del par XY por déficit del único quiasma posible es entonces el origen de la mayoría de los casos de la monosomía sexual.

Otro aspecto de interés es la presencia típica de la disgenesia ovárica en el adulto. En vez de ovarios existen gónadas vestigiales, desprovistas de ovocitos y folículos, formadas esencialmente por tejido conectivo fibroso. Sin embargo, en el feto 45,X, las gónadas presentan células germinales, es decir, ovocitos.[20] Por consiguiente, se supone que el ovocito 45,X, en la gónada fetal, resulta afectado por factores relacionados con la ausencia del segundo cromosoma sexual y degenera en la época prenatal y perinatal; a su vez, la muerte de los ovocitos llevaría a la desorganización folicular y luego a la fibrosis gonadal. Esta muerte de los ovocitos 45,X parece estar relacionada con la necesidad de ambos X para la meiosis femenina humana (véase cap.12).

Fenotipo en el síndrome de Turner. "Estigmas" del Turner y su patogenia

En las enfermas con este síndrome, además del cuadro general, es posible separar la disgenesia ovárica de los demás signos somáticos o "estigmas" turnerianos. Esto es así porque los "estigmas" pueden presentarse por separado de la disgenesia ovárica, por ejemplo, en varones afectados por el síndrome de Noonan o por el síndrome de Bonnevie-Ulrich. Este síndrome es el observado en el recién nacido, tanto en enfermas con 45,X que luego presentarán el síndrome de Turner en la adultez, como en varones portadores de una deleción del extremo del brazo corto del Y 46,XY del (Yp-Ypter). En el cuadro general de las pacientes con síndrome de Turner, la disgenesia ovárica es fundamental puesto que determina la amenorrea primaria, el infantilismo sexual y la esterilidad. Los genitales externos e internos son femeninos pero infantiles. Los tratamientos hormonales tienen sólo un efecto relativo. Estas pacientes no presentan una disminución significativa del cociente intelectual, aunque sí una gran variabilidad de éste. Las anomalías esqueléticas son diversas: mentón pequeño, esternón en quilla, inclinación del platillo tibial interno, metacarpianos cortos y otras. Mayor gravedad adquieren las posibles malformaciones viscerales, como la coartación aórtica, el riñón en herradura o la duplicación del uréter. Una de las características somáticas fundamentales es la baja estatura (componente de los "estigmas"). Las pacientes no sobrepasan 1,50 m de estatura, y generalmente ésta varía entre 1,30 y 1,40 m. La maduración ósea es normal, de tal modo que la estatura baja parece determinada por un plan de desarrollo anormal. Por lo general, hay implantación baja del cabello y, con frecuencia, pliegues dérmicos laterales en el cuello.

El recién nacido a menudo presenta edemas notables de pies y manos, en tanto que los pliegues cutáneos del cuello suelen ser muy visibles. En los dermatoglifos el trirradio axial está alterado. La cromatina sexual es negativa sólo en las monosomías puras, por lo que no es definitoria.

La patogenia de los estigmas somáticos en el síndrome de Turner parece separable de la patogenia de la disgenesia ovárica. Esta última parece estar relacionada con la actividad de los dos cromosomas X en los ovocitos a partir de la profase meiótica en el feto; la reversión de la lionización del cromosoma X en la línea germinal es específica de los ovocitos (véase cap. 11).

Los genes integrantes de: a) la región seudoautosómica, presentes tanto en el extremo de Xp como en el extremo de Yp (véase cap. 10) y b) los genes del cromosoma X que tienen homólogos en el Y y que no sufren inactivación por parte del gen XIST (véase cap. 11) son candidatos para explicar el fenotipo del síndrome de Turner. Estos genes, tales como el par *RPS4X/RPS4Y* (que codifica la proteína ribosómica S4), al hallarse en estado monosómico en el síndrome de Turner, podrían afectar los rasgos o "estigmas" somáticos.[16,21]

Luego de la identificación del gen *SHOX* en la región seudoautosómica, se inició la definición de los genes responsables del fenotipo turneriano (fig. 17-11).

El fenotipo de los pacientes con isocromosoma Xp y de los que tienen deleción del brazo largo del X no presenta los "estigmas" somáticos del síndrome de Turner, sino solamente la disgenesia ovárica, lo cual concuerda con la hipótesis del papel del gen *SHOX* en ellos. Por otra parte, los casos en los que hay mosaicismo con una línea celular normal se caracterizan por un cua-

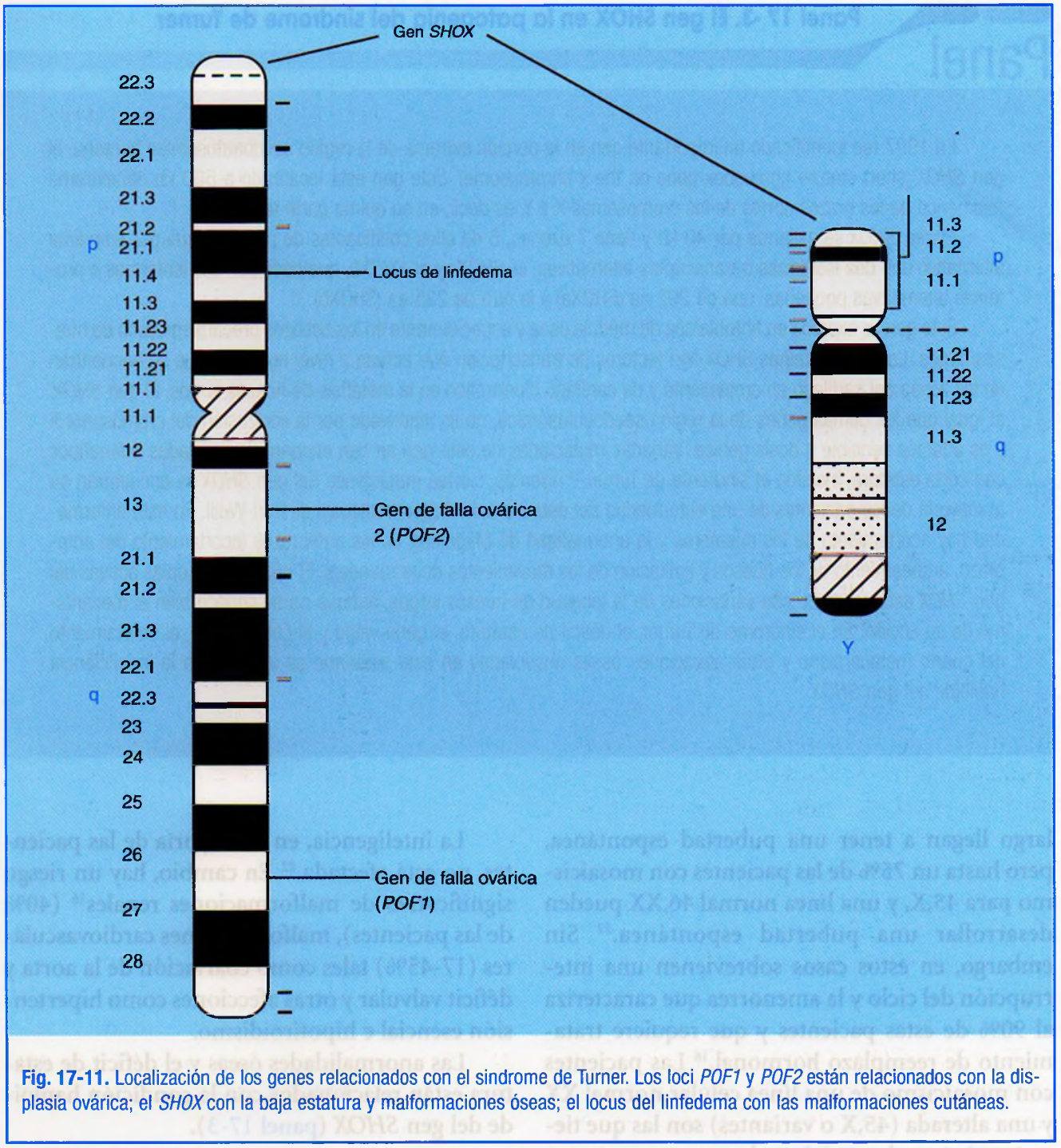


Fig. 17-11. Localización de los genes relacionados con el sindrome de Turner. Los loci *POF1* y *POF2* están relacionados con la displasia ovárica; el *SHOX* con la baja estatura y malformaciones óseas; el locus del linfedema con las malformaciones cutáneas.

dro más atenuado, tanto de la disgenesia ovárica como de los signos somáticos. Hay aproximadamente un 7% de casos de Turner en los cuales hay mosaicismo patente de una línea celular con el cromosoma Y o que presentan un fragmento del cromosoma Y (con deleción de la región del gen de determinación sexual *SRY*).[22] Estos casos deben ser especialmente considerados, porque corren el riesgo de desarrollar un gonadoblastoma en sus gonadas vestigiales (riesgo de hasta el 30% en estos casos),[16] y por consiguiente es necesaria una cuidadosa vigilancia por la posible aparición de signos de virilización.[16]

La insuficiencia ovárica, la estatura y otros rasgos en el síndrome de Turner

Solamente un 5% de las pacientes con monosomía libre del X o con deleción del brazo

Panel 17 -3. El gen SHOX en la patogenia del síndrome de Turner

En 1997 fue identificado un importante gen en la porción extrema de la región seudoautosómica humana, el gen *SHOX* (short stature homeobox gene on the x chromosome). Este gen está localizado a 500 kb del extremo telomérico de los brazos cortos de los cromosomas X e Y, es decir, en su quinta parte terminal.[23]

El gen *SHOX* se extiende por 40 kb y tiene 7 exones, 5 de ellos codificantes de proteína, que por empalme alternativo dan dos isoformas o transcriptos alternativos, el *SHOXa* y el *SHOXb*, que codifican dos isoformas o proteínas alternativas pequeñas, una de 292 aa (SHOXa) y la otra de 225 aa (SHOXb). [24]

Este gen se expresa en fibroblastos de médula ósea y especialmente en los esbozos precartilaginosos de huesos largos. Las dos proteínas SHOX son factores de transcripción que actúan a nivel nuclear y que se encuentran en las zonas del cartílago en crecimiento y de cartílago hipertrófico en la metáfisis de huesos largos. El gen *SHOX*, al igual que los demás genes de la región seudoautosómica, no es inactivado por la lionización del cromosoma X y es además sensible a dosis génica. Variadas mutaciones de este gen se han encontrado asociadas a fenotipos con corta estatura, incluido el síndrome de Turner.[24] Además, ciertas mutaciones del gen *SHOX* se encuentran en la mayoría de los pacientes de una enfermedad del esqueleto, la discondrosteosis de Leri-Weill. En esta enfermedad hay acortamiento de los miembros y la anormalidad de Madelung en los antebrazos (acortamiento del antebrazo, arqueamiento de los huesos y limitación de los movimientos de la muñeca). El número de copias activas del gen *SHOX* está asociado con variaciones de la longitud de huesos largos, aunque no se conoce bien el mecanismo de su acción. En el síndrome de Turner, el déficit de estatura, el genu valgo y el cúbito valgo, el acortamiento del cuarto metacarpiano y otras aleraciones óseas observadas en este síndrome se atribuyen a la insuficiencia haploide del gen *SHOX*.

largo llegan a tener una pubertad espontánea, pero hasta un 75% de las pacientes con mosaicismo para 45,X, y una línea normal 46,XX pueden desarrollar una pubertad espontánea.[22] Sin embargo, en estos casos sobrevienen una interrupción del ciclo y la amenorrea que caracteriza al 90% de estas pacientes y que requiere tratamiento de reemplazo hormonal.[16] Las pacientes con mosaicismo de una línea celular normal XX y una alterada (45,X o variantes) son las que tienen mejor cuadro ovárico y hasta en unos pocos casos pueden quedar embarazadas espontáneamente (93 casos en la literatura,[16] sobre centenares de miles de pacientes) o por fertilización asistida.[16]

La estatura está disminuida aproximadamente un 20% en el 95% de las pacientes con Turner.[22] El tratamiento con hormona de crecimiento recombinante humana, si es hecho tempranamente y ajustado a las dosis y duraciones requeridas, permite una recuperación variable de la estatura, entre 5,3 y 9,7 cm.[22]

La inteligencia, en la mayoría de las pacientes, no está afectada.[22] En cambio, hay un riesgo significativo de malformaciones renales[16] (40% de las pacientes), malformaciones cardiovasculares (17-45%) tales como coartación de la aorta y déficit valvular y otras afecciones como hipertensión esencial e hipotiroidismo.

Las anormalidades óseas y el déficit de estatura están relacionados con la condición haploide del gen *SHOX* (panel 17-3).

Síndrome de Klinefelter. Polisomías del cromosoma X con presencia del Y

El síndrome descrito por primera vez por Harry F. Klinefelter en 1942, como el de Turner, fue presentado antes del desarrollo de la Citogenética Humana, y consiste clínicamente en la asociación de microorquidismo (testículos pequeños), esterilidad con azoospermia, gonadotrofinas (FSH y LH) séricas elevadas,

Cuadro 17-4. Cariotipos observados en el síndrome de Klinefelter y sus frecuencias

Cariotipo	Categoría de la anomalía	C. de Barr*	Frecuencia
47,XXY	Numérica	1	80%
48,XXXY	Numérica (polisomía sexual con crom. Y)	2	
49,XXXXY	Numérica (polisomía sexual con crom. Y)	3	5% (en las polisomías con Y)
48,XXYY	Numérica (pollsomía sexual con crom. Y)	1	
47,XXY/46,XY y otros	Numérica (mosaicismos)	Variable (0,1 o >)	15% (total de mosaicismos)

*Nº de corpúsculos de Barr por núcleo.

ginecomastia y apariencia corporal eunucoide. A partir de 1959, se determinó que por lo general este cuadro está vinculado con el cariotipo 47,XXY, que se encuentra en el 80% de los casos, mientras el 20% restante tiene mosaicismos o polisomías mayores del X (por ejemplo, XXXY) (cuadro 17-4).

La prevalencia de este síndrome es de aproximadamente 1 cada 600 varones nacidos vivos;[25] con respecto a la incidencia global en varones recién nacidos, 1 en 590 tienen cromatina sexual positiva y presumiblemente la casi totalidad son pacientes de este síndrome y sus variantes. Por consiguiente, esta afección es la aberración cromosómica más frecuente en los varones en la especie humana, seguida de la trisomía del cromosoma 21.

La condición más bien benigna de esta afección explica que muchos casos no han sido advertidos ni computados en las estadísticas anteriores, dando la errónea impresión que este síndrome parece incrementarse en frecuencia;[26] cuando es simplemente el resultado de una mayor atención enfocada en este síndrome. Si bien la detección mediante el examen de cromatina sexual es fácil, esta prueba no resulta absolutamente concluyente. El examen del cariotipo es habitualmente el que establece el diagnóstico, que también puede realizarse por técnicas moleculares como la MLPA (véase cap. 3). Otra forma de diagnóstico es la búsqueda del ARN del gen *XIST*, dado que en un varón normal las células no pueden expresar ese gen, cuyo ARN induce la inactivación del cromosoma X.[27]

Es de subrayar que se ha estimado (aun en la actualidad y en países desarrollados) que sólo una cuarta parte de los adultos con este síndrome son diagnosticados[25] y la mayor parte nunca conocen su condición, a menos que concurran a una clínica de fertilidad.

El origen de esta trisomía sexual es mixto, porque el 50% de los casos se origina en la meiosis paterna y el restante 50% en la meiosis materna.[28] El 50% originado en una no disyunción paterna ocurre en la metafase de la primera división meiótica y no guarda relación con la edad paterna. Se ha estimado que el 67,1% de los casos de Klinefelter originados en la meiosis paterna se deben a la falta de un quiasma entre el cromosoma X y el Y (que normalmente debería ocurrir en la región seudoautosómica 1).[28] En cambio, el 50% originado en una meiosis de la madre tiene, en su mayoría, relación con la edad materna, como en las trisomías autonómicas.[28]

La incidencia de este síndrome se eleva de manera considerable entre los varones infértiles (1 en 50) y sobre todo en los azoospérmicos (12 al 20%).[29] Los pacientes con polisomías más numerosas son más raros (en total un 5% de los afectados por el síndrome) y se diferencian del síndrome clásico por varios rasgos fenotípicos. En estos casos, a medida que aumenta el número de cromosomas X, se observa una disminución gradual del coeficiente intelectual, que en pacientes con 49,XXXXY llega a sólo 25-50; además, se asocian malformaciones óseas (sinostosis radioulnar y otras), cardiovasculares y faciales (tipo mongoloide) con una disminución marca-

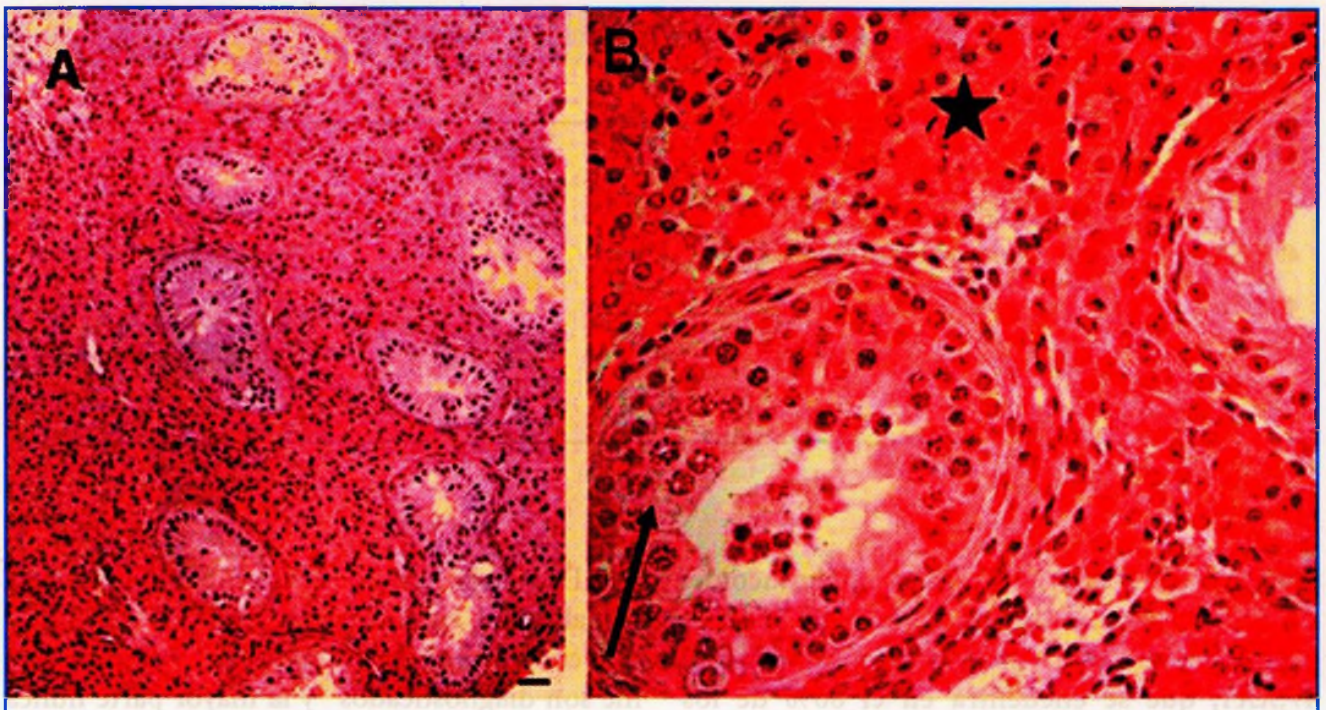


Fig. 17-12. Histología testicular en el síndrome de Klinefelter. **A.** Histología típica que muestra hiperplasia de células de Leydig y túbulos seminíferos solamente con células de Sertoli. **B.** Sector ampliado de una biopsia de un paciente de 33 años, que muestra un túbulo con espermatogénesis (*flecha*) y otro túbulo a la derecha desprovisto de células germinales. Estrella: hiperplasia de células de Leydig (de Sciurano RB, et al., 2009).[30]

da en el recuento de crestas dérmicas en los dermatoglifos.

Fenotipo y patogenia

El signo fundamental es el microorquidismo; el eje mayor del testículo varía entre menos de 1,5 cm y 2,5 cm. La biopsia testicular muestra ausencia de las células germinales, hialinización y engrosamiento de la membrana basal, hiperplasia de células de Leydig, atrofia tubular y fibrosis del estroma (fig. 17-12).

Aunque varios autores señalaron desde 1959 que el testículo de los adultos con este síndrome puede contener algunos "parches" de túbulos seminíferos con espermatogénesis,[30,31] este concepto de nidos residuales de espermatogénesis cayó en el olvido hasta que los especialistas en reproducción asistida comenzaron a hacer pruebas de extracción de espermatozoides a partir de biopsias testiculares y usaron estas células para fecundar ovocitos con la técnica de ICSI (inyección intracitoplasmática de células espermáticas). Estas pruebas fueron exitosas en conseguir embarazos a partir de células de los pacientes.[32] Sin embargo, quedaba un interrogante decisivo para los pacientes: si existía el riesgo de transmitir esta trisomía sexual al feto.[31] Esto se debía a que no se sabía si esa espermatogénesis residual estaba formada por células trisómicas o normales. Varios trabajos apoyaron una u otra de las dos alternativas, hasta que en 2009 se demostró que las células germinales residuales eran euploides, es decir normales, y el riesgo de transmisión era insignificante.[30,33]

La demostración de que las células germinales residuales son euploides, hecha con la técnica de FISH,[30] permitió también dilucidar otro interrogante importante: si las células de Sertoli que acompañan a esta espermatogénesis residual son normales (euploides) o trisómicas. Los resultados fueron evidentes: todas las células de Sertoli son trisómicas sexuales (XXY).[30] De esto se deduce que el defecto que lleva a la muerte de las

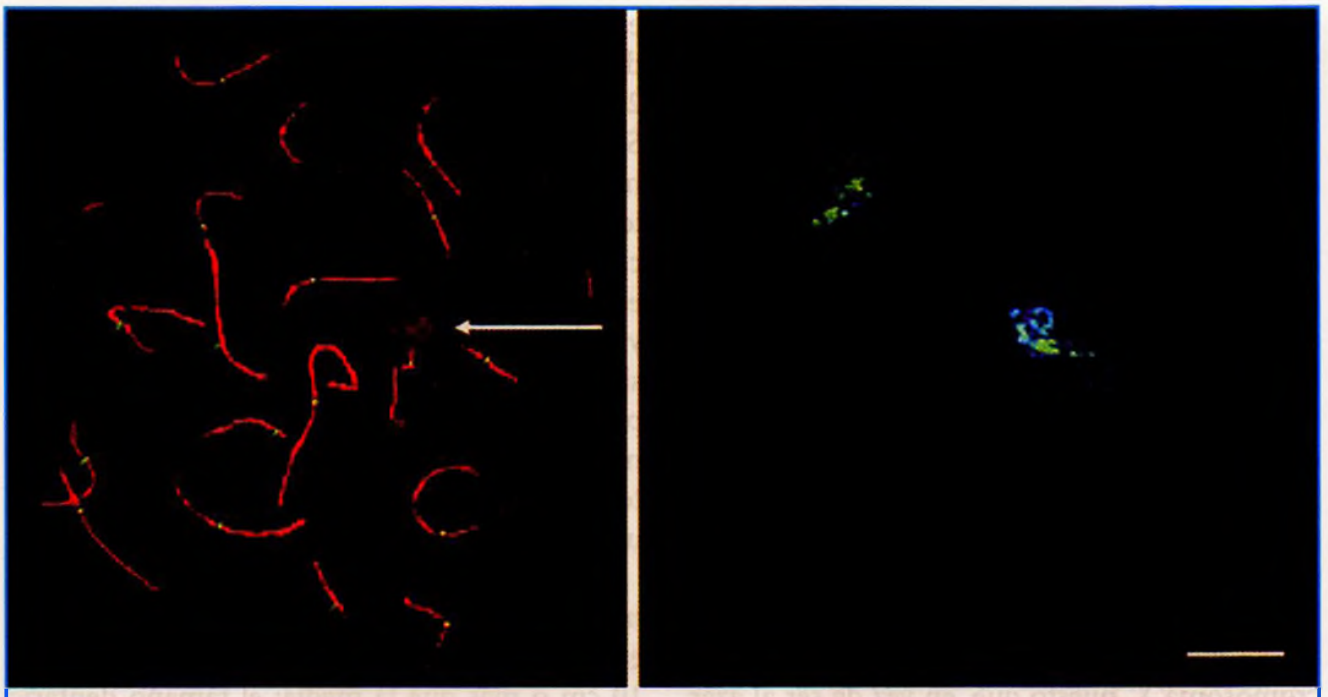


Fig. 17-13. A la izquierda, micrografía por inmunofluorescencia que muestra un espermatocito en paquitene de un paciente con Klinefelter clásico, con los bivalentes marcados con anti SYCP1 (*rojo*) y el único cromosoma X con la señal identificatoria de FISH (*violeta*), es decir, célula euploide, 46,XY. A la derecha, FISH de un núcleo de Sertoli del paciente, que muestra las dos marcas correspondientes a dos cromosomas X (*amarillo verdoso*), es decir, célula 47,XXY (de Sciurano RB, Solari AJ).

células germinales en el síndrome de Klinefelter estriba en su propia constitución cromosómica y no en una anomalía funcional de las células de Sertoli[30] (fig. 17-13).

Como consecuencia de la atrofia germinal y la fibrosis testicular, se elevan las gonadotrofinas del plasma y la consistencia testicular aumenta; otros efectos secundarios son la ginecomastia y la apariencia eunucoide. La patogenia de esta disgenesia testicular está ligada a la presencia de dos cromosomas X en la línea germinal masculina. El microambiente testicular es desfavorable para la supervivencia de células con más de un cromosoma X, tal como se observa también en numerosas especies de mamíferos. El número de células germinales está ya muy disminuido en el momento del nacimiento y se agotan casi totalmente hacia la pubertad. Sin embargo, como se ha comprobado recientemente,[30] un cierto número de espermatogonias euploides, capaces de generar focos de espermatogénesis, permanecen en el testículo. El origen de estas espermatogonias es probablemente un cierto número de no disyunciones mitóticas que ocurrren al azar en las numerosas divisiones espermatogoniales previas a la pubertad y en cada una de las cuales se pierde el segundo cromosoma X, generando una célula euploide.

En el síndrome de Klinefelter hay algunos signos y síntomas secundarios, que probablemente están asociados a la presencia de un cromosoma X adicional en varios tejidos, teniendo en cuenta que, si bien este segundo X está lionizado, tanto los genes de la región seudoautosómica como alrededor de un 10% de los genes de la región diferencial o propia no son inactivados y, por consiguiente, se encuentran en dosis triple. De esta manera se explica que la estatura promedio de los pacientes es mayor que la esperada por el conjunto familiar, lo cual está asociado a la presencia del gen *SHOX* en dosis triple.

Otro signo, de intensidad y aparición variable, es la ginecomastia (agrandamiento de las glándulas mamarias residuales) durante la

pubertad y la etapa pospuberal. Esta ginecomastia indolora se ha observado en el 38% de los pacientes.[34] El fenotipo intelectual no está significativamente alterado en este síndrome, aunque hay anomalías en ciertos aspectos específicos tales como el manejo del lenguaje, en el que hay síntomas parecidos a los de los niños disléxicos.[34] La orientación sexual de los pacientes es la normal, y solamente informan una disminución de la libido en la tercera década de la vida.[34]

Algunos de estos signos adicionales, de tipo cuantitativo, son variables y difíciles de delimitar. El hipogonadismo de estos pacientes ha sido relacionado con una disminución de los niveles séricos de testosterona;[35] pero, por otra parte, se ha subrayado que el gen receptor de andrógenos *AR* se lioniza en forma sesgada en el segundo cromosoma X, puesto que, en vez de ser al azar, hay una prevalencia de la inactivación del alelo que contiene el polimorfismo de tripletes CAGn de menor longitud,[36] lo cual modificaría un número de rasgos andrógeno-dependientes. La estatura, los problemas cognitivos y las alteraciones en los dermatoglifos se exageran notablemente cuando el número de cromosomas X aumenta.

El éxito de la reproducción asistida en pacientes con Klinefelter, estimado en el 50% (103 nacimientos normales hasta 2009), ha puesto en duda la infertilidad clásicamente atribuida a esta afección[37] y ha renovado el interés en su investigación.

Condición XYY de los varones

La condición de trisomía sexual con 47,XYY se conoce desde 1961 y se encuentra en alrededor de 1 cada 1.000 nacimientos. Aparte de su cariotipo y algunos signos menores, no se manifiesta con alteraciones mayores del fenotipo. Sin embargo, en 1965 y con posterioridad, se presumió que los individuos con este cariotipo presentaban una conducta agresiva y eran propensos a la criminalidad por razones genéticas. La base de estas presunciones estribó en haber encontrado una superabundancia de este cariotipo entre presidiarios comparado con la población general. En instituciones penales o para enfermos mentales, o en ambas, la frecuencia de este cariotipo puede llegar al 2% (es decir, 20 veces la frecuencia en la población general). Sin embargo, la frecuencia del síndrome de Klinefelter 47,XXY también está incrementada en los institutos de esa clase, en la misma proporción, sin que se haya observado una agresividad específica en este síndrome. La repercusión social y en los medios de comunicación de esta hipótesis llevó a efectuar estudios de seguimiento en personas 47,XYY detectadas al nacer que, en términos generales, permitieron descartar la hipótesis de la "criminalidad genética" adjudicable a un uso deficiente de la estadística.[38]

El único rasgo somático asociado regularmente a esta condición es la elevada estatura, que empieza a observarse en la niñez, por lo general 10 cm o más que la media; el tamaño dentario también puede estar aumentado. Los dermatoglifos permiten demostrar una disminución del número medio de crestas dérmicas. En forma variable puede haber criptorquidia, acné y sinostosis radiocubital. Hay cierto grado de trastornos de aprendizaje, en especial dificultades con el lenguaje, y hasta un leve descenso del coeficiente intelectual y de las habilidades psicofísicas. Los casos de criminalidad comprenden en su mayoría delitos contra la propiedad y no contra las personas. Es posible que la correlación real exista entre una leve disminución de habilidades apreciadas en la escolaridad y en lo laboral y la comisión de delitos contra la propiedad.

Los dos cromosomas Y son heredados del padre, por lo cual el origen de esta condición puede buscarse en una no disyunción paterna, principalmente en la segunda división meiótica; no existe relación con la edad de los progenitores. Un aspecto de interés es que los varones XYY no tienen tendencia a procrear hijos varones con su cariotipo. La explicación de esta paradoja es que en la línea germinal testicular, las células XYY están sometidas a una selección más estricta que en otros tejidos, puesto que los espermatocitos meióticos parecen ser predominantemente 46,XY, al haber perdido el segundo cromosoma Y, de modo que la condición no es transmisible a la siguiente generación, sino que ocurre "de novo", por una no disyunción del par XY pater-

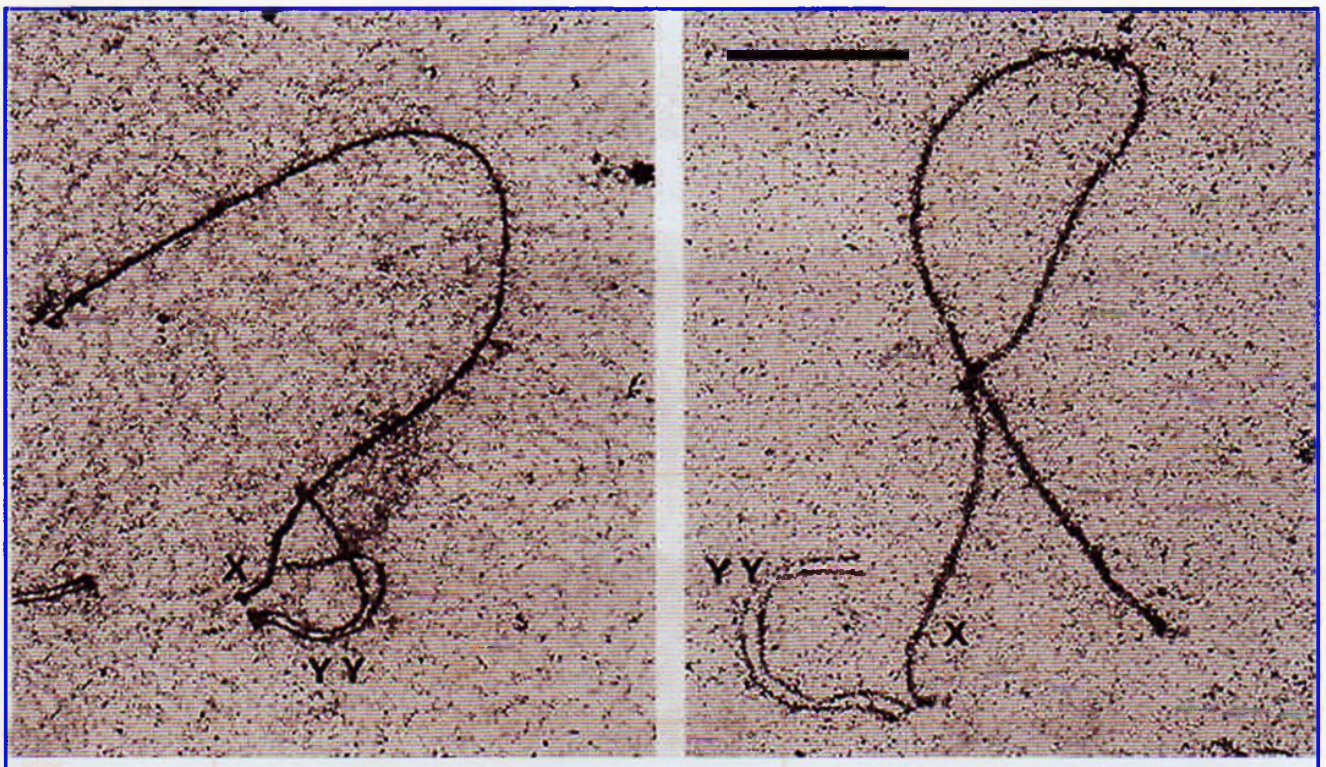


Fig. 17-14. Micrografías electrónicas de los complejos sinaptonémicos en espermatocitos de un hombre 47,XYY. En ambos espermatocitos, un bivalente YY se acerca y contacta al eje del cromosoma X. La meiosis está perturbada y hay un bloqueo en la primera división meiótica (de Solari AJ, Rey Valzacchi G, 1997).[39] Barra = 1 micrómetro.

no. En una proporción mínima, los varones XYY pueden ser infértiles; en estos casos, la línea germinal ha conservado el segundo cromosoma Y, y la meiosis está profundamente perturbada por la presencia de este tercer cromosoma sexual (fig. 17-14).[39]

Trisomía del cromosoma X (47,XXX) y polisomías del X

La trisomía del cromosoma X está en relación marcada con la edad materna; se considera que la mayoría de los casos se origina por no disyunción materna. La edad promedio de las madres de las afectadas es 33 años.[40] La incidencia del cariotipo 47,XXX es de aproximadamente 1 en 1.000,[40] y mucho más raramente se observan la tetrasomía y la pentasomía del cromosoma X, cuyos cuadros somáticos son similares a los de los XXXXY.

Puede subrayarse que al nacimiento no hay signos característicos que sugieran un diagnóstico; solamente hay una ligera reducción del peso y una reducción de la circunferencia cefálica, por lo cual el diagnóstico por análisis del cariotipo es generalmente pedido durante la edad escolar, a causa de la menor aptitud verbal y conductual[40] de las pacientes.

El fenotipo está alterado principalmente en el desarrollo neurológico y psíquico; hay reducción del coeficiente intelectual (en relación con el número de cromosomas X) y leves signos de malformación, entre ellos faciales (hipertelorismo) y esqueléticos. El desarrollo sexual es normal. La fertilidad no está afectada y la transmisión de un cromosoma adicional es improbable, dado que la mayoría de los hijos de las afectadas son normales.

La estatura, a pesar de la existencia de tres regiones seudoautosómicas, no está significativamente aumentada en las afectadas. Dos de los cromosomas X están lionizados en estas pacientes, que presentan dos corpúsculos de Barr en sus células. No está bien comprendido el grado de

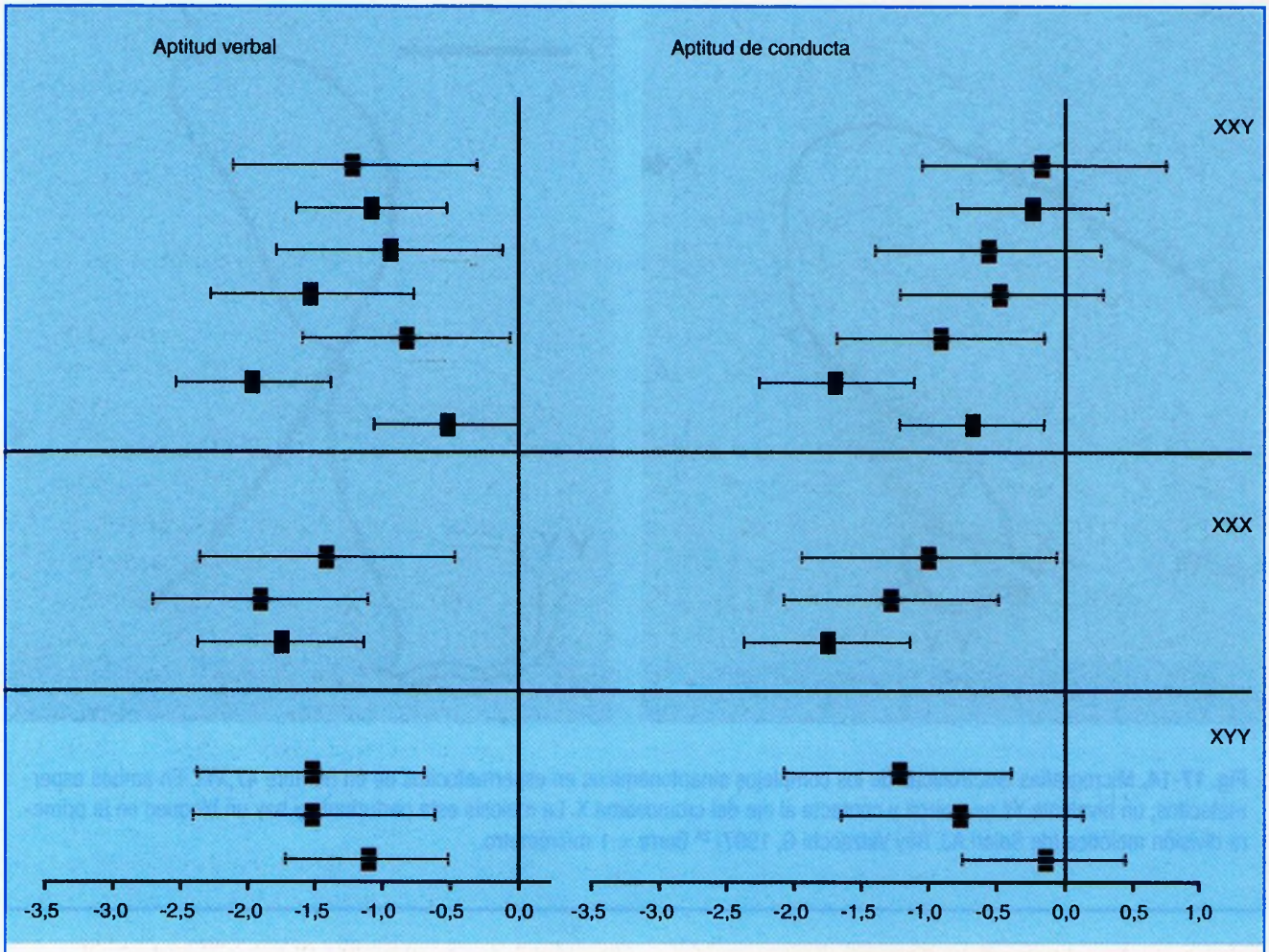


Fig. 17-15. Gráfico de las aptitudes verbales (*izquierda*) y las de comportamiento (*derecha*) en las trisomías sexuales 47,XXY, 47,XXX y 47,XYY. Las líneas verticales muestran el promedio para controles. Las unidades se expresan en fracciones de desviación estándard de los normales. Se observa que, a pesar de una amplia variabilidad, las mujeres 47,XXX son las que tienen un déficit más pronunciado, a pesar de que generalmente trabajan y forman una familia.[40]

sesgo que puede haber en la inactivación de los genes de los dos X adicionales. El grado de déficit de aptitudes verbales y de conducta es mayor en estas mujeres que en los hombres con disomía del Y (47,XYY) y que los afectados por el síndrome de Klinefelter (47,XXY) (fig. 17-15).[41]

RESUMEN

Las cromosomopatías obedecen a anomalías numéricas o estructurales de los cromosomas. Por involucrar grandes bloques de genes, sus efectos fenotípicos son múltiples y variados; muchas de ellas son letales relativas o completas y determinan la muerte del embrión o del feto, por lo cual su incidencia posnatal oscila sólo entre el 0,5 y el 1%. El estudio del cariotipo es básico para la genética humana; las formas, los tamaños y los patrones de bandas de los cromosomas son específicos y constantes.

El estudio del cariotipo se realiza preferentemente con linfocitos de sangre periférica cultivados durante 72 horas y preparados por el método de bandeado G (Giemsa). La hibridación in situ y fluorescencia (HISYF) permite localizar secuencias de ADN (génicas o no) en cada cromosoma con gran precisión, y la síntesis in situ mediante primeros ha extendido las investigaciones moleculares a todas las preparaciones histológicas. La nomenclatura del cariotipo humano y de las cromosomopatías se rige por la convención SINCH. El cariotipo comprende siete grupos (A-D), cada uno de los cuales posee características definibles sin necesidad de bandeado. Las cromosomopatías se clasifican en numéricas y estructurales, cada una con subtipos importantes en Medicina. La más frecuente de las trisomías humanas viables es la del cromosoma 21, que determina el síndrome de Down. El riesgo de procrear un niño con este síndrome es marcadamente proporcional a la edad de la madre, hasta un máximo del 3% en las mayores de 45 años, debido a la tendencia a la no disyunción en la ovogénesis; el 90% de los trisómicos tienen dos cromosomas 21 maternos. La trisomía libre se encuentra en el 95% de los casos, y en el 5% restante hay una translocación robertsoniana, cuya aparición en hijos de portadores tiene riesgos muy superiores, que pueden llegar al 100%. El fenotipo del Down está relacionado con la dosis génica triple correspondiente a la región 21q22.1-22.3, que comprende la llamada "región crítica" para el síndrome de Down. En esta región se encuentran varios genes sensibles a la dosis génica (número de alelos) como el *DYRK1A*, que codifica una quinasa, y el *RCAN1*, que codifica un regulador de la calcineurina. Estos genes sobreexpresados estarían en relación con la reducción del número de sinapsis y de espinas dendríticas y la apoptosis en las neuronas corticales, en especial en zonas relacionadas con la memoria. Las otras dos trisomías mayores corresponden a los síndromes de Edwards y de Patau y son letales. El síndrome de Turner ocurre mayoritariamente por no disyunción del par XY paterno; los embriones 45,X mueren en el 99% de los casos en el útero; los que sobreviven tienen una proporción considerable de anomalías estructurales del X y un 55% tiene monosomía simple del cromosoma X. Los "estigmas" turnerianos tienen relación con el estado monosómico de genes no inactivables del cromosoma X, como los localizados en la región seudoautosómica, en especial el gen *SHOX*, y los genes que no se lionizan en el resto del cromosoma, en especial un locus relacionado con el linfedema y dos relacionados con la falla ovárica prematura. El gen *SHOX* se expresa en las células de los esbozos precartilaginosos de los huesos y en el tejido cartilaginoso; sus mutaciones de truncamiento y deleciones producen la discondrosteosis de Leri-Weill, y en el síndrome de Turner su insuficiencia se relaciona con la corta estatura y defectos óseos. La muerte de los ovocitos está en relación con la ausencia del segundo cromosoma X, un defecto de la meiosis y una consecuente reducción progresiva del número de folículos ováricos.

El síndrome de Klinefelter es la aberración cromosómica más frecuente (1 en 600 recién nacidos varones). Se origina tanto por no disyunción materna como paterna. El microorquidismo es secundario a la degeneración de la línea germinal, que es causada por la incompatibilidad de 2 cromosomas X y el microambiente testicular. Hasta un 50% de adultos con síndrome de Klinefelter tienen nidos o parches remanentes de espermatogénesis, formados por células germinales euploides, capaces de ser usados en fertilización asistida, que permite la paternidad a estos pacientes. La condición 47,XYY no se asocia a criminalidad, sino a exagerada estatura y signos menores. El número anormal de cromosomas X está asociado con un déficit intelectual proporcional al número de estos cromosomas. Las mujeres con trisomía del cromosoma X presentan mayor déficit de aptitudes verbales que los pacientes con otras trisomías sexuales.

REFERENCIAS

1. Tjlo JH, Levan A. The chromosome number in man. Hereditas 1956; 42:1.
2. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. CR Acad Sci (Paris) 1959; 248:1721.
3. Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ. In situ hybridization. A practical guide. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1994.
4. Watt JL, Stephen GS. Lymphocyte culture for chromosome analysis. In: Rooney DE, Czepulkowski BH (eds). Human Cytogenetics, a practical approach. Oxford: IRL Press; 1986:39-55.
5. Saitoh Y, Laemmii UK. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highiy AT-rich scaffold. Cell 1994; 76:609-622.
6. Mori C, Shiota K. Sexing of human embryos and fetuses by fluorescent in situ hybridization (FISH) to paraffinembedded tissues with sex chromosome-specific DNA probes. Am J Med Genet 1994;50:180-186.
7. Swinger RR, Tucker JI. Fluorescence in situ hybridization: a briel review. Exper Molec Mutagen 1995; 27:245-254.
8. Gosden J, Lawson D. Rapid chromosome Identification by oligonucleotide-primed in situ DNA synthesis (PRINS). Mol Hum Genetics 1994; 3:931-936.
9. ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Harnden DG, Klinger HP (eds). Cytogenetics and Cell Genetics. Basel: S. Karger, 1985.
10. Hamerton JL. Cytogenetics of mongolism. In: Hamerton JL (ed). Chromosomes in Medicine. Littie Club Clinics in Develop Medicine Nº 5. London: Heinemann Ltd.; 1962. p. 140-183.
11. De Grouchy J. Clinical cytogenetics. In: Busch H (ed). The Cell Nucleus, vol. II. New York: Academic Press, 1974;371-436.
12. Wiseman FK, Alford KA, Tybulewicz VLJ, Fisher EMC. Down syndrome recent progress and future prospects. Hum Mol Genet 2009;18:R75-83.
13. Belichenko NP, Belichenko PV, Kleschevnikov AM et al. The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological and synaptic phenotypes characteristics of Dowen syndrome. J Neurosci 2009;29:5938-5948.
14. Park J, Oh Y, Chung KC. Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: *DYRK1A* and *RCAN1*. BMB reports 2008;42:6-15.
15. Goc B, Walencka Z, Wloch A, et al. Trisomy 18 in neonates: prenatal diagnosis, clinical features, therapeutic dilemmas and outcome. J Appl Genet 2006;47:165-170.
16. Sybert VP. Turner's syndrome. New Engl J Med 2004; 351:1227-1238.
17. Solari AJ. Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. Boca Raton: CRC Press; 1994.
18. Hook EB, Warburton D. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. Hum Genet 1983;64:24-27.
19. Cockwell A, MacKenzie M, Younings S, Jacobs P. A cytogenetic and molecular study of a series of 45,X fetuses and their parents, J Med Genet 1991;28:151-155.
20. Jirasek J. Principles of reproductive embryology. In: Simpson JL (ed). Disorders of sexual differentiation. New York: Academic Press; 1976. p. 51-111.
21. Lobaccaro JM, Lumbroso S, Belon Ch, Medlej R, Berta PH, Sultan CH. Genes du cromosome Y et syndrome de Turner. Ann d'Endocrinol 1993; 54:323-329.
22. Cabrol S. Le syndrome de Turner. Ann Endocrinol 2007; 68:2-9.
23. Mangs AH, Morris BJ. The human pseudoautosomal region (PAR): origin, function and future. Curr Genomics 2007;8: 129-136.
24. Marchini A, Rappold G, Schneider KU. SHOX at a glance: from gene to protein. Arch Physiol Biochem 2007;113:116-123.
25. Bojesen A, Juul S, Bibekaek N Gravholt CH. Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:622-626.
26. Morris JK, Alberman E, Scott C, Jacobs P. Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? Eur J Hum Genet 2007;1-8.
27. Kleinheinz A, Schulze W. Klinefelter's syndrome new and rapid diagnosis by PCR analysis of XIST gene expression. Andrologia 1994;26:127-129.
28. Thomas NS, Hassold TJ. Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. Hum Reprod Update 2003;9:309-317.
29. van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, et al. Cytogenetics of infertile men. Hum Reprod 1996;11(Suppl 4):1-26.
30. Sciurano RB, Luna Hisano CV, Rahn MI, Brugo OS, Rey Valzacchi G, Coco R, et al. Focal spermatogenesis originates in euploid germ cells in classical Klinefelter patients. Hum Reprod 2009;24:2353-2360.
31. Aksglaede L, Wikstrom AM, Rajpert-De Meyts E, et al. Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. Hum Reprod Update 2005;12:39-48.
32. Paduch DA, Fine RG, Boiyakov A, Kiper J. New concepts in Klinefelter syndrome. Curr Opin Urol 2008;18:621-627.

33. Sciurano RB, Solari AJ. Nuevas perspectivas en el estudio de los bloqueos genéticos de la meiosis en varones infertiles. Rev Arg Androiogía, 2009;18:31-39.
34. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzman M, Nieschiah E. Klinefelter syndrome. Lancet 2004;364:273-283.
35. Wikstrom AM, Dunkel L. Testicular function in Klinefelter syndrome. Horm Res 2008;69:317-326.
36. Zitzman M, Depenbusch M, Gromoll J, Nieschiag E. X-chromosome inactivation patterns and androgen receptor functionality influence phenotype and social characteristics as well as pharmacogenetics of testosterone therapy in Klinefelter patients. J Clin Endocrinol 2004;89:6208-6217.
37. Fullerton G, Maheshwari A, Hamilton M. Should non mosaic Klinefelter's syndrome men be labelled as infertile in 2009? Hum Reprod 2010 (en prensa).
38. Anderson VE. Genes, behavior and responsibility: research perspectives. In: Frankel MS, TEich A (eds). The Genetic Frontier. Ethics, law and policy. Washington: American Association for the Advancement of Science; 1994: 105-130.
39. Solari AJ, Rey Valzacchi G. The prevalence of a YY synaptonemal complex over XY synapsis in an XYY man with exclusive XYY spermatocytes. Chrom Res.1997;5:467-474.
40. Otter M, Schrander-Stumpel CT, Curfs LM. Triple X syndrome: a review of the literature. Europ J Hum Genet 2010;18:265-271.
41. Leggett V, Jacobs P, Nation K, et al. Neurocognitive outcomes of individuas with a sex chromosome trisomy: XXX, XYY or XXY: a systematic review. Dev Med Child Neurol 2010;52: 119-129.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Buyse ML. (ed). Birth Defects Encyclopedia. New York, 1990.

Ogata T, Muroya K, Matsuo N, et al. Turner syndrome and Xp deletions: clinical and molecular studies in 47 patients. J Clin Endocrinol 2001; 86:5498-5508.

Solari AJ, Rahn IM, Ferreyra ME, Carballo MA. The behavior of sex chromosomes in two human X-autosome translocations: failure of extensive X-inactivation spreading. Biocell 2001;25:155-166.

Shaffer JG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. Ann Rev Genet 2000;34:297-329.

Kamischke A, Baumgardt A, Horst J, Nieschlag E. Clinical and diagnostic features of patients with suspected Klinefelter syndrome. J Androl 2003; 24:41-48.

Hulten MA, Patel SD, Westgren M, et al. On the paternal origin of trisomy 21 Down syndrome. Mol Cytogenetics 2010; 3:4-8.

Capítulo 18

Aberraciones cromosómicas estructurales y síndrome del X frágil

Reordenamientos estructurales de los cromosomas. Deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Reordenamientos crípticos. Síndromes del grito de gato y de Wolf-Hirschhorn. Microdeleciones. Microdeleciones del cromosoma Y. Efectos sobre la meiosis masculina. Síndromes de genes contiguos. El síndrome del X frágil. Diagnóstico y patogenia

Las anomalías cromosómicas vistas en el capítulo 17 se corresponden con una parte de las cromosomopatías, las anomalías del número de los cromosomas. En el presente capítulo se resumen las anomalías internas de los cromosomas, es decir, las aberraciones de su estructura, que consisten en variadas formas de reordenamiento de las partes integrantes de un cromosoma y que se clasifican en deleciones o pérdidas de uno de sus segmentos, duplicaciones de segmentos, inversiones del sentido de uno de sus segmentos y translocaciones o intercambio de segmentos (no homólogos) entre cromosomas diferentes. A medida que las técnicas de la citogenética se han perfeccionado y combinado con las de la Genética Molecular, la capacidad de distinguir defectos internos de los cromosomas se ha incrementado hasta llegar casi a superponerse con las técnicas moleculares para la búsqueda de mutaciones génicas.

De esta manera, el campo de estudio de la citogenética humana actual abarca muchas más temáticas que las del estudio del cariotipo mediante el microscopio de luz, que sigue siendo básico, pero ahora es complementado con la hibridación in situ, el análisis comparado con microarreglos y la determinación del número de copias de ADN con la técnica de MLPA (véase cap. 3).[1] Este mayor poder de discriminación de defectos cromosómicos ha llevado a revalorar la presencia de reordenamientos cromosómicos poco perceptibles o imperceptibles por microscopia de luz, especialmente en el área de retraso mental y dismorfias múltiples, y también ha tenido significativa repercusión en el área de la genética de la infertilidad humana.

Por otra parte, el síndrome del X frágil, cuyo origen corresponde principalmente al campo de las mutaciones dinámicas o de expansión de trinucleótidos, se ha convertido en uno de los campos de mayor importancia de la genética médica, dada su prevalencia y la frecuencia de portadores de la premutación, por lo cual será analizado también en este capítulo, puesto que por razones históricas este síndrome está vinculado a los "sitios frágiles" visualizables en cromosomas.

Deleciones o pérdidas de tamaño visibles al microscopio

En principio, las deleciones pueden ser terminales (llegan hasta un telómero) o intersticiales (en el trayecto del cromosoma), pero también pueden clasificarse en *visibles* al microscopio y *crípticas*, porque al no ser detectables al microscopio, su existencia puede inferirse mediante otras fuentes o técnicas de estudio, en especial las técnicas moleculares.

El límite de percepción de las pérdidas al microscopio de luz es de aproximadamente 10 Mb de ADN con las técnicas usuales de bandeado, e incluyendo la técnica de FISH con inmunofluorescencia puede llegar a unas 5 Mb. Por debajo de este límite, se han encontrado numerosos ejemplos de deleciones crípticas o submicroscópicas, que son detectables con microarreglos (véase cap. 6) y otras técnicas moleculares, por lo cual el número de ejemplos de microdeleciones se ha incrementado drásticamente desde el año 2005.[2]

Con las técnicas citogenéticas clásicas se determinó un número más pequeño de deleciones visibles al microscopio que son conocidas desde hace años como los síndromes del grito de gato ("cri du chat") del brazo corto del cromosoma 5, el síndrome de Wolf-Hirschhorn, del brazo corto del cromosoma 4, el síndrome de Di George o velocardiofacial, del brazo largo del cromosoma 22 y el síndrome de Williams-Beuren del brazo largo del cromosoma 7. Algunos de estos ejemplos de deleciones se ven a continuación.

Síndrome del grito de gato (5p)

Este síndrome fue descubierto en 1963, con las técnicas aún primitivas de la citogenética del momento. Tiene un rango de incidencia entre 1:15.000 y 1:50.000 recién nacidos.[3,4] La deleción es de tamaño muy variable, entre 5 Mb y hasta 40 Mb, o sea casi todo el brazo corto.[3,4] El cromosoma 5 delecionado es de origen paterno en el 80% de los casos.[3,4]

El aspecto clínico se distingue primero porque los recién nacidos afectados emiten un sonido de llanto débil, monótono y agudo, similar al maullido suave de un gato.[5] Este grito se origina en las alteraciones de la laringe de estos enfermos: epiglotis disminuida de tamaño, laringe cuadrangular y estrecha, con un espacio aéreo anormalmente disminuido,[5] pero también intervienen las alteraciones funcionales neurológicas. Este tipo de llanto o grito desaparece, si el bebé sobrevive, después del primer año de vida.

Además son notorias las malformaciones faciales: micrognatia (mentón pequeño), puente nasal ancho, pliegues palpebrales anormales, microcefalia y un retraso mental grave con defectos psicomotores, y dermatoglifos anormales, con pliegues de flexión atípicos. A pesar de la gravedad de los signos, que llevan al deceso de la mayoría de estos enfermos en su primer año de vida, los que sobreviven pueden tener una sobrevida larga de hasta 50 años. Se ha observado que a los 3 años pueden caminar sin ayuda y hablan con frases cortas en la edad escolar; son afectuosos y generalmente hiperactivos. El desarrollo sexual es normal. La patogenia de este síndrome se explica por la insuficiencia haploide, en el cromosoma normal, de los genes correspondientes a la zona delecionada. El número de genes involucrados es variable según el tamaño de la deleción, que puede incluir centenares de genes. De todos ellos se distinguen el gen de la semaforina F (*SEMAF*), relacionado con la guía de los axones neuronales en el desarrollo, y el gen de la delta-catenina (*CTNND2*), cuya deleción en el ratón produce signos de déficit neurológico. Se considera que hay una "zona crítica" para este síndrome en el segmento 5p15.2-5p15.3 (fig. 18-1).

El síndrome de Wolf-Hirschhorn

Este síndrome se debe principalmente a deleciones terminales del brazo corto del cromosoma 4, aunque en algunos casos se debe a translocaciones o reordenamientos complejos que involucran esta zona. La deleción de una zona crítica de 200 kb en la banda terminal 4p15.3 es el factor más importante para el desarrollo de este síndrome.[6]

La incidencia de este síndrome es de 1:50.000 nacimientos.[6] Las características clínicas son el retraso de crecimiento, los rasgos faciales (nariz en "casco griego", distancia interocular aumentada, implantación baja de las orejas), el retraso mental y las convulsiones. Adicionalmente, puede haber defectos cardíacos y renales, paladar hendido, hipospadias y colobomas (defectos del iris). La deleción más común ocupa de 5 a 18 Mb de ADN; las deleciones menores dan un fenotipo más benigno y las mayores, de 22 a 25 Mb dan un fenotipo más grave.[6] En estos últimos casos puede haber manos en pinza (ectrodactilia) y otras malformaciones. La zona crítica para este síndrome es la subtelomérica del brazo corto, en la banda 4p16.3, que comprende 1,9 Mb de ADN y que es necesaria y suficiente para el desarrollo de este síndrome. La patogenia de esta enfermedad es la insuficiencia haploide de los genes ubicados en la región crítica, pero la identificación de los genes correspondientes a cada una de las anormalidades fenotípicas no está aún disponible.

Las microdeleciones y microduplicaciones

La incorporación de la hibridación genómica comparativa por medio de microarreglos ha producido el descubrimiento de nuevos y numerosos reordenamientos submicroscópicos.[7,8] Entre las nuevas microdeleciones halladas se encuentran las localizadas en los siguientes sitios: cromosoma 17q21.31 (OMIM 610443); cromosoma 3q29 (OMIM 609425; cromosoma 15q24; cromosoma 1q41q42; cromosoma 2p15p16.1; cromosoma 9q33.3, y cromosoma 15q13.3 (OMIM 612001). Estas microdeleciones son solamente algunos ejemplos de las muchas detectadas. El problema actual es caracterizar clínicamente el fenotipo representativo de cada microdeleción y asignar funciones a los posibles genes afectados. Sin embargo, algunas generalizaciones son posibles: las tres primeras dentro de las citadas más arriba fueron halladas en un grupo caracterizado por retraso mental grave e hipotonía en la época perinatal; las cuatro citadas después fueron encontradas entre niños que, además

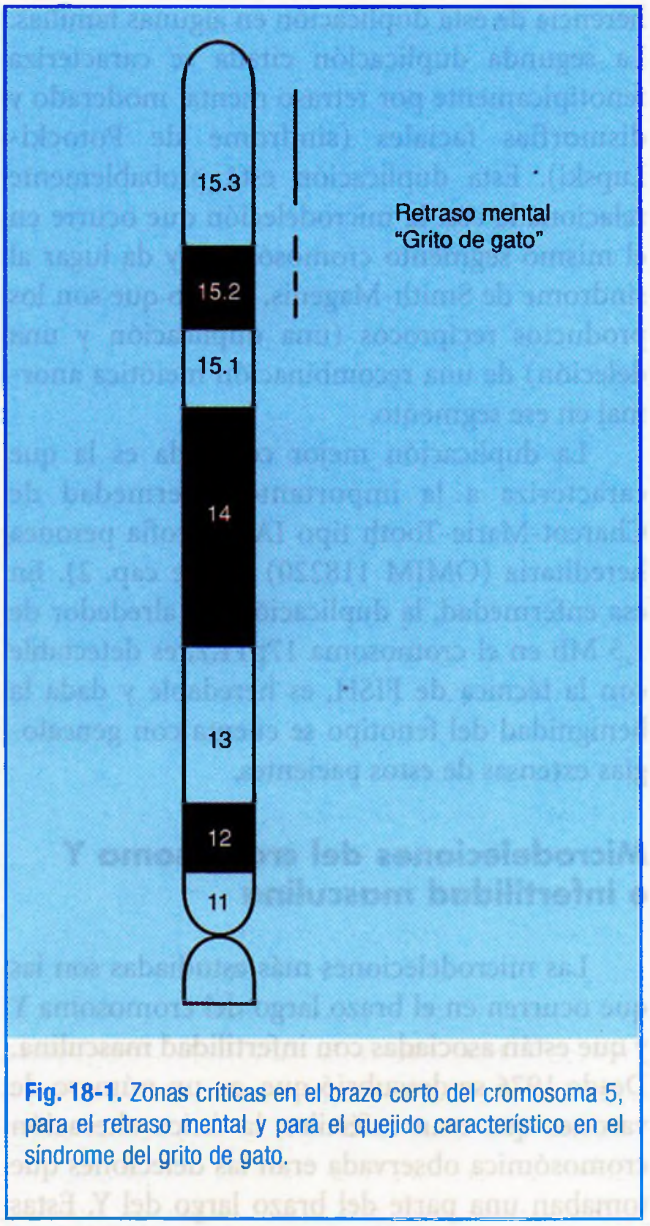


Fig. 18-1. Zonas críticas en el brazo corto del cromosoma 5, para el retraso mental y para el quejido característico en el síndrome del grito de gato.

de retraso mental, presentaban diversas malformaciones. Es factible que en algunos años se cuente con una individualización de cada tipo de microdeleción, pero por ahora lo que es significativo para los pediatras y los neonatólogos es que los niños con retraso mental y/o malformaciones múltiples de origen desconocido son candidatos para la búsqueda de microdeleciones, microduplicaciones y reordenamientos crípticos.

Las microduplicaciones también son detectadas con microarreglos; entre ellas las localizadas en el cromosoma 22q11.2 (OMIM 608363) y la localizada en el cromosoma 17p11.2 (OMIM 610883, síndrome de Potocki-Lupski). La primera se caracteriza por retraso mental, dificultades en el lenguaje y dismorfias faciales; se observó la

herencia de esta duplicación en algunas familias. La segunda duplicación citada se caracteriza fenotípicamente por retraso mental moderado y dismorfias faciales (síndrome de Potocki-Lupski). Esta duplicación está probablemente relacionada con la microdeleción que ocurre en el mismo segmento cromosómico y da lugar al síndrome de Smith-Magenis, puesto que son los productos recíprocos (una duplicación y una deleción) de una recombinación meiótica anormal en ese segmento.

La duplicación mejor conocida es la que caracteriza a la importante enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo IA o atrofia peronea hereditaria (OMIM 118220) (véase cap. 2). En esa enfermedad, la duplicación, de alrededor de 1,5 Mb en el cromosoma 17p11.2, es detectable con la técnica de FISH, es heredable y dada la benignidad del fenotipo se cuenta con genealogías extensas de estos pacientes.

Microdeleciones del cromosoma Y e infertilidad masculina

Las microdeleciones más estudiadas son las que ocurren en el brazo largo del cromosoma Y y que están asociadas con infertilidad masculina. Desde 1976 se descubrió que, en un número de varones que eran infértiles, la única alteración cromosómica observada eran las deleciones que tomaban una parte del brazo largo del Y. Estas deleciones grandes, frecuentemente tomaban una gran parte de la región de heterocromatina constitutiva del Yq terminal, que no se transcribe y que es polimórfica en la población general, y cuya presencia o ausencia no entraña cambios fenotípicos, pero a veces esas grandes deleciones abarcaban también un sector de la eucromatina de Yq, y entonces estaban asociadas con infertilidad, por lo que se supuso la presencia en la eucromatina de Yq de un factor o locus denominado AZF (factor de azoospermia). Con la refinación de las técnicas se pudo constatar que deleciones más chicas, que abarcaban segmentos eucromáticos de Yq estaban igualmente asociadas a infertilidad. Esas deleciones son frecuentemente microdeleciones, detectables con FISH y actualmente con microarreglos y son clasificadas según los segmentos que ocupan: AZFa, en un segmento cercano al centrómero, AZFb y AZFc en segmentos cercanos al límite de la heterocromatina (Yqh). Cada una de las microdeleciones está asociada con un fenotipo reproductivo: las del segmento AZFa se asocian con el síndrome de células de Sertoli solas (desaparición de las células germinales) y azoospermia completa; las del segmento AZFb con el mismo síndrome de Sertoli solo o con oligospermia grave, y las del segmento AZFc se asocian con un fenotipo variable, porque pueden encontrarse en hombres fértiles y también en varones con oligospermia (fig. 18-2).[9,10]

La región eucromática del Yq contiene amplias regiones de elementos repetidos, formados por secuencias nucleotídicas prácticamente iguales en cada una de las familias de "amplicones", como se denominan estas secuencias repetidas, que contienen al menos nueve genes de proteínas. Las regiones de amplicones contienen a su vez ocho segmentos que estructuralmente son palindrómicos, porque cada palindrome contiene en foma simétrica, los mismos amplicones de un lado y del otro, en orden invertido, es decir que en los segmentos palindrómicos (1 al 8) los amplicones pueden leerse igual de derecha a izquierda y viceversa.[11]

Las microdeleciones AZF se observan en entre el 5 y el 10% de los varones infértiles, y entre los varones azoospérmicos se encuentran hasta en el 16%, de modo que son uno de los factores significativos en la esterilidad masculina.[10] Estas deleciones son casi siempre de novo, es decir, que ocurren por primera vez en los progenitores de los afectados, pero son *recurrentes*, es decir, tienden a repetirse y aparecer nuevamente, lo cual está relacionado con la peculiar estructura de elementos de secuencia igual y repetidos en el Yq. Dada la recurrencia de estas microdeleciones, se han establecido sondas de diagnóstico molecular (por FISH generalmente) para cada uno de los segmentos AZFa, AZFb y AZFc, que son aplicadas rutinariamente para el diagnóstico en varones infértiles. Las microdeleciones del segmento AZFc son las más frecuentes (60% del total), le siguen las del segmento AZFb (16%), luego las deleciones mixtas de los subsegmentos

b y c, y las menos frecuentes son las del segmento AZFa (2% a 5%).[10]

Hay 14 genes de proteínas localizados en los segmentos AZF.[9] Sin embargo, no está bien establecido cuáles de ellos intervienen en la esterilidad masculina y a través de qué mecanismo; una de la dificultades es que estos genes están en amplicones y entonces se hallan repetidos y es difícil establecer cuántas copias génicas están anuladas. El número de copias de cada uno de estos genes varía de 1 a 6, de modo que se supone que hay una redundancia funcional en la mayoría de estos genes.[9]

El resultado de las microdeleciones AZF del cromosoma Y es más severo en el segmento AZFa, en el cual desaparece la línea germinal, y menos en los otros dos segmentos; las deleciones parciales del AZFc pueden ser un polimorfismo normal (fig. 18-3).

Síndromes de genes contiguos

Como se ha visto, las microdeleciones pueden afectar variado número de genes, según el tamaño del segmento perdido y su ubicación. El resultado aparenta ser el producto de mutaciones simultáneas de varios genes, aunque su origen sea una única aberración cromosómica; por eso se han denominado *síndromes de genes contiguos* a aquellos fenotipos resultantes de una deleción o una duplicación de varios genes diferentes y contiguos, que son variables en cada uno de sus signos y síntomas, según la extensión de la aberración cromosómica. Los síndromes de Wolf-Hirschhorn y el del grito de gato son dos ejemplos, pero hay varias decenas adicionales, por ejemplo el síndrome WAGR (tumor de *W*ilms, *a*niridia, *g*enitales anormales, *r*etraso de desarrollo), producido por una deleción de variable extensión en el cromosoma 11p13 y en la cual pueden estar afectados varios importantes genes como el *WT1* (tumor renal de Wilms), el gen de desarrollo embrionario *PAX6* (aniridia) y otros genes adicionales relacionados con el retraso mental. Otros ejemplos son el síndrome de Di George o velocardiofacial, que es originado generalmente por una deleción recurrente de 3Mb ubicada en el cromosoma 22q11.2 o por una

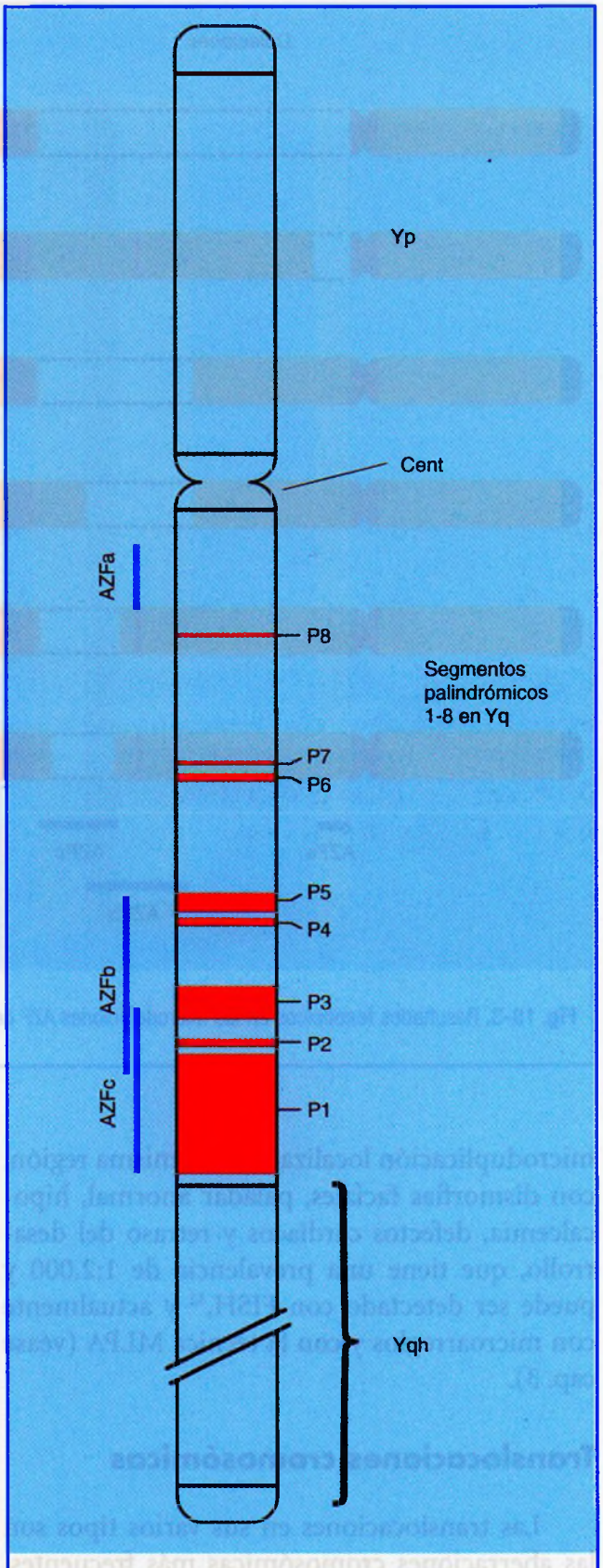


Fig. 18-2. Ubicación de los segmentos AZFa, AZFb y AZFc (azul) en el brazo largo del cromosoma Y. CENT: centrómero del Y; P1-P8 segmentos palindrómicos 1 al 8 que contienen amplicones dispuestos en palindromes. Yqh: segmento terminal de heterocromatina del Y.

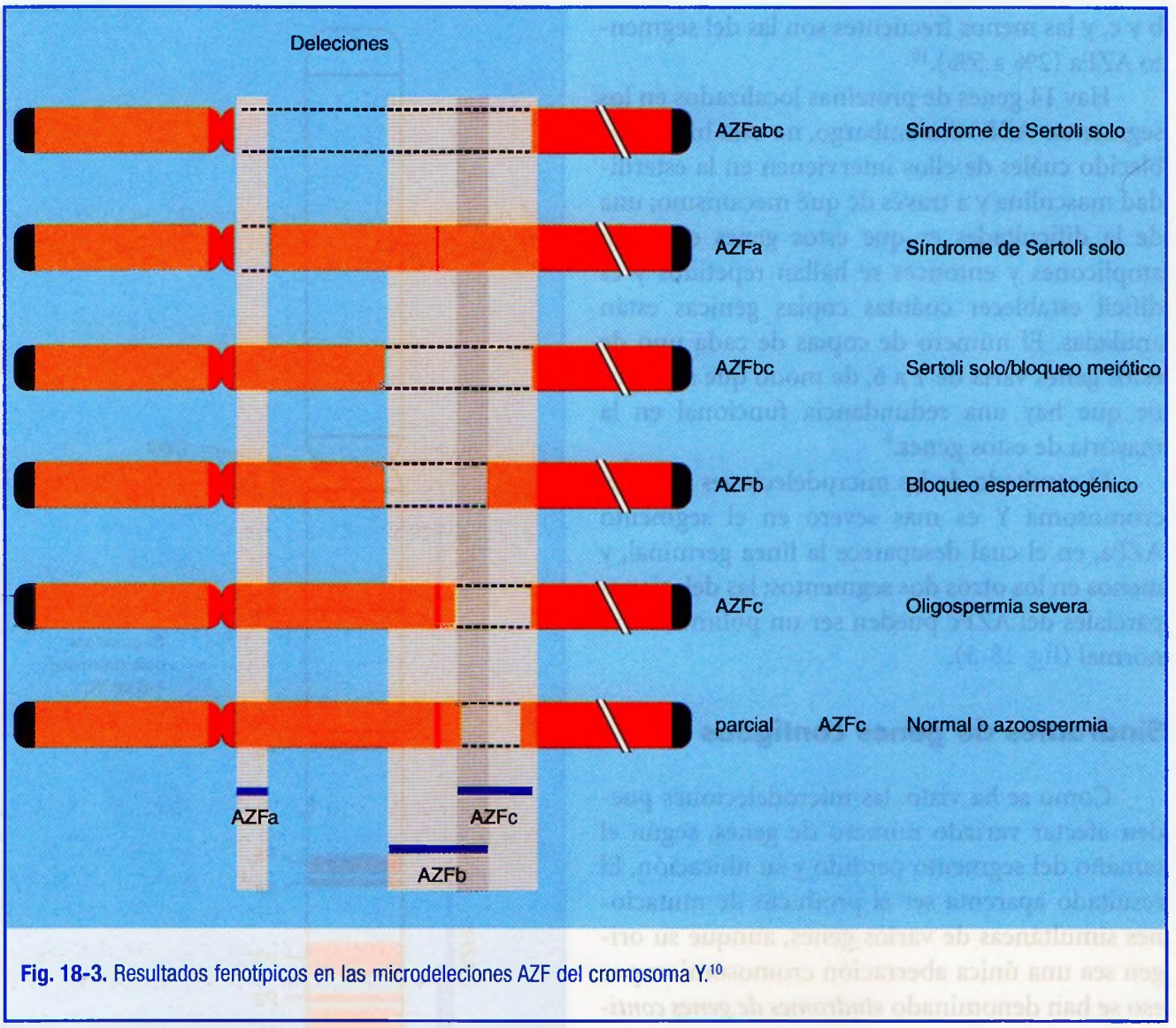


Fig. 18-3. Resultados fenotípicos en las microdeleciones AZF del cromosoma Y.[10]

microduplicación localizada en la misma región, con dismorfias faciales, paladar anormal, hipocalcemia, defectos cardíacos y retraso del desarrollo, que tiene una prevalencia de 1:2.000 y puede ser detectado con FISH,[12] y actualmente con microarreglos y con la técnica MLPA (véase cap. 3).

Translocaciones cromosómicas

Las translocaciones en sus varios tipos son las aberraciones cromosómicas más frecuentes. Las repercusiones fenotípicas de las translocaciones son muy variables, y en las translocaciones "balanceadas" pueden no expresarse en el fenotipo. Sin embargo, las translocaciones en general afectan la fertilidad en forma pronunciada.

Las translocaciones, que son intercambios de segmentos entre cromosomas no homólogos, se clasifican en *robertsonianas* (del nombre del citogenetista W. R. Robertson) y en *recíprocas*. Las translocaciones robertsonianas involucran específicamente un par cualquiera de los cinco cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21, 22). Las más frecuentes son las translocaciones entre un cromosoma 13 y uno 14, rotuladas t(13q;14q) o rob(13q;14q) (fig. 18-4).

El origen de la translocación ocurre en la meiosis de un progenitor (como la mayoría de los reordenamientos) y en el caso de las más frecuentes, como la t(13q;14q) y la t(14q;21q) los puntos de ruptura son muy regulares:[13] en ambos casos se pierde un fragmento acéntrico que sólo contiene heterocromatina (satélites) y

organizadores nucleolares, por lo cual no tiene expresión en el fenotipo cuando es *balanceada*, es decir, cuando no involucra la pérdida o aumento de eucromatina.

Las translocaciones robertsonianas tienen una incidencia de alrededor de 1:1.000[13] y la gran mayoría son balanceadas, es decir que el portador no sospecha de su presencia; sin embargo, pueden incidir en la fertilidad del portador.

Las translocaciones robertsonianas que involucran el cromosoma 21 también son mayoritariamente silenciosas, pero sus portadores pueden dar lugar a hijos que tengan el síndrome de Down, como se ha visto en detalle en el capítulo 17.

Las translocaciones *recíprocas* son un poco menos frecuentes que las robertsonianas, e igual que ellas, sus portadores no conocen su condición hasta que un poblema reproductivo los lleva a hacerse un diagnóstico de laboratorio. Las translocaciones no balanceadas se observan raramente excepto en abortos y en recién nacidos con malformaciones múltiples; esto es explicable porque una translocación no balanceada da lugar a trisomías o monosomías parciales, las cuales son de graves efectos fenotípicos y están muy limitadas por la selección natural.

Por otra parte, las translocaciones recíprocas balanceadas, al igual que las robertsonianas, alteran el desarrollo de la meiosis en los portadores inaparentes y son una fuente significativa de infertilidad en el varón.

La presentación de una translocación como balanceada o no balanceada depende de la segregación del cuadrivalente durante las divisiones meióticas: solamente el tipo de segregación "alternado" puede producir gametos sin riesgo de dar una translocación no balanceada, mientras que los dos tipos de segregación "adyacente" dan gametos desbalanceados.

Producción del estado balanceado y no balanceado de las translocaciones

Cuando en un portador inaparente de una translocación balanceada las células germinales entran en la profase meiótica, se produce el apareamiento de las regiones homólogas, es decir, la sinapsis con sus complejos sinaptonémicos (véase cap. 12).

Al haber un producto que tiene partes de un cromosoma y partes de otro, se forma en el paquitene un *multivalente*, una asociación sináptica de los cromosomas normales y el (o los) producido por la translocación. En una translocación robertsoniana, como la representada en la figura 18-4, la t(13q;14q), se producirá un triva-

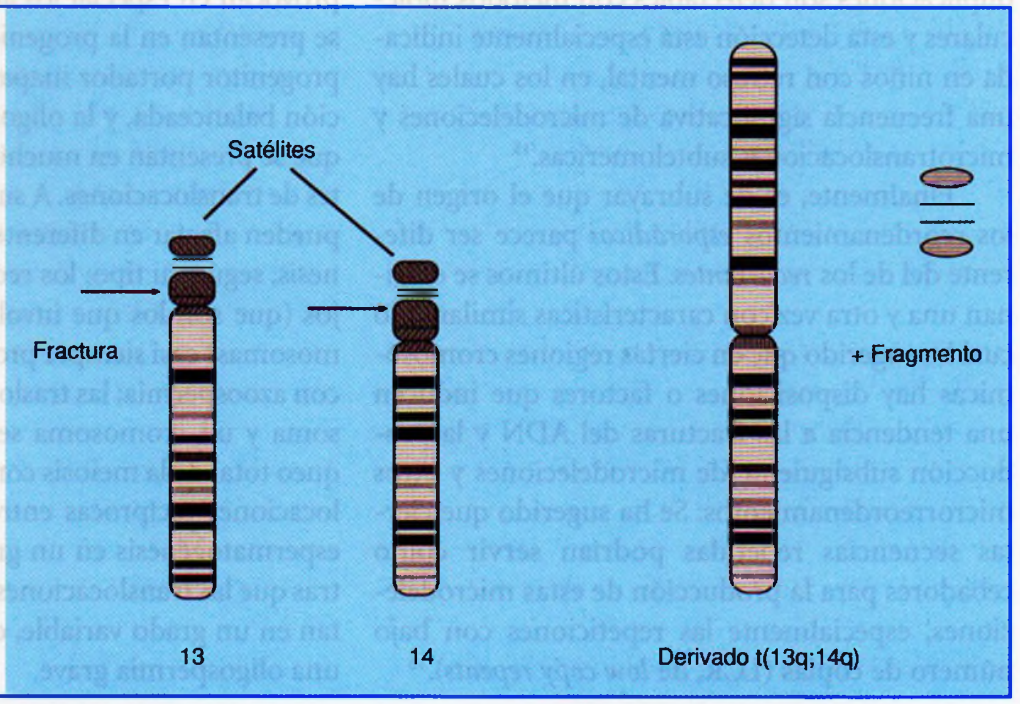


Fig. 18-4. Esquema de la formación de la translocación robertsoniana t(13q;14q). Los puntos de ruptura están señalados por flechas y ocurren en el comienzo (proximal) de los brazos cortos. El cromosoma derivado contiene los dos centrómeros en esta translocación, que funcionan como uno solo. El fragmento formado por los satélites y los organizadores nucleolares se pierde sin afectar el fenotipo.

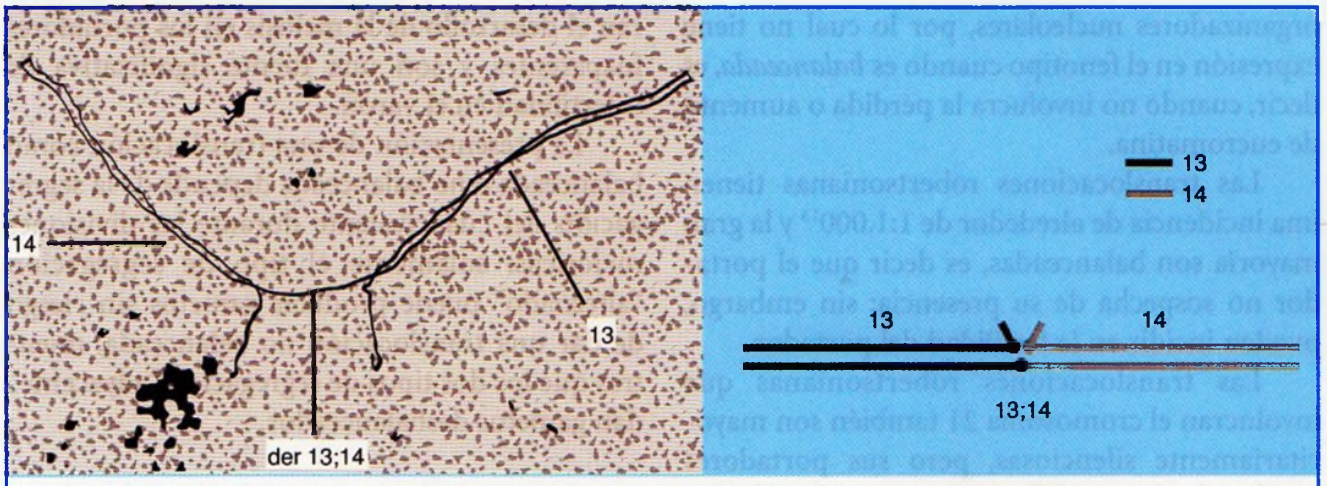


Fig. 18-5. Trivalente de un paciente con translocaión t(13q;14q), micrografía con microscopia electrónica. Los brazos cortos del 13 y del 14 no están apareados. A la derecha, esquema del trivalente (de Solari AJ, 1999).[14]

lente, formado por los dos cromosomas normales 13 y 14, y el derivado de la translocación, que se observan en la figura 18-5.[14]

Estos multivalentes, en la anafase de la primera división meiótica, pueden segregar hacia los polos de tres maneras, como muestra la figura 18-6.

Aunque las translocaciones no balanceadas son generalmente raras y letales, las translocaciones crípticas o submicroscópicas, detectables con microarreglos, a menudo son viables dado el pequeño tamaño de la región monosómica o trisómica a que dan lugar. Estas microtranslocaciones, que dan lugar a microdeleciones y microduplicaciones son detectables con métodos moleculares y esta detección está especialmente indicada en niños con retraso mental, en los cuales hay una frecuencia significativa de microdeleciones y microtranslocaciones subteloméricas.[15]

Finalmente, es de subrayar que el origen de los reordenamientos *esporádicos* parece ser diferente del de los *recurrentes*. Estos últimos se originan una y otra vez con características similares, lo cual ha sugerido que en ciertas regiones cromosómicas hay disposiciones o factores que inducen una tendencia a las fracturas del ADN y la producción subsiguiente de microdeleciones y otros microrreordenamientos. Se ha sugerido que ciertas secuencias repetidas podrían servir como cebadores para la producción de estas microdeleciones, especialmente las repeticiones con bajo número de copias (LCR, de *low copy repeats*).[16]

Efectos de los reordenamientos sobre lo meiosis masculina

Casi todos los tipos de reordenamientos cromosómicos visibles al microscopio afectan desfavorablemente la meiosis masculina y determinan un grado variable de hipofertilidad o de infertilidad.[17] Las deleciones y duplicaciones, por sus severos efectos fenotípicos en general, no permiten acceder a la edad reproductiva. Las translocaciones balanceadas, en cambio, y en menor grado las inversiones, que presentan portadores inaparentes, son el origen de perturbaciones meióticas, que provocan en especial los abortos a repetición que se presentan en la progenie de una pareja con un progenitor portador inaparente de una translocación balanceada, y la oligospermia o azoospermia que se presentan en muchos portadores inaparentes de translocaciones. A su vez, las translocaciones pueden afectar en diferente grado la espermatogénesis, según su tipo: los reordenamientos complejos (que son los que involucran más de dos cromosomas) casi siempre provocan un bloqueo total con azoospermia; las traslocaciones entre un autosoma y un cromosoma sexual provocan un bloqueo total de la meiosis con azoospermia; la translocaciones recíprocas entre autosomas afectan la espermatogénesis en un grado intermedio, mientras que las translocaciones robertsonianas la afectan en un grado variable, desde casi normal hasta una oligospermia grave.

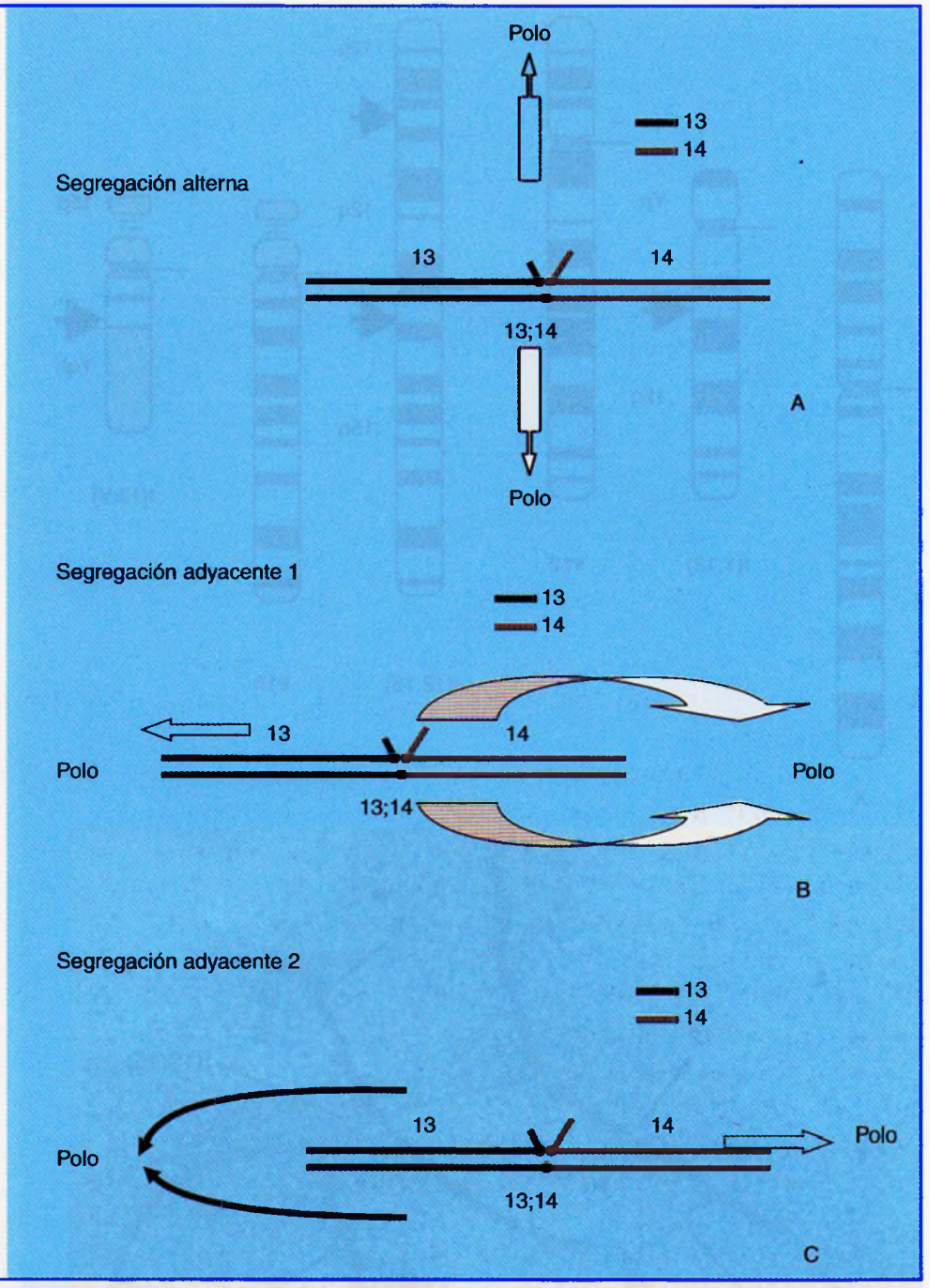


Fig. 18-6. Esquema de los tres tipos de segregación de un multivalente (trivalente) en la anafase meiótica. Solamente el tipo "alternada" puede dar gametos para cigotos con translocación "balanceada" porque no presentan duplicaciones ni pérdidas.

Los reordenamientos complejos (fig. 18-7) en la profase meiótica producen pentavalentes o hexavalentes, cuya segregación es difícil, pero ya en el paquitene los espermatocitos entran en apoptosis y se bloquea la espermatogénesis.

Mucho más comunes son los portadores de translocaciones robertsonianas y recíprocas, en las cuales se bloquea la profase meiótica por un mecanismo que sólo fue dilucidado recientemente.[19]

Desde la década de 1970 se observó que los espermatocitos de los portadores de translocaciones mostraban un acercamiento y aparente unión de los multivalentes con el cuerpo XY (véase cap. 12). Este "efecto Forejt" (por el nombre del citogenetista checo J. Forejt) sugería que la apoptosis de los espermatocitos estaba relacionada con ese hecho, pero no había una explicación de su mecanismo.

En 2007 se demostró que las regiones asinápticas (no apareadas) de los multivalentes compartían con el cuerpo XY la presencia de la histona variante gammaH2AX.[19]

Los multivalentes tienen prominentes regiones asinápticas, por ejemplo en la translocación

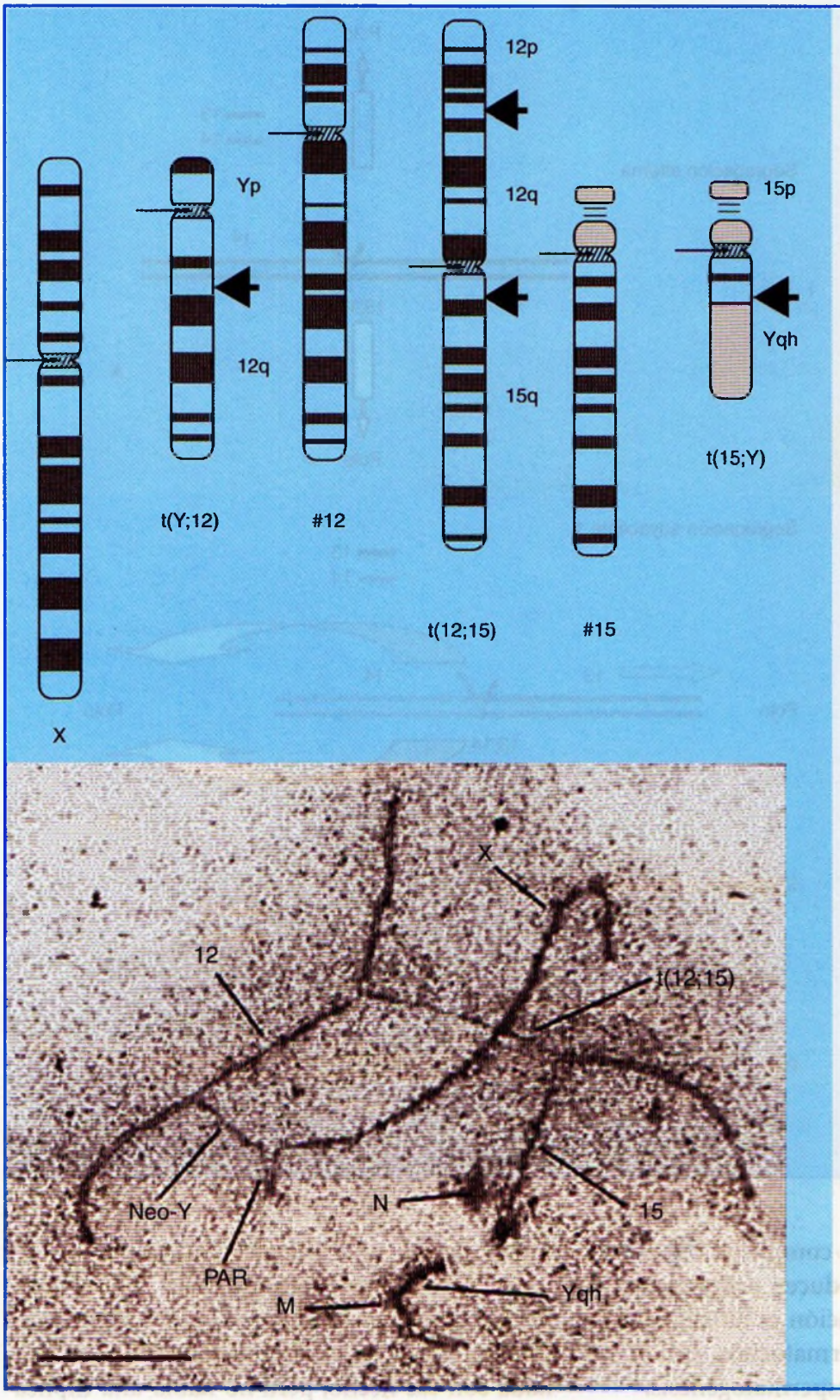


Fig. 18-7. Los cromosomas de un reordenamiento complejo que involucra a los cromosomas 12, 15 y el Y (arriba; los puntos de ruptura están señalados por flechas). Abajo, el pentavalente formado durante el paquitene (de Coco R, et al, 2004).[18]

t(13q;14q) los brazos cortos son asinápticos en el paquitene temprano (véase fig.18-5). Un hecho similar se observa en la región central de los cuadrivalentes.[20]

Esta proteína compartida en el cuerpo XY y en las regiones no apareadas de los cromosomas de los multivalentes dio la clave del fenómeno de Forejt y permitió explicar la acción perjudicial de las translocaciones sobre la meiosis: la proteína gamma H2AX es característica de la remodelación de la cromatina, para convertirse en "silenciada" para la transcripción.[19] A su vez, el fenómeno de

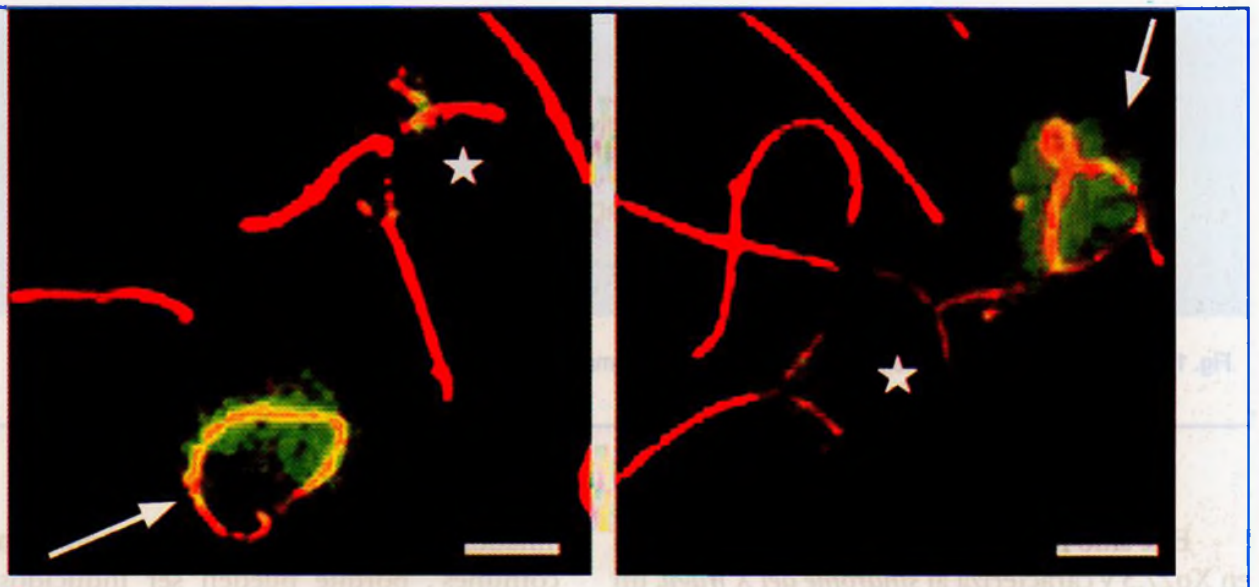


Fig. 18-8. Presencia de la variante histónica gammaH2AX en el cuerpo XY (flechas blancas) y en las regiones asinápticas del cuadrivalente de una traslocación (estrella blanca). A la izquierda, paquitene temprano, el cuerpo XY y el cuadrivalente todavía separados. A la derecha, un estadio más avanzado, donde hay contacto del cuadrivalente con el cuerp XY. Inmunolocalización de proteínas: en verde: gammaH2AX; en amarillo, proteína BRCA1; en rojo, SYCP1 (*synaptonemal complex-protein 1*) para marcar los segmentos sinapsados (de Sciurano RB, et al., 2007).[19]

Forejt es simplemente el agrupamiento de las regiones "silenciadas" en el mismo compartimento nuclear, en un núcleo que normalmente es muy activo en la transcripción excepto en el cuerpo XY, durante el estadio paquitene[19] (fig. 18-8).

De esta manera, se explica el deterioro del espermatocito, porque las regiones que quedan sin aparearse son silenciadas, cuando en la célula normal transcriben activamente. Hay, por consiguiente, una depleción de ARNm necesario para la síntesis de proteínas específicas de ese estadio meiótico. Por otra parte, la variabilidad de los efectos deletéreos sobre el espermatocito en diferentes translocaciones está dada por la extensión variable, en cada una de ellas, de las regiones cromosómicas que quedan sin aparearse. Además, la presencia de la proteína de reparación del ADN, BRCA1 (véase cap. 8) en los ejes de las regiones asinápticas (véase fig. 18-8) sugiere que las regiones asinápticas están silenciadas a partir de una alteración (falta de apareamiento) de su función normal.[19]

En resumen, las translocaciones operan en forma perjudicial sobre las funciones reproductivas, en parejas que no sospechan las razones de su infertilidad, por dos mecanismos: primero, la meiosis en el varón se ve perturbada en un grado variable, pero a menudo grave, lo que se traduce en oligospermia o en azoospermia, y, segundo, en aquellas translocaciones balanceadas que permiten el avance de la meiosis, la segregación de los cromosomas de un multivalente sólo permite la formación de gametos con un conjunto de cromosomas normal cuando es de tipo alternado (véase fig. 12-6), pero en los dos tercios de los casos de segregación (de tipo adyacente) se forman gametos que inevitablemente darán lugar a trisomías y monosomías de segmentos cromosómicos, lo cual es la razón de abortos reiterados en estas parejas.

El síndrome del X frágil

Este importante síndrome fue detectado primero citológicamente, como un aparente sitio en la región distal del brazo largo del cromosoma X, que aparecía como segmentado a ese nivel, en las células cultivadas para realizar el cariotipo, y asociado a un importante retraso mental en los pacientes. En realidad, este síndrome no se debe a una anomalía cromosómica sino a una mutación de expansión de trinucleótidos repetidos (véase cap. 8) que determina el déficit de transcripción del gen *FMR-1* y en consecuencia la falta de su proteína respectiva, la FMR-1P.

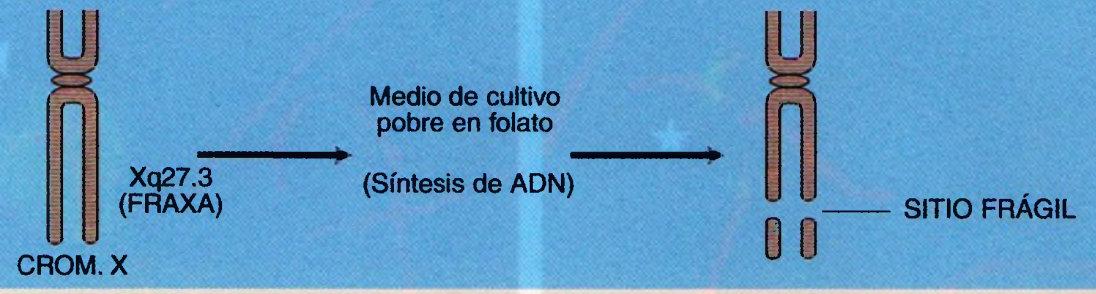


Fig. 18-9. Esquema de la expresión del sitio frágil del cromosoma X, FRAXA.

Este sitio frágil sensible a folatos se encuentra en Xq27.3 y caracteriza al *síndrome del X frágil*, un síndrome de retraso mental importante. Un sitio frágil es una región o banda cromosómica que, en ciertas condiciones del medio de cultivo celular, aparece como una interrupción no coloreada. A partir de esa interrupción, se pueden generar fragmentos cromosómicos, que son de tamaño constante porque el sitio frágil tiene una localización constante y específica para el cromosoma respectivo (p. ej., el sitio frágil más importante del X está localizado en Xq27.3). Para que se "exprese" un sitio frágil, es decir, para que se torne visible, es necesario cultivar las células en medios pobres en ácido fólico y timidina; por lo común, se usa un medio mínimo (199) o sintético sin ácido fólico. La expresión de un sitio frágil requiere uno o más períodos de síntesis de ADN en condiciones de baja oferta de desoxitimidintrifosfato (dTTP) y no se expresa sino en un porcentaje discreto o bajo de células (5-20%) (fig. 18-9).

El primer sitio frágil del cromosoma X, denominado *FRAXA* (*FRÁgil X, A*), constituye una expresión citológica del "síndrome del X frágil", pero dada la baja sensibilidad del método citológico y la existencia de otros "sitios frágiles" no se usa actualmente para el diagnóstico. Con posterioridad se encontraron otros dos sitios frágiles en el cromosoma X, los llamados FRAXE (asociado con leve retraso mental) y FRAXF, sin fenotipo alterado. En el año 2007 había registrados 119 sitios frágiles en el cariotipo humano,[21] de los cuales sólo una minoría están asociados con enfermedades; de estos sitios, 30 son llamados "raros" porque sólo se encuentran en determinados individuos, mientras 89 son llamados "comunes" porque pueden ser inducidos por drogas agregadas al cultivo y se presentan en la mayoría de la población. Los de interés en Medicina son un subgrupo de los "raros" que son susceptibles a la deficiencia de folatos en el medio de cultivo; éstos son sólo siete "sitios".[21] El sitio original FRAXA se corresponde con un gen, el *FMR-1* (*F*rágil-X, *R*etraso *M*ental, *1*).

Fenotipo del síndrome del X frágil

Este síndrome típico con mutación completa ocurre tanto en varones como en mujeres (con ciertas diferencias fenotípicas); la incidencia es 1 cada 4.000 varones recién nacidos y de 1 cada 8.000 mujeres.[22,23] Sin embargo, los portadores de la premutación también pueden expresar una patología, aunque diferente del síndrome típico. La incidencia de la premutación en mujeres varía entre 1:113 y 1:259; entre varones, la incidencia de la premutación varía de 1:260 a 1:800, de modo que los portadores de premutación son muchos más que los de la mutación completa.[24] Se considera que el síndrome del X frágil es el principal causante de retraso mental hereditario. Se comporta como una mutación semidominante, con baja penetrancia en la mujer. Las características fenotípicas son profundo retraso mental, aumento del volumen testicular (macroorquidismo) y particularidades faciales y del tejido conectivo. A menudo el rostro es alargado, por disminución de la distancia intercigomática, y el mentón es prominente. El volumen testicular es mayor de 30 mL. Por lo

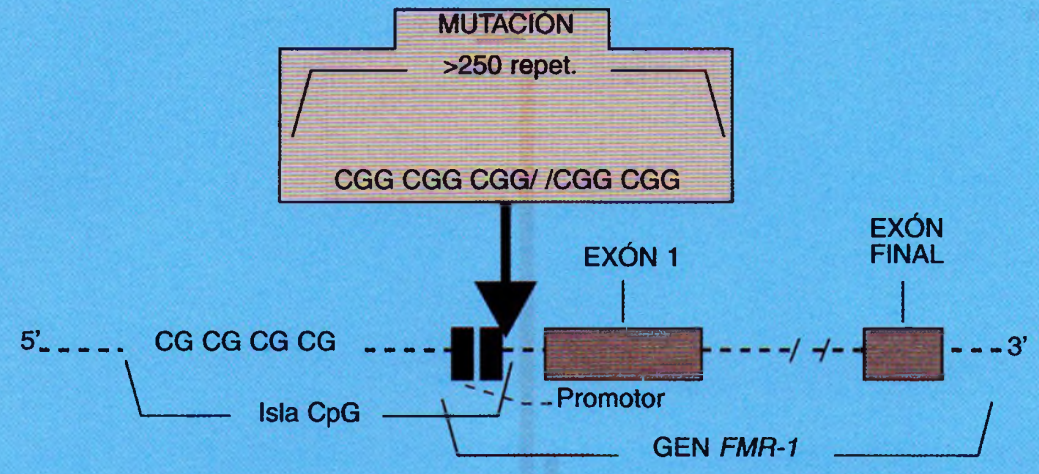


Fig. 18-10. Ubicación y estructura de la mutación del síndrome del X frágil. Los límites de la "isla CpG" están por fuera de las repeticiones; las repeticiones se hallan en el segmento inicial no traducido del gen *FMR1*.

general, hay laxitud ligamentosa y pecho excavado. Es frecuente el comportamiento autista de los niños y, en menor grado, convulsiones o alteraciones en el electroencefalograma. Se ha definido una tabla de verificación de signos clínicos.[25] En la actualidad el diagnóstico definitivo se realiza de manera directa con el ADN (amplificación de repeticiones y determinación de su número). El coeficiente intelectual (CI) es variable pero en la mayor parte de los varones se sitúa entre 35% y 45% del normal. En las mujeres (ésta es una mutación ligada al X pero expresada también en mujeres), el coeficiente intelectual está menos afectado (CI de 60-80% del normal) y los signos somáticos son más leves, pero los signos y síntomas pueden ser sutiles y difíciles de diagnosticar clínicamente.[22] Se ha observado que la mayoría de los diagnósticos precoces se hacen por retraso del desarrollo motor o retraso en el uso del lenguaje.[22] La *herencia* de esta mutación no responde a las reglas usuales: los alelos relevantes pasan de un hombre aparentemente normal a una hija también aparentemente normal (en cuyo ovario se amplía la repetición durante la meiosis), y en sus hijos varones aparecen expresados por completo. Además, existe un fenómeno parecido a la "anticipación" observada en la enfermedad de Huntington (véase cap. 9). Este fenómeno consiste en el *aumento de la penetrancia* a medida que transcurren las generaciones y tiene su explicación en el aumento de la longitud de las secuencias repetidas en el gen (véase más adelante).

El origen del síndrome del X frágil obedece a la supresión funcional del gen en el cual sucede esta mutación especial. El gen afectado se denomina *FMR-1* y la supresión funcional no es directa, sino por la metilación especial que experimenta cuando las repeticiones pasan de un umbral de longitud determinado.

La mutación en el síndrome del X frágil. Expansión de tripletes CGG

El estudio del ADN de las células de estos pacientes mediante métodos moleculares permitió descubrir segmentos de ADN con secuencias anormales: largas secuencias del trinucleótido CGG (citosina-guanina-guanina) repetidas más de 200 veces (hasta 1.000 o más veces). Estos segmentos con repeticiones se encuentran en la región no traducida (SANT, véase cap. 5) antes del comienzo de la región traducida del exón 1 del gen *FMR-1*, que está localizado en el sitio FRAXA, en la región Xq27.3 (fig. 18-10).

En las personas normales, esta región del ADN tiene normalmente unas pocas repeticio-

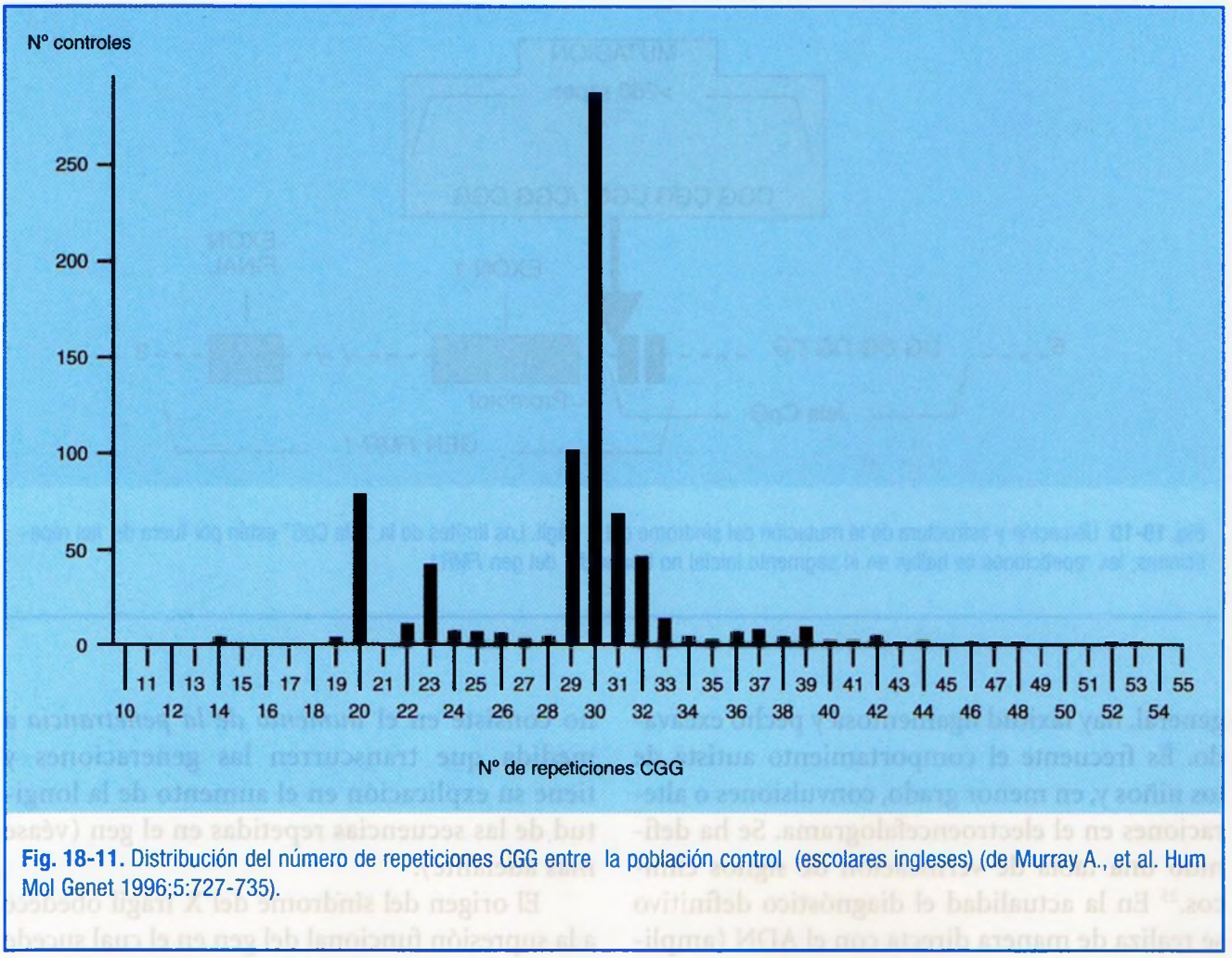


Fig. 18-11. Distribución del número de repeticiones CGG entre la población control (escolares ingleses) (de Murray A., et al. Hum Mol Genet 1996;5:727-735).

nes del triplete CGG intercaladas; se ha determinado que el número de estas repeticiones es un polimorfismo, cuyo promedio es de 30 repeticiones CGG, y cuyo rango se extiende entre 6 y 44 repeticiones de CGG (fig. 18-11).[22]

Los individuos que tienen entre 45 y 54 repeticiones se consideran en una zona *intermedia* de repeticiones; los que poseen entre 55 y 200 repeticiones tienen la *premutación*, con riesgo en la progenie y además con sintomatología especial (falla ovárica prematura en las mujeres y el "síndrome de temblor y ataxia asociado al X frágil" o FXTAS). Con más de 200 repeticiones se tiene la mutación plena y el síndrome típico. Por consiguiente, la mutación consiste en la *ampliación* del número de estos tripletes, en vez de las clásicas mutaciones por cambio de bases o pérdidas o inserciones de bases (véase cap. 8). Este tipo de mutación por expansión de tripletes repetidos se ha encontrado también en otras enfermedades hereditarias humanas (véase cap. 9). Por otra parte, la mutación por expansión no se expresa inmediatamente, ya que primero "evoluciona" a través de una etapa "premutacional"; en ella, las repeticiones de tripletes han comenzado a expandirse, pero aún no han traspasado el "umbral" de 200 repeticiones, a partir del cual se producen los efectos que llevan a la expresión del fenotipo típico del X frágil. El número de tripletes repetidos en los pacientes se extiende entre 260 y 1.000 o más tripletes; es frecuente que se excedan los 1.000 tripletes.

La categoría de *premutación* se extiende entre los 55 y los 200 tripletes. Las mujeres portadoras de una "premutación" tienen un riesgo de tener un hijo con el síndrome del X frágil, y este riesgo es proporcional al número de repeticiones, si éstas son continuas (es decir, si los tripletes CGG no están interrumpidos por ninguna otra secuencia). Esto ha llevado a destacar la

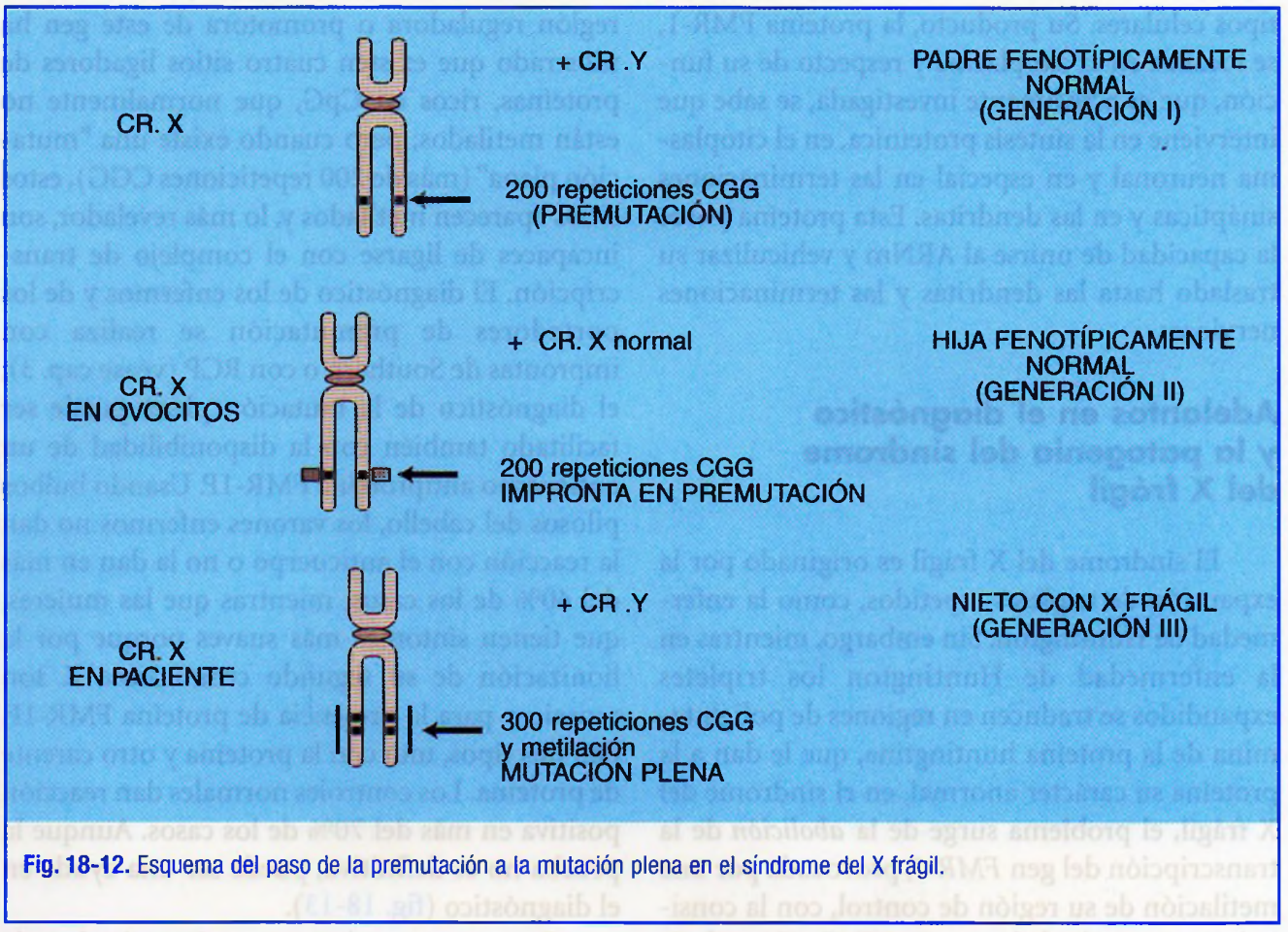


Fig. 18-12. Esquema del paso de la premutación a la mutación plena en el síndrome del X frágil.

importancia del examen del ADN en las familias en las cuales ha habido un caso de este síndrome. Toda interrupción de las repeticiones de CGG con secuencias distintas es considerada como un preventivo de la expansión patológica de esta región.

Transmisión de la premutación y la mutación del X frágil

En las familias en las cuales ha sucedido un caso de X frágil, alrededor de un 10% de los varones *normales* son portadores de la premutación y la transmiten a todas sus hijas. Ellas también tienen apariencia normal, pero los nietos varones tienen un riesgo alto de sufrir el síndrome del X frágil. Esto se debe a que en las hijas esta región del cromosoma X con premutación es inestable durante la meiosis, y el número de repeticiones se incrementa (fig. 18-12).

Se considera que entre el 0,4% y el 1% de las mujeres de la población general son portadoras de la premutación del X frágil, lo cual provee los nuevos casos.[24]

Efectos en el gen *FMR-1*

Cuando el número de repeticiones de los tripletes CGG pasa el umbral de las 200 repeticiones, este segmento de ADN es metilado por las enzimas de la célula y la metilación se extiende a la isla CpG en la región reguladora del gen *FMR-1*. Como consecuencia de esta metilación, la transcripción del gen *FMR-1* queda abolida, lo cual ocasiona el síndrome. Se ha comprobado que la abolición funcional de este gen es la causa del síndrome, ya que también se observa el síndrome cuando el gen *FMR-1* presenta mutaciones clásicas de cambio del marco de lectura o de truncamiento de la proteína, que son mucho más raras que las de expansión de las repeticiones. El gen *FMR-1* se expresa activamente en las espermatogonias testiculares, en las neuronas del hipocampo y del cerebelo y en muchos otros

tipos celulares. Su producto, la proteína FMR-1, se localiza en el citoplasma y respecto de su función, que es activamente investigada, se sabe que interviene en la síntesis proteínica, en el citoplasma neuronal y en especial en las terminaciones sinápticas y en las dendritas. Esta proteína posee la capacidad de unirse al ARNm y vehiculizar su traslado hasta las dendritas y las terminaciones nerviosas.

Adelantos en el diagnóstico y la patogenia del síndrome del X frágil

El síndrome del X frágil es originado por la expansión de tripletes repetidos, como la enfermedad de Huntington. Sin embargo, mientras en la enfermedad de Huntington los tripletes expandidos se traducen en regiones de poliglutamina de la proteína huntingtina, que le dan a la proteína su carácter anormal, en el síndrome del X frágil, el problema surge de la *abolición* de la transcripción del gen *FMR-1*, provocada por una metilación de su región de control, con la consiguiente *ausencia de la proteína* FMR-1P; es decir que el mecanismo causante de la enfermedad es totalmente distinto en ambos casos.

Se ha separado claramente la enfermedad principal, por mutación del locus FRAXA (gen *FMR-1*), de la mucho más infrecuente, por mutación en el locus *FRAXE*, situado a 600 kb en dirección distal en Xq28 y que contiene el gen *FMR-2*, pero cuyo triplete expandido es GCC (en *FRAXA* es CGG); la mutación en *FRAXE* se expresa sobre todo en trastornos del lenguaje y retraso mental más leve que en la de *FRAXA*, y su incidencia es menor.[26]

El gen *FMR-1* del locus *FRAXA* contiene 17 exones que ocupan 38 kb y puede codificar varias proteínas dado que posee señales para empalmes diferentes. Se ha observado su propiedad de asociarse a la subunidad ribosómica mayor, lo cual indica que tiene un papel funcional en la traducción. El triplete repetido CGG se encuentra en la región inicial del primer exón del gen *FMR-1*, antes del codón de iniciación (de la traducción), de modo que esta región no se traduce (pertenece a la "SANT" véase cap. 5). El estudio de la región reguladora o promotora de este gen ha mostrado que existen cuatro sitios ligadores de proteínas, ricos en CpG, que normalmente no están metilados; pero cuando existe una "mutación plena" (más de 200 repeticiones CGG), estos sitios aparecen metilados y, lo más revelador, son incapaces de ligarse con el complejo de transcripción. El diagnóstico de los enfermos y de los portadores de premutación se realiza con improntas de Southern o con RCP (véase cap. 3); el diagnóstico de la mutación plena puede ser facilitado también con la disponibilidad de un anticuerpo antiproteína FMR-1P. Usando bulbos pilosos del cabello, los varones enfermos no dan la reacción con el anticuerpo o no la dan en más del 40% de los casos, mientras que las mujeres, que tienen síntomas más suaves porque por la lionización de su segundo cromosoma X son mosaicos para la presencia de proteína FMR-1P, dan dos tipos, uno con la proteína y otro carente de proteína. Los controles normales dan reacción positiva en más del 70% de los casos. Aunque la prueba no es definitiva, puede ser una ayuda en el diagnóstico (fig. 18-13).

Otro aspecto recientemente investigado es la expresión de este síndrome en las mujeres. Si bien el síndrome es evidente en los varones, dado que llevan un solo cromosoma X, en las mujeres la presencia de una mutación plena se expresa con menos intensidad. En estas mujeres heterocigotas para la mutación de FRAXA, la variabilidad de la expresión de los síntomas se origina en la *lionización de uno de sus cromosomas X*. Si el cromosoma que lleva el gen normal fuera siempre el lionizado en todas las células, la mujer expresaría la enfermedad en igual grado que el varón. Como esto no ocurre, sino que hay un "mosaicismo" en la lionización de los cromosomas X (véase cap. 11), se observa la citada variabilidad de los síntomas. Se ha notado que la proporción de cromosomas X no lionizados con el gen *FMR-1* normal (llamada *índice de activación*), respecto del X con mutación plena, es directamente proporcional a la levedad de los síntomas en mujeres heterocigotas para esta mutación plena; es decir que se comprueba nuevamente el efecto "protector" de la lionización (véase cap. 11).

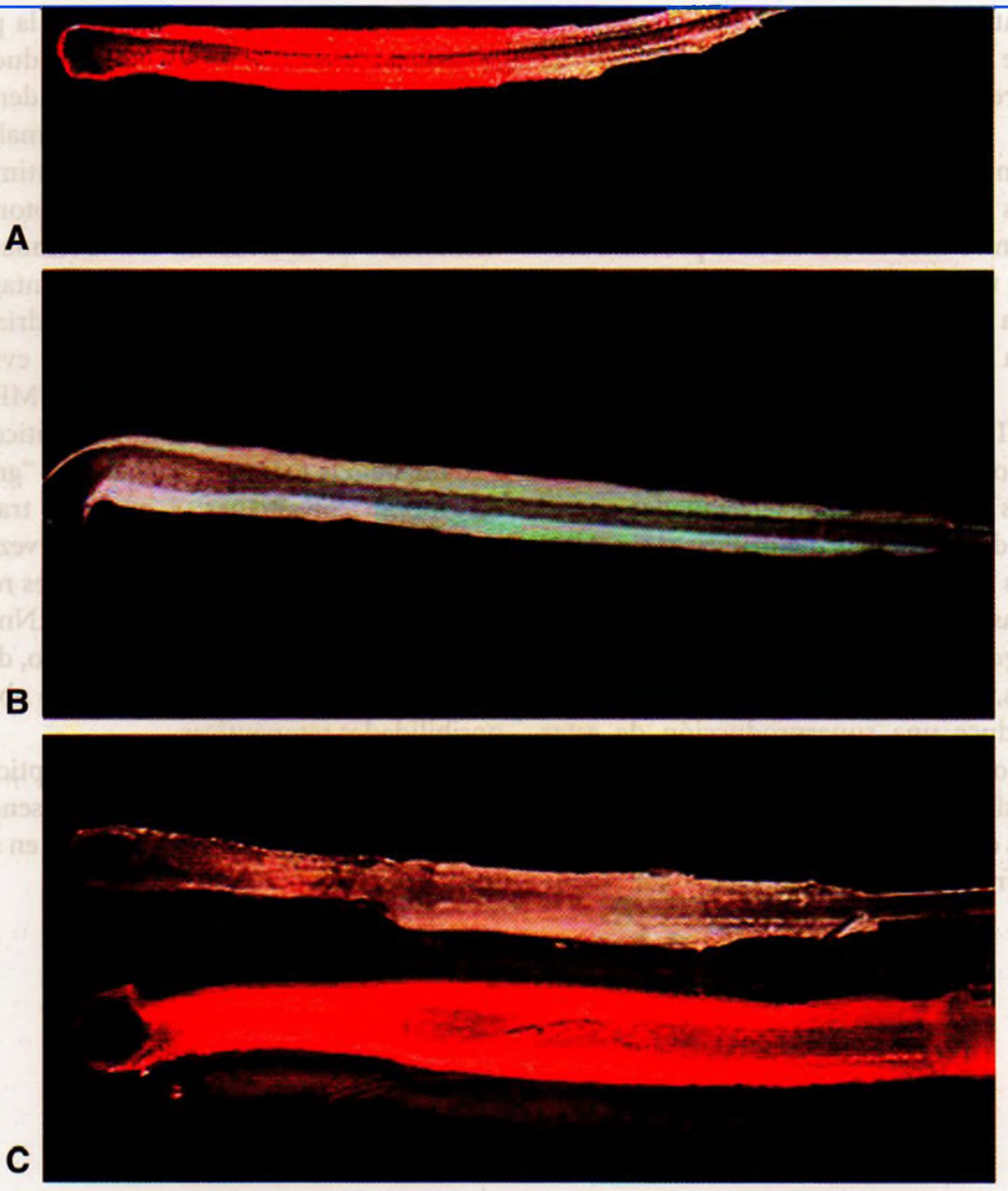


Fig. 18-13. Pelos con su bulbo piloso (a la izquierda) tomados de A: un control, con reacción positiva para el anticuerpo anti-FMR-1P; B: un varón con mutación plena y síndrome típico, sin proteína FMR-1P, C: una mujer con síndrome completo y dos tipos de cabello (mosaico de sus dos X, por lionización). En color rojo, positivo para la reacción con el anticuerpo anti-FMR-1P (de Willemsen R, et al. Am J Hum Genet 1999;65:98-103).

Adelantos en el conocimiento de la función de la proteína FMR-1P

Recientemente se han producido adelantos en el conocimiento de la patogenia de este síndrome, en especial a través del uso de un modelo de la enfermedad en el ratón, que posee el gen *Fmr-1* anulado. La anatomía patológica de los pacientes con el síndrome muestra alteraciones características en ciertas neuronas, tales como las del hipocampo. Se trata de un número exagerado de espinas dendríticas, de aspecto inmaduro.[27] Esta anomalía se reproduce también en el modelo murino, por lo cual se enfocó el interés en el papel de la proteína FMR-1P en el desarrollo y la función de las espinas dendríticas; posteriormente se observó que también había anomalías funcionales en las terminaciones sinápticas.[22]

Actualmente se ha comprobado que la proteína FMR-1P se liga selectivamente a un número de ARNm, alrededor del 4% de los ARNm del cerebro.[28]

Se han identificado algunos de los ARN mensajeros que se unen específicamente a esta proteína: entre ellos el ARNm de la proteína asociada a los microtúbulos, MAP1B, el ARNm de la proteína de guía de crecimiento del axón, semaforina 3f (SEMA3F), la subunidad alfa de la quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (α-CaMKII), y el mensajero de la proteína relacionada con el citoesqueleto ARC/ARG3.1. Todas estas proteínas están relacionadas con el desarrollo de las espinas dendríticas y sus ARN mensajeros han sido localizados en las dendritas de neuronas. Normalmente, la proteína FMR-1P regula *negativamente* la traducción de estos mensajeros, por lo cual, en el síndrome de X frágil se produce una superproducción de estas proteínas, o más precisamente, una desregulación de la síntesis de esas proteínas.[28] El concepto actual es que el déficit intelectual en el síndrome del X frágil es el resultado de la síntesis de proteínas desregulada por déficit de la proteína FMR-1P, que da por resultado la producción de un exagerado numero de espinas dendríticas inmaduras y funcionalmente anormales. Asimismo se ha comprobado que la estimulación dependiente de un número de receptores en la membrana de la neurona está alterada en este síndrome, y esto ha sugerido que antagonistas de la acción de estos receptores podrían tener efectos terapéuticos.[28] Además hay evidencias experimentales de que la proteína FMR-1P interviene en el transporte citoplasmático de los ARNm, bajo la forma de partículas o "gránulos" de ribonucleoproteínas, y que este transporte depende de los microtúbulos.[28] A su vez el estado de la proteína (fosforilada o no) es relevante para su unión a los ribosomas y al ARNm y también para el transporte citoplasmático, de modo que la regulación de su fosforilación abre otras posibilidades terapéuticas.

Asimismo las terminaciones sinápticas parecen depender parcialmente de la presencia normal de esta proteína, específicamente en su desarrollo, eliminación y plasticidad.[29]

RESUMEN

Los reordenamientos estructurales de los cromosomas que son mayores de 10 Mb de ADN son visibles con las técnicas microscópicas de bandeado, las cuales permiten la detección de estas pérdidas o deleciones, duplicaciones, translocaciones e inversiones.

Actualmente se agregaron métodos moleculares (con microarreglos o con la técnica de MLPA) que permiten detectar aberraciones de menor tamaño, lo cual incrementó mucho el catálogo de reordenamientos estructurales de los cromosomas. El síndrome del "grito de gato" se debe a una deleción de tamaño variable en el extremo del cromosoma 5p; los afectados presentan retraso mental, alteraciones faciales y de la laringe; tienen una mortalidad elevada en el primer año de vida. Existe una "zona crítica" para el desarrollo de este síndrome, en 5p15.2, con los genes de la semaforina F y la delta-catenina. El síndrome de Wolf-Hirschhorn se debe a una deleción de tamaño variable en 4p, con una "zona crítica" en 4p16.3. El aspecto facial es característico ("casco griego"), hay retraso mental y malformaciones internas de gravedad variable.

Las microdeleciones reconocidas actualmente con métodos moleculares son muchas, al igual que las microduplicaciones. Su búsqueda está indicada en niños con retraso mental y en niños con malformaciones múltiples de origen desconocido.

Las microdeleciones más estudiadas son las que afectan el cromosoma Y y producen infertilidad masculina. Corresponden al "factor AZF" y pueden localizarse en tres segmentos diferentes del brazo largo del Y: el AZFa (azoospermia); el AZFb (azoospermia u oligospermia) y AZFc (variable, entre normal y oligospermia). Los síndromes de genes contiguos se deben a deleciones o duplicaciones de tamaño variable, que incluyen más de un gen, tales como el síndrome WAGR o el síndrome de Di George. Las translocaciones pueden producirse entre cromosomas acrocéntricos exclusivamente (robertsonianas) o entre no acrocéntricos o mixtos (recíprocas).

Las translocaciones en las que el portador no tiene déficit o exceso de eucromatina se llaman balanceadas y son frecuentes en la población general, en portadores inaparentes, que solamente se revelan en infertilidad, en abortos reiterados, o en la producción de hijos con malformaciones o síndrome de Down por translocación. El origen del estado balanceado es únicamente la segregación de tipo alterna; las adyacentes producen gametos anormales. Las translocaciones balanceadas tienen efectos nocivos y variables sobre la espermatogénesis. Estos efectos se deben al silenciamiento transcripcional de las zonas asinápticas de los cromosomas en el multivalente formado durante la profase meiótica, que lleva a la apoptosis de los espermatocitos.

El síndrome del X frágil es el principal origen de retraso mental hereditario. Se debe a una mutación de expansión de trinucleótidos CGG en el sector no traducible del primer exón del gen *FMR-1* en el cromosoma Xq. Hay cuatro situaciones en este segmento: en individuos normales hay un polimorfismo con un promedio de 30 repeticiones (hasta 44); luego hay una zona "gris" entre 45 y 54 repeticiones; luego está la premutación, entre 56 y 200 repeticiones; finalmente, con más de 200 repeticiones se tiene la mutación plena y el síndrome típico. Citológicamente se puede observar a veces como un hiato o "sitio frágil" cerca del extremo del Xq. Los pacientes varones son más frecuentes que las mujeres y la intensidad del retraso mental es mayor. Además de este retraso mental (coeficiente intelectual 40% del normal en varones) hay macrorquidismo, rasgos faciales característicos y laxitud ligamentosa. En los portadores varones de la premutación se puede desarrollar el síndrome de temblor y ataxia asociados al X frágil (FXTAS) y en las mujeres con premutación, en un 25% se desarrolla una falla ovárica prematura. La transmisión del alelo se hace desde un hombre con premutación y sin retraso mental, a todas sus hijas, que transmiten a sus hijos varones una mutación plena porque en la meiosis femenina se amplifica el número de repeticiones. Cuando hay más de 200 repeticiones (umbral) se metilan las citosinas del promotor del gen y de las repeticiones, con lo cual se anula la posibilidad de transcripción de este gen. El fenotipo de la enfermedad se debe al déficit de la proteína FMR-1P. Este déficit determina una sobreexpresión de ARN mensajeros y sus proteínas en las espinas dendríticas de las neuronas, un déficit funcional de las sinapsis y una pérdida de la plasticidad neuronal.

REFERENCIAS

1. Vissers LM, de Vries BB. Osoegawa K, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. Am J Hum Genet 2003;73:1261-1270.
2. Andrieux J, Sheth F. Comparative genomic hybridization array study and its utility in detection of constitutional and acquired anomaiies. Indian J Exp Biol 2009;47:779-791.
3. Cerruti Mainardi P. Cri du chat syndrome. Orphanet J Rare Dis 2006;1:33-42.
4. Cerruti Mainardi P, Perfumo C, Calì A, et al. Clinical and molecular caracterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation. J Med Genet 2001;38: 151-158.
5. Rodríguez Caballero A, Torres-Lagares D, Rodríguez-Pérez A, et al. Cri du chat syndrome: a critical review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2009, December 29 (edición on iine).
6. Shanske AL, Yachelevich N, Ala-Kokko L, et al. Wolf-Hirschhorn syndrome and ectrodactyly; new findings and a review of the iiterature. Am J Med Genet 2009;152:203-208.
7. Slavotinek AM. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. Hum Genet 2008;124:1-17.
8. Schluth-Bolard C, Till M, Edery P, Sanlaville D. Syndromes chromosomiques emegents. Pathol Biol 2008;56:380-387.
9. Vogt PH. AZF deletions and Y chromosome hapiogroups: history and update based on sequence. Hum Reprod Update 2005;11:319-336.
10. Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F. Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications and future directions. Part II. Urology J 2007;4:192-206.
11. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, et al. The male specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature 2003;423:825-837.
12. Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study. Dev Disabil Res Rev 2008;14:3-10.
13. Page SL, Shin J-C, Han J-I, Choo KH, Shaffer LG. Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation. Hum Mol Genet 1996;5:1279-1288.
14. Solari AJ. Synaptonemal complex a nalysis in human male infertility. Eur J Histochem 1999;43:265-276.
15. Wise JL; Crout RJ, McNeil DW, et al. Cryptic subtelomeric rearrangements and X chromosome mosaicism: a study of 565 apparently normal individuals with fluorescent *in situ* hybridization. PLoS one 2009;4(6) e5855.
16. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders:molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. PLoS Genetics 2005;1(6):e49.
17. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, et al. Cytogenetics of infertiie men. Hum Reprod 1996;11(Suppi 4):1-26.
18. Coco R, Rahn MI, García Estanga P, Antonioli G, Solari AJ. A constitutional complex chromosome rearrangement involving mreiotic arrest in an azoospermic male. Hum Reprod 2004;19:2784-2790.
19. Sciurano RB, Rahn M, Rey-Valzacchi G, Solari AJ. The asynaptic chromatin in spermatocytes of translocation carriers contains the histone variant gamma H2AX and associates with the XY body. Hum Reprod 2007;22:142-150.
20. Solari AJ, Rahn Mi, Ferreyra ME, Carballo MA. The behavior of sex chromosomes in two human X-autosome translocations: failure of extensive X-inactivation spreading. Biocell 2001, 25:155-166.
21. Debacker K, Kooy RF. Fragile sites and human disease. Hum Moiec Genet 2007;16:R150-R158.
22. Garber KB, Visootsak J, Warren ST. Fragile X syndrome. Eur J Hum Genet 2008;16:666-672.
23. Garber K, Smith KT, Reines D, Warren ST. Transcription, translation and fragile X syndrome. Curr Op Genet Develop 2006;16:270-275.
24. Bourgeois J, Coffey S, Rivera, SM, et al. Fragile X premutation disorders- Expanding the psychiatric perspective. J Clin Psychiatry 2009;70:852-862.
25. Maes B, Fryns JP, Ghesquière P, Borghgraef M. Phenotypic checklist for screen for fragile X syndrome in people with mental retadation. Ment Retard 2000;38:207-215.
26. Gecz J. The FMR2 gene, FRAXE and non-specific X-linked mental retardation: clinical and molecular aspects. Ann Hum Genet 2000;64:95-106.
27. irwin SA, Galvez R, Greenough WT. Dendritic spine structural anomaiies in fragile-X mental retardation sydrome. Cerebr Cortex 2000;10:1038-1044.
28. Basell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: ioss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. Neuro 2008;60:201-214.
29. Pfeiffer BE, Huber KM. The state of synapses in fragile X syndrome. Neuroscientist 2009;15:549-567.

Capítulo 19

Genética de los tumores

Genética de los tumores. Esclerosis tuberosa. Oncogenes. Retrovirus. Genes supresores. El retinoblastoma. Proteínas pRB y p53. Otros genes supresores. Tumores y herencia

Introducción: la naturaleza genética del crecimiento tumoral. Hipótesis de los múltiples impactos mutacionales

Las células tumorales tienen alteraciones en su genoma, que son de muy variadas características. Esto se sospechó durante mucho tiempo sobre la base de las alteraciones cromosómicas que típicamente muestran las células en división de los tumores malignos, pero sólo en los últimos años se han constatado las alteraciones de genes específicos en las células de muchos tipos tumorales, y se ha realizado un inventario de esas alteraciones. La diversidad de los tumores, cada uno de los cuales posee alteraciones específicas, ha dificultado la enunciación de una teoría aplicable a todos ellos. Sin embargo, es posible afirmar que en la mayoría de los tumores existen *varias mutaciones génicas (y/o cromosómicas y epigenéticas)* que determinan las características de desregulación, crecimiento e invasividad propias de los tumores malignos. En su mayoría, estas mutaciones ocurren en células somáticas (aunque hay un grupo minoritario de tumores hereditarios; véase más adelante), de tal manera que el tumor se desarrolla y es propio del individuo en el cual ocurren las mutaciones somáticas, sin ser transmitido a los descendientes. Estas mutaciones génicas, que ocurren en células somáticas, no difieren en su naturaleza de las mutaciones en células germinales, que dan lugar a las enfermedades hereditarias; tanto unas como otras son cambios en el ADN que consisten en transversiones o transiciones de bases, deleciones o inserciones de bases, o cambios de mayor extensión (véase cap. 8). Los *efectos* de las mutaciones son distintos cuando ocurren en las células germinales o en las células somáticas: en el primer caso, se producen enfermedades hereditarias, defectos del desarrollo, o las mutaciones son silenciosas (polimorfismos germinales). En el segundo caso (células somáticas), los resultados posibles son la muerte de la célula mutante, el desarrollo tumoral, cambios tolerables en la progenie celular, o cambios silenciosos (polimorfismos somáticos). Además, para que los cambios en el ADN de una célula somática se traduzcan en crecimiento tumoral, esa célula debe tener capacidad replicativa, ya que si no se replica, los cambios quedan limitados a esa célula y mueren con ella. De allí que haya una estrecha relación entre la tasa mitótica (la proporción de células que se encuentran en mitosis) de

un tejido normal y su capacidad de generar tumores.

Tumores malignos y benignos

El término de tumor maligno es equivalente a cáncer en caso de ser de origen epitelial, sarcoma si proviene de tejidos mesodérmicos, y linfoma y leucemia si es de la estirpe linfopoyética. Las diferencias con el tumor benigno provienen de las propiedades del primero, de invasión (de tejidos vecinos) y de diseminación a distancia (metástasis). Los tumores *benignos* tienden a extenderse sólo a nivel local, donde se originaron; aunque pueden tener consecuencias para el organismo, que serán leves o graves dependiendo del sitio y el tamaño alcanzado (p. ej., un meningioma en el sistema nervioso central puede ser grave simplemente por comprimir el tejido encefálico).

Si bien se considera que la mayoría de los tumores malignos son de *origen clonal*–es decir, provienen de una única célula originaria, que ha dado lugar por múltiples divisiones a una población de células tumorales descendientes–, esto no debe ser interpretado como que el origen del tumor haya sido una única mutación. Tal como fue enunciada por A.G. Knudson,[1] la hipótesis de las mutaciones múltiples (o de "impactos" múltiples) considera que el establecimiento de un tumor maligno requiere que ocurran sucesivamente un número de mutaciones, no inferior a dos, en la misma célula. El número total de mutaciones necesario para el establecimiento de un tumor maligno no está completamente determinado, aunque los estudios hechos sobre pacientes a distintas edades sugirieron que son necesarias de 4 a 6 mutaciones diferentes.[2] Actualmente se sabe que el número de alteraciones genómicas en un tumor maligno determinado, es en promedio de 48 a 101 en lós cánceres que han sido investigados.[3] Estas mutaciones sucesivas y necesarias para el establecimiento de un tumor maligno implican que en un primer momento la célula puede llegar a tener un descontrol sobre su replicación, sin haber adquirido aún las características de invasividad y de capacidad colonizadora propias de ese tipo de tumor. En dicho estado previo, las células pueden constituir tumores benignos, por lo cual el estudio de los genes en los tumores benignos puede arrojar luz sobre el origen de los malignos (fig. 19-1).

Antes de considerar algunos tumores benignos, es conveniente establecer, en términos generales, cuáles son los principales tipos de genes cuyas mutaciones son importantes en el desarrollo tumoral. En tal sentido, los estudios señalan tres categorías de genes cuyas mutaciones son importantes en muchos tumores: 1) genes promotores del crecimiento o *protooncogenes*, 2) genes *supresores de tumores* y 3) genes de *reparación del ADN*. Estas tres categorías comprenden genes que son críticos para el establecimiento de muchos tipos de tumores, sin que esto signifique que no haya otros genes, específicos para cada tumor, cuya alteración es importante en cada tipo tumoral. Las mutaciones que originan oncogenes a partir de los protooncogenes generalmente son dominantes (actúan en heterocigosis), mientras que las mutaciones en genes supresores de tumores son recesivas (requieren estar en homocigosis). Más adelante se resumirán las características de los oncogenes celulares y los genes represores de tumores.

Origen o causas de los tumores

Los múltiples factores que pueden influir, alterar y dañar los procesos proliferativos normales de los tejidos y así originar tumores pueden clasificarse fundamentalmente en 1) exógenos (radiación, agentes químicos, véase cap. 8) y 2) endógenos (especies reactivas de oxígeno, metabolitos, hidrólisis espontáneas, errores en la replicación del ADN). Se estima[4] que la cantidad de daños espontáneos del ADN por célula y por día se aproxima a 10^5. Un queratinocito expuesto al sol puede acumular hasta 10^5 alteraciones (fotoproductos) a causa de la luz ultravioleta.[4] La mayor parte de los daños producidos es corregida por los mecanismos de reparación disponibles en cada célula; algunos daños producen la muerte celular; otros, menos frecuentes, producen una alteración irreparable: senescencia, o el

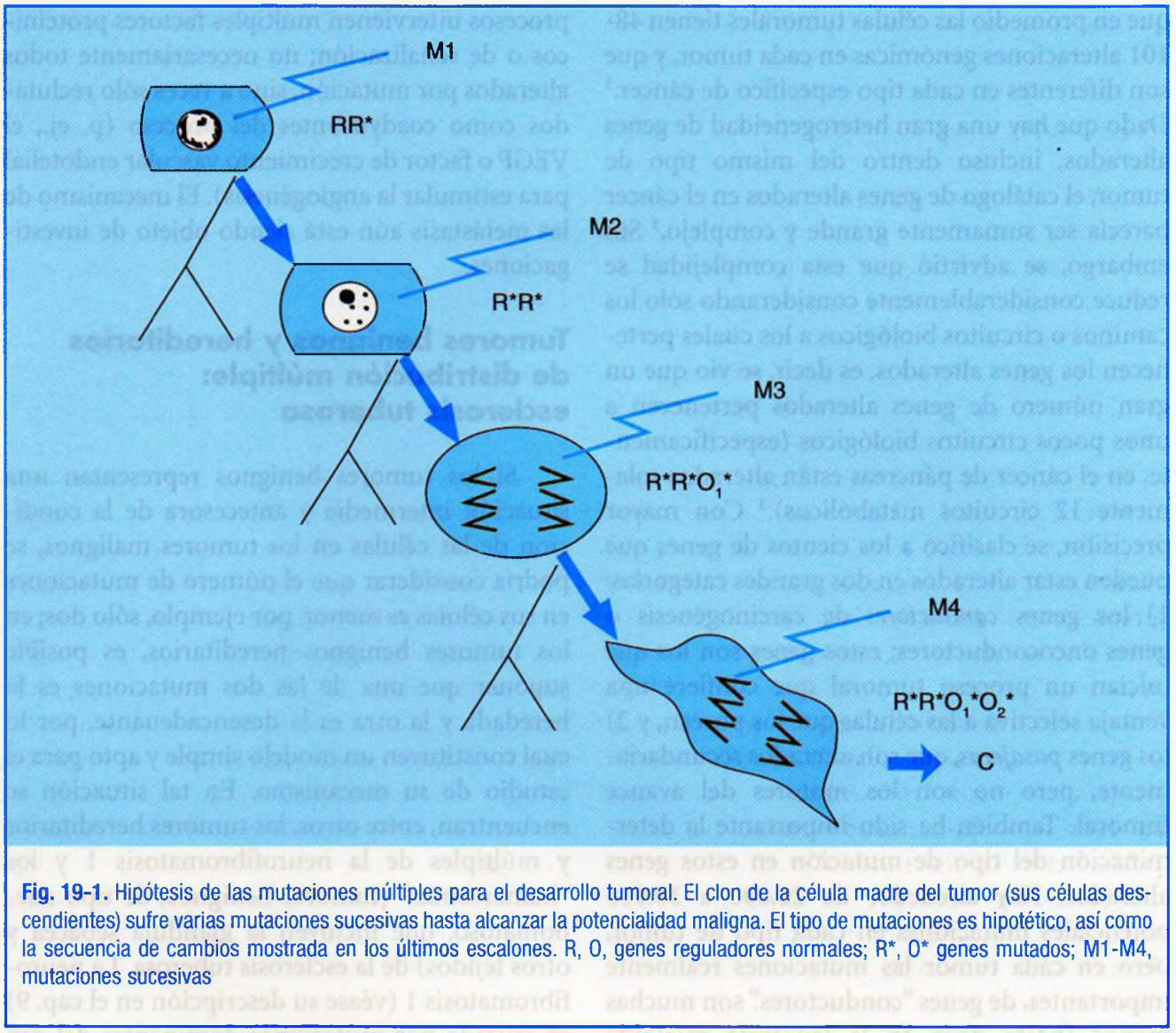


Fig. 19-1. Hipótesis de las mutaciones múltiples para el desarrollo tumoral. El clon de la célula madre del tumor (sus células descendientes) sufre varias mutaciones sucesivas hasta alcanzar la potencialidad maligna. El tipo de mutaciones es hipotético, así como la secuencia de cambios mostrada en los últimos escalones. R, O, genes reguladores normales; R*, O* genes mutados; M1-M4, mutaciones sucesivas

desarrollo tumoral.[4] Los mecanismos que pueden conducir a esto son múltiples:

1. Mutaciones puntuales, microdeleciones o microinserciones intragénicas
2. Deleciones, duplicaciones o inserciones más amplias (segmentos del ADN)
3. Variación en número de copias (CNV, del inglés "copy number variations") de segmentos de ADN
4. Rearreglos intracromosómicos o intercromosómicos que producen genes fusionados anormales
5. Acortamiento anormal (excesivo) de los telómeros. Este acortamiento es un proceso normal dependiente de la edad pero puede alterarse por otras causas (p. ej., un déficit o una ganancia de función de la telomerasa).

La introducción reciente de las técnicas de estudios de amplitud genómica (véase cap. 13) para detectar la asociación del cáncer con marcadores ha revolucionado esta área de estudios. Ya en 2002 se habían descrito más de 100 *oncogenes*, muchos de los cuales codifican quinasas de las tirosinas en proteínas;[3] estas quinasas intervienen en caminos de señalización intracelular. Esos estudios, combinados con el uso de microarreglos para hibridación genómica comparada (véase cap. 5) permitieron grandes avances en la discriminiación de diferencias entre los genomas de células tumorales y células normales.[3] Como se dijo antes, estos estudios permitieron detectar

que en promedio las células tumorales tienen 48-101 alteraciones genómicas en cada tumor, y que son diferentes en cada tipo específico de cáncer.[3] Dado que hay una gran heterogeneidad de genes alterados, incluso dentro del mismo tipo de tumor, el catálogo de genes alterados en el cáncer parecía ser sumamente grande y complejo.[3] Sin embargo, se advirtió que esta complejidad se reduce considerablemente considerando sólo los caminos o circuitos biológicos a los cuales pertenecen los genes alterados, es decir, se vio que un gran número de genes alterados pertenecen a unos pocos circuitos biológicos (específicamente, en el cáncer de páncreas están alterados solamente 12 circuitos metabólicos).[3] Con mayor precisión, se clasificó a los cientos de genes que pueden estar alterados en dos grandes categorías: 1) los genes *conductores* de carcinogénesis o genes oncoconductores; estos genes son los que inician un proceso tumoral que confiere una ventaja selectiva a las células que los poseen, y 2) los genes *pasajeros*, que son alterados secundariamente, pero no son los motores del avance tumoral. También ha sido importante la determinación del tipo de mutación en estos genes alterados. Hay alrededor de 20.000 a 30.000 potenciales mutaciones en cada tipo de tumor, pero en cada tumor las mutaciones realmente importantes, de genes "conductores" son muchas menos (hasta doce en la leucemia mieloide aguda).[3]

Estos avances han sugerido una concepción nueva para el estudio de los tumores: se trata de considerar los tumores como "redes" génicas, cuyo funcionamiento precisa un enfoque integral, como "sistemas" que pueden analizarse mediante métodos de matemática estadística.[5] Este enfoque puede ser simplificado expresando que las alteraciones genómicas en los tumores se corresponden con variadas alteraciones de unos pocos circuitos metabólicos en las células tumorales.

La mayoría de los cánceres o tumores malignos tienen en común las siguientes propiedades: proliferación excesiva; resistencia a la apoptosis (muerte celular programada); angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), y metástasis (diseminación a distancia). En todos estos procesos intervienen múltiples factores proteínicos o de señalización; no necesariamente todos alterados por mutación, sino a veces sólo reclutados como coadyuvantes del proceso (p. ej., el VEGF o factor de crecimiento vascular endotelial para estimular la angiogénesis). El mecanismo de las metástasis aún está siendo objeto de investigaciones.

Tumores benignos y hereditarios de distribución múltiple: esclerosis tuberosa

Si los tumores benignos representan una situación intermedia y antecesora de la condición de las células en los tumores malignos, se podría considerar que el número de mutaciones en sus células es menor, por ejemplo, sólo dos; en los tumores benignos hereditarios, es posible suponer que una de las dos mutaciones es la heredada y la otra es la desencadenante, por lo cual constituyen un modelo simple y apto para el estudio de su mecanismo. En tal situación se encuentran, entre otros, los tumores hereditarios y múltiples de la neurofibromatosis 1 y los "hamartomas" (tumores benignos, de tipo adenomatoso, que incluyen la glándula sebácea y otros tejidos) de la esclerosis tuberosa. La neurofibromatosis 1 (véase su descripción en el cap. 9) es causada por mutaciones dominantes del gen *NF1*; el producto de este gen (neurofibromina) es una proteína activadora de la GTPasa, que regula al oncogén *RAS*, por lo cual este gen *NF1* puede ser incluido en la categoría de supresores de tumores. A veces (con baja frecuencia) pueden desarrollarse sarcomas a partir de los neurofibromas, lo cual está de acuerdo con la hipótesis de las mutaciones múltiples.

La esclerosis tuberosa (o epiloia) es una enfermedad hereditaria dominante bien conocida, con una prevalencia aproximada de 1 en 10.000 nacidos vivos, de herencia autosómica dominante y con un 85% de casos esporádicos (nuevas mutaciones), que se caracteriza por adenomas sebáceos, epilepsia y retraso mental. Hay tumores en la piel, el sistema nervioso, la retina, el riñón y otros órganos. Se han ubicado dos loci no ligados, asociados con la esclerosis tuberosa:

TSC1, en el cromosoma 9q34, y *TSC2*, en el cromosoma 16p13.3, cerca del locus PKD1 (de riñón poliquístico).[6] El *TSC2* cubre 45 kb y su ADNc, de 5,5 kb, ha sido clonado. Este gen se expresa en fibroblastos y células linfoideas, y su producto, la *tuberina*, tiene un peso molecular de 198.000 Da. Se predicen cuatro dominios intramembranosos y una región del tipo de las PAG (proteínas activadoras de la GTPasa), es decir, similar a la neurofibromina, por lo cual se la considera una potencial supresora tumoral. Coincidiendo con dicha hipótesis, se ha observado que en un número de enfermos de esclerosis tuberosa existe una deleción que incluye la región de *TSC2*, es decir que la enfermedad está asociada no sólo con variadas mutaciones, sino a veces con la pérdida total del gen. Se ha investigado la condición de los dos genes *TSC* en tejidos extraídos de hamartomas y se ha comprobado la *pérdida de heterocigosidad* en las células del hamartoma, es decir que el alelo normal también está alterado en las células del hamartoma. Esto coincide exactamente con la sugerencia de que la mutación del *TSC2* heredada es pretumoral, mientras que la segunda mutación (del gen normal remanente) es necesaria para el establecimiento del tumor benigno; por ello se considera que los hamartomas de la esclerosis tuberosa obedecen a un mecanismo de dos mutaciones sucesivas en el gen *TSC2*.[6,7]

Oncogenes, protooncogenes y oncogenes celulares

Los oncogenes son el producto alterado (por mutación génica, reordenamiento cromosómico u otros mecanismos) de ciertos genes normales (protooncogenes) que intervienen en la transducción de señales y que, luego de su alteración, facilitan el desarrollo de los tumores. El concepto de oncogenes se remonta a la atribución errónea de los retrovirus como originadores de los tumores malignos, en especial el virus del sarcoma de Rous y el virus de la leucosis aviaria. En realidad, para su replicación dentro de las células, los retrovirus no requieren ninguna actividad oncogénica; sin embargo, durante su integración con el genoma celular, pueden capturar algunos segmentos génicos de las células huésped. En los casos en los que los segmentos génicos capturados por el retrovirus correspondan a ciertos genes regulatorios, se produce la creación de un *oncogén viral*; en él, los genes regulatorios pueden presentar una función exacerbada por estar bajo el control de un promotor viral, y están sujetos a una tasa de mutación mayor que la de la célula (véase cap. 8). Se ha comprobado que todos los oncogenes virales tienen correspondencia con genes de la célula huésped, y estos genes correspondientes se denominan *protooncogenes*. Los protooncogenes son genes de tipo transductor de señales, la mayoría de los cuales codifican quinasas de proteínas, que se clasifican en dos tipos: 1) receptores de factores de crecimiento con actividad de quinasas y 2) quinasas sin dominios de receptores. Otros protooncogenes codifican directamente factores de crecimiento, en tanto que algunos codifican activadores de la GTPasa, como el gen normal de la neurofibromina. Cuando un protooncogén sufre una alteración por mutación o por aberración cromosómica, que lleva a una alteración de sus características, y en otros casos a la pérdida de su función normal, el protooncogén modificado adquiere actividad promotora de crecimiento tumoral y se denomina *oncogén celular*; es decir que los oncogenes celulares son mutaciones de los protooncogenes (fig. 19-2).

Los protooncogenes y sus mutantes, los oncogenes, no han demostrado tener un papel primario en el origen de los tumores malignos; si bien los oncogenes están presentes en las células de diversos tumores, su función en el desarrollo tumoral probablemente es indirecta, al actuar sobre otros genes o productos de la célula, tales como la proteína pRB, aumentando la potencialidad de crecimiento de células ya malignizadas por un mecanismo previo, por ejemplo, amplificándose, como los oncogenes de la familia *myc* o los de la familia *erb*. Sin embargo, el estudio de los oncogenes ha llevado a un mejor conocimiento de los genes codificantes de quinasas, y además ha clarificado la replicación de los retrovirus y su posible uso en terapia génica, por su cualidad de integrarse al genoma celu-

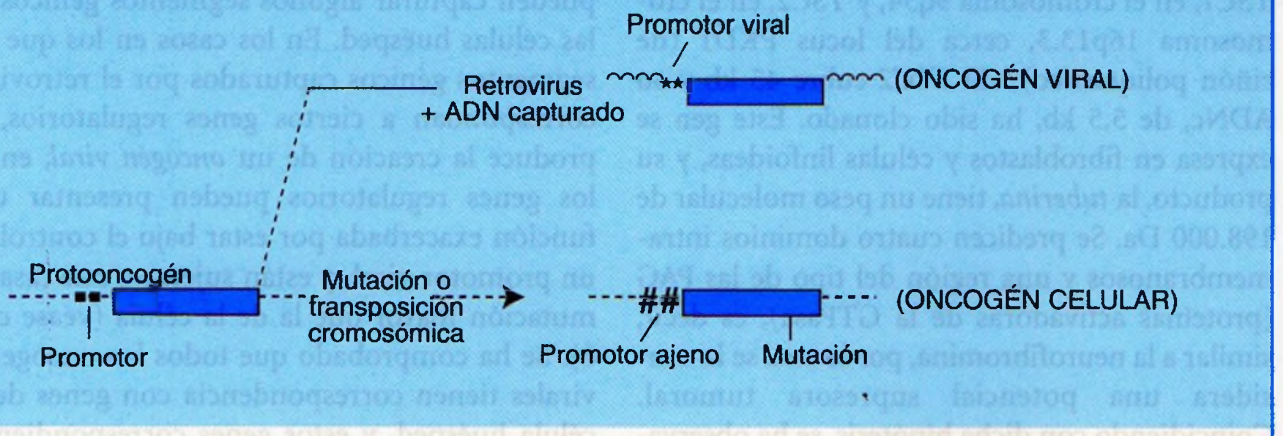


Fig. 19-2. Relación entre protooncogenes, oncogenes virales y oncogenes celulares.

lar con segmentos de ADN agregado o sin ellos (panel 19-1).

Replicación de los retrovirus y su integración al genoma celular

Los retrovirus son virus que contienen ARN y que son capaces de dirigir la síntesis de ADN complementario a su propio genoma de ARN; estos virus comprenden el del sarcoma de Rous de las aves, el virus de la leucosis aviaria y el virus del SIDA, entre otros.

La estructura y la replicación de los retrovirus es característica: todos ellos poseen tres genes típicos, el *gag* (por antígeno específico de grupo), el *pol* (por polimerasa o transcriptasa inversa) y el *env* (por envoltura), aunque cada gen codifica una poliproteína que da finalmente varias proteínas más pequeñas (fig. 19-3).

El retrovirus, al entrar en el citoplasma celular, libera su ARN, que es utilizado como otro ARN por los ribosomas celulares, para traducir su contenido en las proteínas virales. Una de ellas es la *transcriptasa inversa*, que se adosa al ARN

Panel 19-1. El ciclo celular en relación con el cáncer

Panel

La terminología "oncogenes", "protooncogenes", "genes supresores de tumores" y "antioncogenes" tiende a ser reemplazada por términos que indican los genes, sus productos (proteínas, transductores de señales, factores de crecimiento, receptores) y las vías directamente implicadas en un tumor determinado. Ello se debe a que se conocen más detalles de los procesos celulares normales y los que están alterados en la división celular.

En términos sencillos, un tumor (benigno o maligno) es una proliferación desordenada de células. Todo tejido en un organismo vivo (en nuestro caso, específicamente el ser humano) se mantiene gracias a una continua multiplicación celular, más o menos intensa según los diversos tejidos u órganos que lo componen. Este proceso proliferativo puede ser transitorio (p. ej., durante las etapas embrionarias o durante el crecimiento posnatal), o permanente, sobre todo en los tejidos que tienen un desgaste y recambio intensos, como por ejemplo los hematopoyéticos, la piel y el epitelio intestinal.

La multiplicación celular depende de la sofisticada maquinaria que gobierna la división celular, a lo largo del ciclo celular, en sus cuatro fases clásicas (G1, S, G2 y M). Para progresar en cada fase y desde una fase a otra de este ciclo, la célula contiene y utiliza numerosas vías de señalización, positivas (activadoras) y negativas (de control o de freno), que aseguren que se cumpla la división celular en tiempo y manera apropiados. Estas vías se hallan interrelacionadas y su funcionamiento es normalmente coordinado de una manera sumamente precisa. Los genes y sus

productos que intervienen en cada divisón celular se cuentan en cientos. Cualquier error o deficiencia en uno de los pasos o puntos de señalización podrá llevar a alguna de las consecuencias siguientes, más o menos dañinas:

1. la detención de la célula en su proceso de divisón y su eventual muerte
2. el descontrol de su proliferación que origina un tumor de crecimiento localizado benigno (proliferación no programada)
3. una alteración en otros controles, que lleva a la invasión de tejidos vecinos y a distancia, inestabilidad genómica (falla de los mecanismos de reparación del ADN, aberraciones cromosómicas estructurales) o inestabilidad cariotípica (aberraciones cromosómicas numéricas).[8]

Los productos génicos implicados en la progresión del ciclo celular normal y sus mecanismos de control son en gran parte sustancias llamadas activadoras (ciclinas, C, y quinasas ciclino-dependientes, CDK), y las inhibidoras del ciclo (las más conocidas son la proteína del retinoblastoma, Rb, y las p107, p130, Ink4, Cip y Kip). Las células humanas tienen múltiples loci para este fin: 13 loci de CDK y 25 de ciclinas. Estos factores funcionan coordinadamente en las distintas fases del ciclo celular (véase fig. 19-4 del texto principal).

La progresión de la célula por el ciclo celular está ejemplificada en el esquema simplificado de la figura 19-4. Se indican los sitios de actividad principal de las ciclinas y las quinasas dependientes (CDK). Los puntos de control específicos en los pasajes de una fase del ciclo a la siguiente están indicados con "chk" (del inglés *checkpoint*). Debe enfatizarse que el ciclo celular difiere en la duración de sus fases y en múltiples detalles específicos, según sea el tejido involucrado y la etapa del desarrollo del individuo (embrión, feto, neonato, niño, adolescente, adulto, anciano). De estos condicionantes dependerá la frecuencia, agresividad y otras características de cada tumor, aparte de las mutaciones específicas que le dieron origen.

Las innumerables mutaciones halladas en estos y otros genes codificantes de los activadores o inhibidores conducen a una serie de alteraciones del ADN y de los productos resultantes: mutaciones puntuales, deleciones, amplificaciones, inserciones, roturas de cromátidas o de la doble hélice; estas alteraciones a su vez trastornan los diversos aspectos del ciclo, provocando un desarrollo desordenado del tejido afectado. Los numerosos mecanismos de reparación de los errores en el ADN (véase cap. 8) logran corregir muchas de las alteraciones iniciales, pero a veces resultan incapaces de reparar un daño demasiado súbito o demasiado amplio, sobre todo en aquellos tejidos que presentan un recambio celular intenso, como la mucosa intestinal o la médula ósea, y los procesos reparativos no alcanzan entonces a actuar adecuadamente.

En los tejidos del organismo adulto, la reposición de células eliminadas por su desgaste o descamación natural es suplida por las células troncales (o células madre) que producen células hijas con elevada capacidad proliferativa. La regulación de esta proliferación está bajo el control de la serie de complejos de ciclinas-CDK por un lado, y de inhibidores por otro.[8]

Actualmente se busca determinar el número total de genes cuya alteración puede contribuir al origen o progreso de cada tipo de cáncer. Se han identificado alrededor de 400 genes mutantes en diversos tumores;[9] sin embargo, no todos ellos son necesariamente causales. Se halló que gran proporción de los que están presentes en un tumor, son más bien su consecuencia y no tanto su causa, por lo cual no todo gen mutado presente en una célula tumoral es causante de éste.[9] Resulta útil discriminar las mutaciones entre causales, que se denominan conductoras (*drivers* en inglés; véase texto principal) y las muchas otras mutaciones que no son claramente causales sino sólo efecto de la propia alteración global, que se denominan "pasajeras" (*passengers*).[10] En dos estudios recientes que utilizaron secuenciamiento más detallado, la proporción de genes mutados presumiblemente carcinogénicos ("conductores") fue de menos del 1%.[9]

Además de las mutaciones desencadenantes del tumor debe considerarse la transmisión hereditaria de una condición de susceptibilidad o "predisponente".[11,12]

Otros mecanismos productores de tumores, distintos de una mutación puntual, son los que se deben a la variación en el número de copias (o sea, la dosis génica),[13] y a rearreglos intracromosómicos e intercromosómicos (translocaciones, inversiones) que colocan en contacto genes con promotores o activadores que corresponden a otros genes. Los ejemplos más conocidos son la translocación entre los cromosomas 9 y 22 asociada a la leucemia mieloide crónica, y la 8/14 presente en otros tipos de leucemias. Por último, las alteraciones a nivel de los telómeros favorecen los rearreglos cromosómicos[14] ya que conducen a inestabilidad cromosómica.

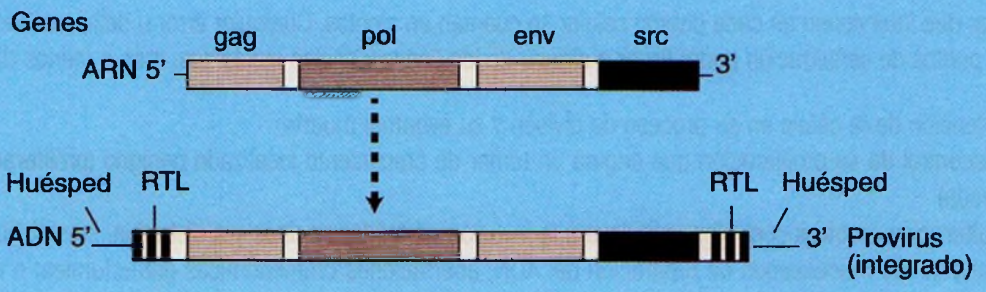


Fig. 19-3. Estructura de un retrovirus que lleva, además, un gen adicional, src, como el virus del sarcoma de Rous de las aves. Arriba: genoma viral (ARN); abajo: provirus integrado en el genoma celular del huésped. RTL: repeticiones terminales largas.

viral y sobre él construye un ADN de cadena simple complementario; este ADN de cadena simple es convertido en doble por una ADN polimerasa y, finalmente, se introduce en el ADN genómico celular, en un lugar al *azar*, mediante una enzima *integrasa*. Al quedar incluido en el genoma, el ADN retroviral está constituido por sus genes característicos y en los extremos posee dos secuencias no traducibles, las repeticiones terminales largas (RTL, véase fig. 19-3). Una vez integrados al genoma celular, estos segmentos de ADN son transcritos por el complejo de transcripción celular, puesto que el ADN viral lleva sus propias secuencias reguladoras.

El genoma viral puede capturar segmentos de genes o genes completos de la célula, especialmente a partir de ARN celular procesado, y estos segmentos quedan bajo el control de las propias secuencias regulatorias virales. De esa manera, segmentos como el *src*, que codifica una quinasa de tirosinas (actividad fosforilante de los residuos tirosina de proteínas), quedan totalmente desregulados de los mecanismos de control de la célula huésped.

Genes supresores de tumores

En las dos décadas pasadas se han producido importantes avances en el conocimiento de genes cuya actividad normal es fundamental para las células, ya que actúan regulando el ciclo celular; algunos de estos genes se encuentran alterados o su función está anulada en muchos tipos de células tumorales. Estos genes típicamente sólo expresan su falta de función en estado homocigótico, esto es, cuando ambos genes están alterados, es decir que actúan como recesivos. Su función normal, que es la regulación del ciclo celular, parece ser imprescindible para evitar el desarrollo de un tumor maligno. Por consiguiente, este tipo de genes se ha denominado *supresores de tumores* (también "antioncogenes" u "oncogenes recesivos"). Su función es regular el ciclo celular normal (fig. 19-4 y panel 19-1) y, a través de esa regulación, cumplir numerosas funciones indirectas, por lo cual su estudio adquiere gran importancia. Los principales genes "supresores de tumores" son el codificante de la proteína de retinoblastoma *pRB*, y el codificante de la proteína p53 (véase más adelante).

El retinoblastoma

El retinoblastoma es un tumor extremadamente maligno que afecta a niños menores de 3 años y es curable con radioterapia si se realiza un diagnóstico temprano. Su incidencia es de 1 cada 20.000 nacidos y se ha ido incrementando, debido a los adelantos del diagnóstico temprano que permiten la supervivencia hasta la edad reproductiva. Alrededor del 10% de los casos ocurre en forma hereditaria, con características de mutación autosómica dominante (en los países desarrollados en los cuales se detectan y tratan adecuadamente los pacientes); el resto de los casos ocurre de manera esporádica. Los niños presentan: 1) un reflejo blanco en el ojo, que ha sido referido como "reflejo de ojo de

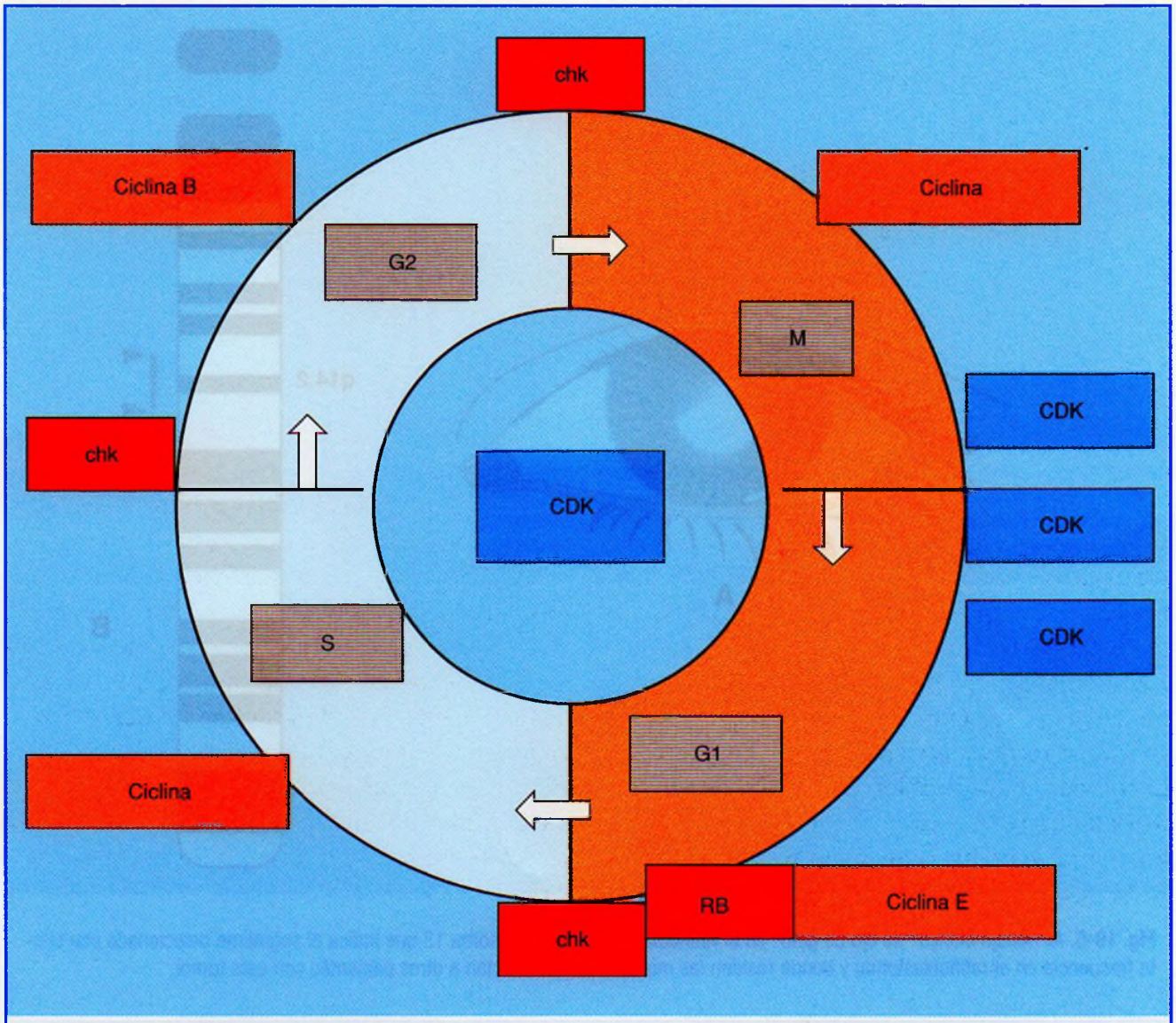


Fig. 19-4. Modelo esquemático del ciclo celular, indicando los principales factores reguladores. Las fases del ciclo son G1, S, G2 y M; sus duraciones son variables según el tejido. CDK = quinasa ciclino-dependiente; chk = punto de control a la entrada de una fase desde otra. (Basado en Malumbres M, Barbacid M, 2009.)[8]

gato", dado por el tumor retiniano inicial; 2) estrabismo sin causa aparente; 3) calcificaciones intratumorales detectables oftalmológicamente o con radiografías. Frente a estos signos, es urgente el diagnóstico preciso con tomografías que detectan las calcificaciones en más del 75% de los casos (fig. 19-5).

El tumor se origina en las células progenitoras de los receptores retinianos, durante la maduración final de la retina posnatal. En las células del tumor, en alrededor del 8% de los pacientes, se advierte la deleción específica de la banda q14.2 del cromosoma 13 (véase fig. 19-5); en esos pacientes, el retinoblastoma está asociado con otros defectos (osteosarcoma y otros tumores, dismorfias faciales, cardiopatías congénitas). Los casos hereditarios por lo general son bilaterales y con focos múltiples. Cuando un paciente ha sido tratado de manera exitosa con radioterapia y se ha curado definitivamente el retinoblastoma, se debe tener en cuenta la significativa propensión, en los casos hereditarios, al desarrollo de otros tipos de tumores (sarcomas, etc.), debido a que estos pacientes tienen deficiencia del gen del retinoblastoma, el cual actúa en forma general como supresor tumoral. El gen del reti-

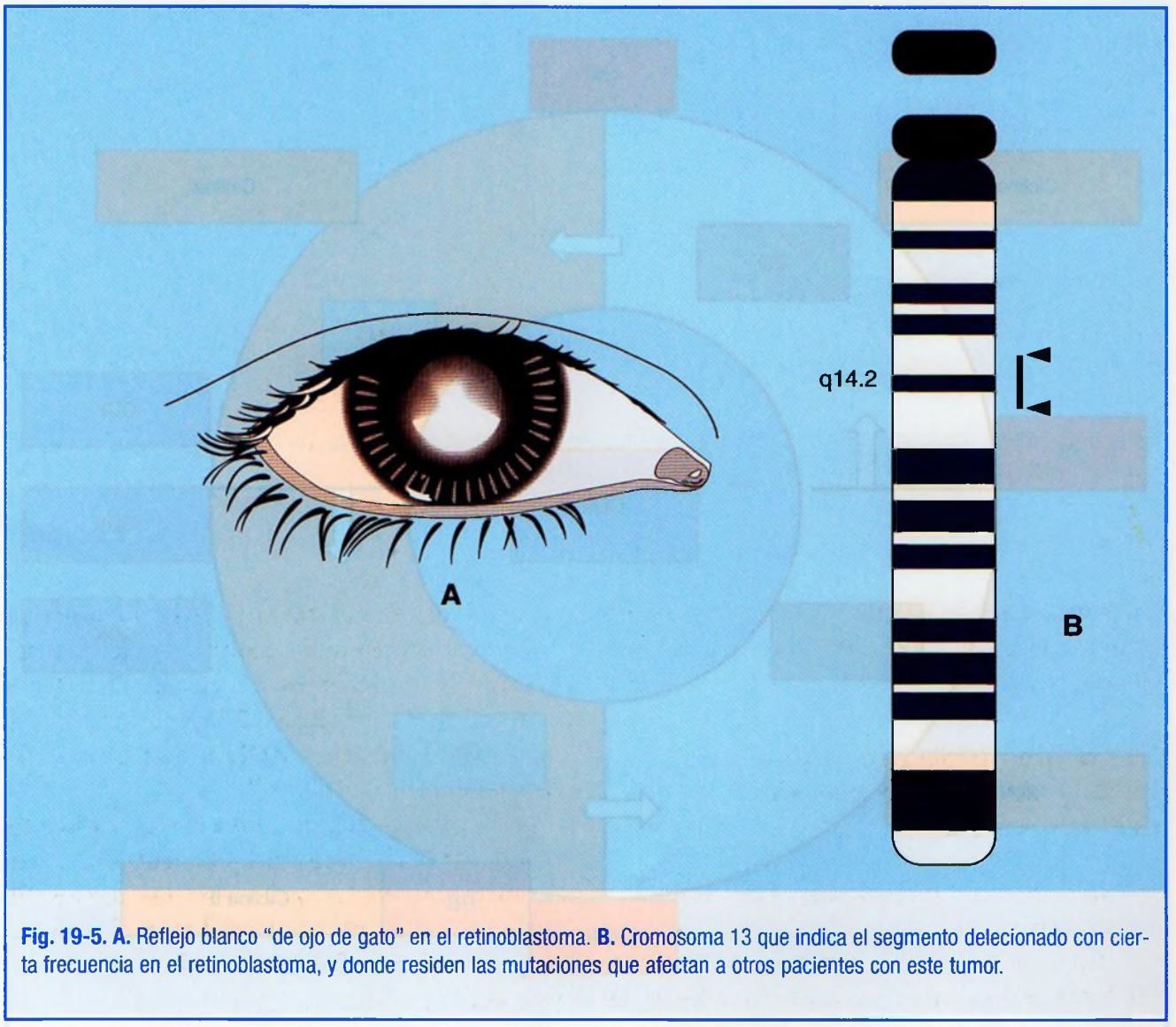


Fig. 19-5. A. Reflejo blanco "de ojo de gato" en el retinoblastoma. **B.** Cromosoma 13 que indica el segmento delecionado con cierta frecuencia en el retinoblastoma, y donde residen las mutaciones que afectan a otros pacientes con este tumor.

noblastoma (*RB*) ha sido localizado en el cromosoma 13 q14.2 y ocupa 190 kb; este gen codifica la proteína pRB (véase más adelante).

El estudio del retinoblastoma dio lugar a la teoría de las mutaciones múltiples y, más recientemente, su proteína pRB ha demostrado desempeñar un papel central en la regulación celular.

La observación de que los casos de retinoblastoma hereditario daban signos más precoces y aparecían como tumores múltiples, mientras que los casos esporádicos daban signos más tardíos y prácticamente siempre eran tumores únicos, y que el resto de las características del tumor eran idénticas en los casos hereditarios y esporádicos, llevó a la presunción de que el desarrollo del retinoblastoma requiere la pérdida de la función de los dos alelos del mismo gen. De acuerdo con esta hipótesis, los casos hereditarios llevaban un gen ya alterado de uno de los padres, por lo que se necesitaba sólo la mutación del alelo restante para desarrollar el tumor, mientras que los casos esporádicos requerían sendas mutaciones individuales en los dos alelos del gen, y por eso su desarrollo es más tardío y el tumor es único (fig. 19-6).[1]

El hecho de que haya varios millones de neuronas retinianas hace que la probabilidad de un "segundo impacto" o mutación durante la época posnatal de desarrollo de la retina, para el portador de un gen anormal paterno, sea muy alta y, por consiguiente, la probabilidad de desarrollo del tumor en el hijo de un portador del gen alterado también es muy alta, con lo cual la

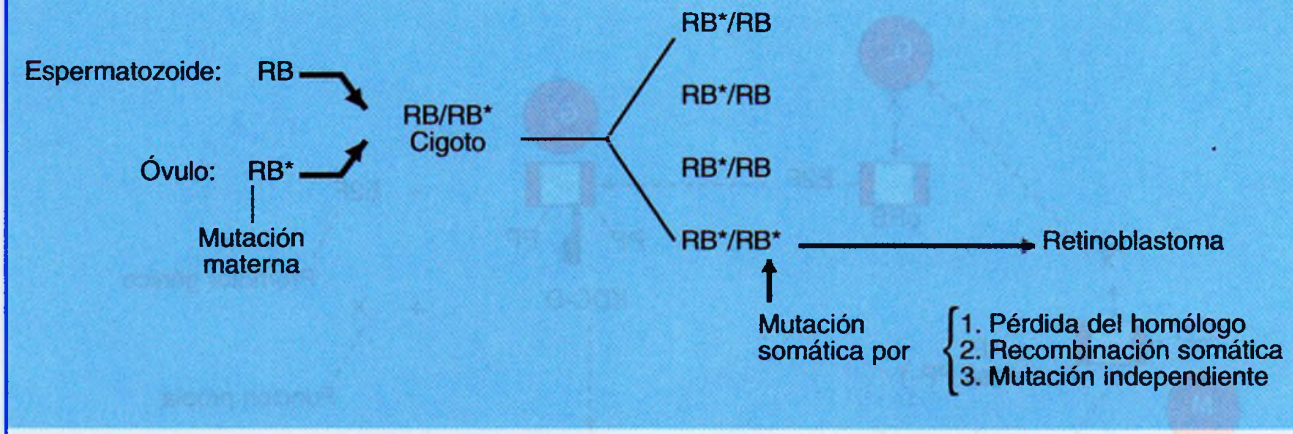


Fig. 19-6. Desarrollo del retinoblastoma hereditario de acuerdo con la hipótesis de las dos mutaciones del gen RB. El asterisco señala el gen mutado.

enfermedad aparece como un rasgo mendeliano "dominante" a pesar de que en términos moleculares es recesivo.

La "proteína de retinoblastoma" (pRB) y su papel regulador del ciclo celular

La proteína codificada por el gen alterado o ausente en el retinoblastoma ha resultado ser un elemento central de la regulación del ciclo celular, por lo cual merece ubicarse entre las proteínas del ciclo y no como una proteína anormal. Esta pRB tiene un peso molecular alto y es una fosfoproteína muy abundante en el núcleo de todos los tipos celulares estudiados. Está formada por casi 900 aminoácidos, que constituyen cuatro dominios: el primero (aminoterminal) es necesario para la oligomerización de la proteína; el segundo y el tercero son los dominios ligadores de oncoproteínas y el factor de transcripción E2F, y el cuarto es el dominio de unión al ADN y a la quinasa de tirosinas cAbl (fig. 19-7).[15]

La pRB puede encontrarse con distintos grados de fosforilación: se encuentra con baja fosforilación en los primeros dos tercios del período G_1 del ciclo celular y durante la mitosis, y aparece hiperfosforilada en el final de G_1, en S y en G_2.[16]

Las proteínas de varios virus oncogénicos, como la del virus de simio 40, se unen específicamente a la pRB hipofosforilada, por los sitios ligadores, y aparentemente impiden que la pRB cumpla su función normal (que es "secuestrar" el factor de transcripción E2F, tipos 1-3).

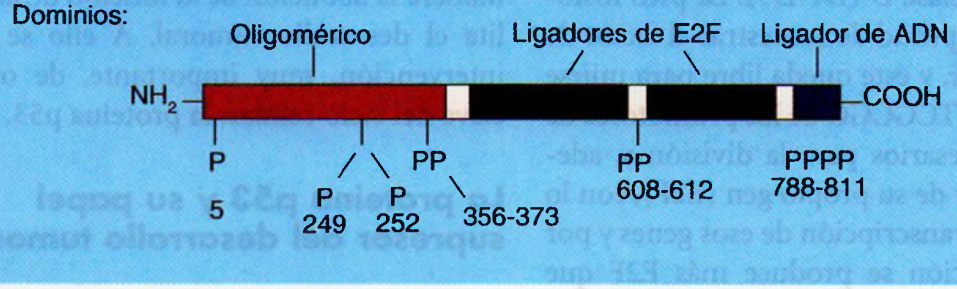


Fig. 19-7. Proteína pRB y sus dominios. Los sitios de fosforilación por las quinasas dependientes de ciclinas se señalan con P y el número del aminoácido.

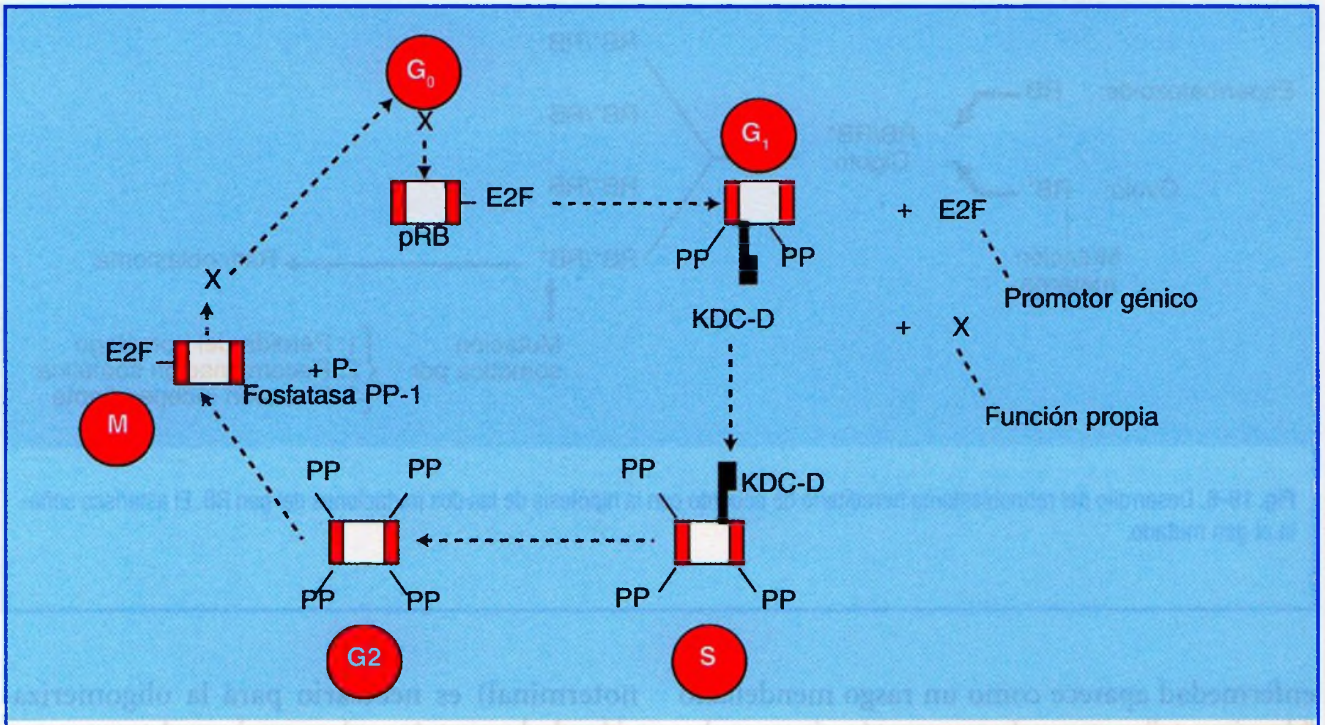


Fig. 19-8. Función de la proteína pRB en el ciclo celular. E2F: factor de transcripción E2; KDC-D: quinasa dependiente de ciclina, grupo D; fosfatasa PP-1: fosfatasa de fosfoproteínas 1; G0, G1, G2, S y M: etapas del ciclo. La fosforilación de la pRB se representa por el número de radicales -P unidos. X: otras proteínas.

La fosforilación de la pRB que ocurre en la segunda mitad de G1 le hace perder la capacidad de unirse con otras proteínas: las oncoproteínas, el factor de transcripción E2F, cAbl y otras. Además, esta fosforilación coincide con el momento del "punto de restricción" del período G1 del ciclo celular. Este punto se define como el momento en que la célula deja de ser dependiente de los factores mitogénicos del plasma y queda comprometida a continuar el ciclo y la mitosis. En condiciones normales, en el punto de restricción y si la célula es apta para multiplicarse, la pRB es fosforilada por las quinasas dependientes de ciclinas de la clase D (D1-D3). La pRB fosforilada pierde su aptitud de secuestrar el factor de transcripción E2F, y éste queda libre para unirse a la secuencia TTTCGCGC de los promotores de varios genes necesarios para la división y, además, al promotor de su propio gen (E2F), con lo cual se activa la transcripción de esos genes y por la retroalimentación se produce más E2F que refuerza esta acción (fig. 19-8). En una célula que no debe dividirse, la pRB no es fosforilada, de manera que al retener "secuestrado" al factor de transcripción E2F, inhibe la prosecución del ciclo celular.[16]

Hay un camino alternativo al de la proteína pRB; es una proteína semejante, la p107, que actúa "secuestrando" otros factores de transcripción similares, los E2F 4 y 5, de tal manera que es posible una mayor flexibilidad en el control del ciclo, el cual es posiblemente modulable en diferentes tejidos.

La pérdida, abolición funcional o disminución funcional de la pRB debe traducirse necesariamente (si no funciona el camino alternativo) en la activación desregulada de los genes dependientes del factor de transcripción E2F, y de esa manera la abolición de la función de la pRB facilita el desarrollo tumoral. A ello se agrega la intervención, muy importante, de otro factor clave del ciclo celular: la proteína p53.

La proteína p53 y su papel supresor del desarrollo tumoral

La proteína p53 es un factor de transcripción, altamente conservado en el curso de la evolución biológica, producto de un gen localizado

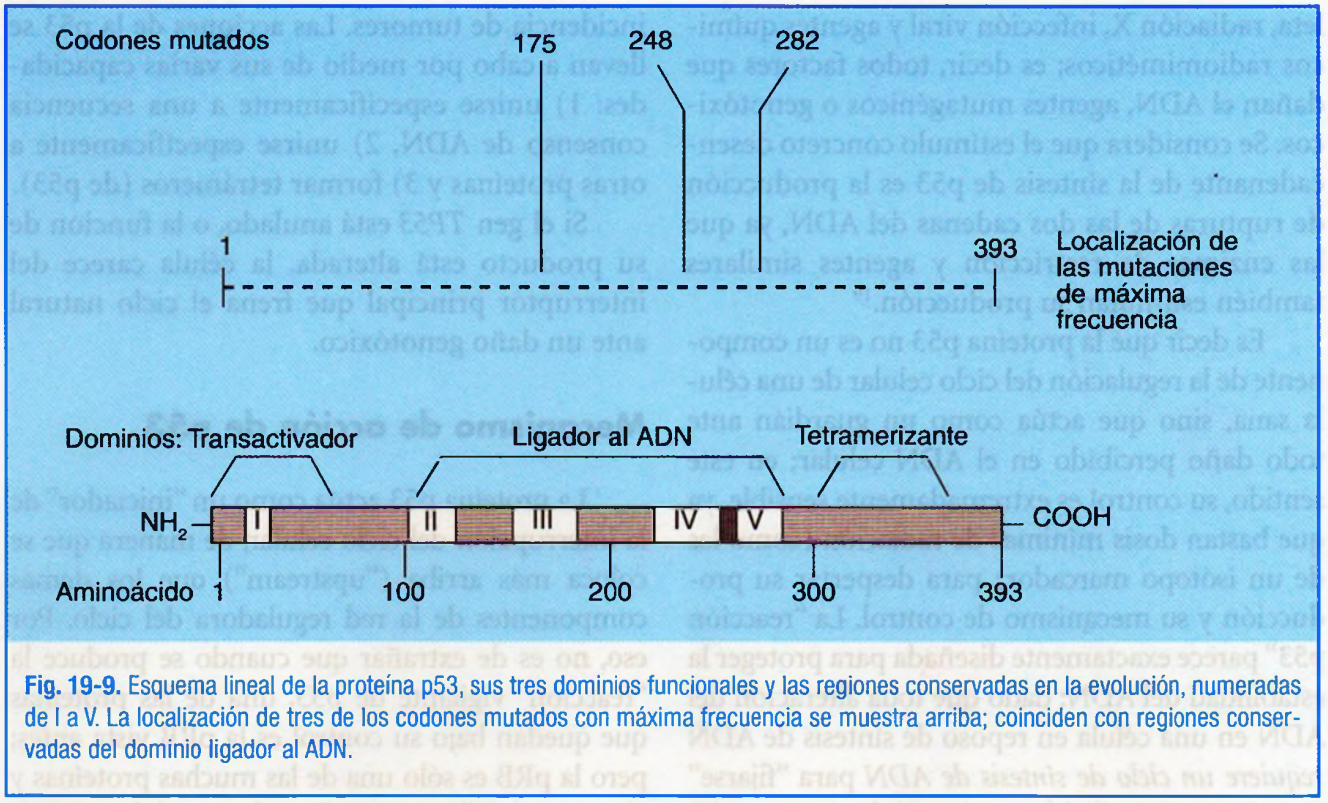


Fig. 19-9. Esquema lineal de la proteína p53, sus tres dominios funcionales y las regiones conservadas en la evolución, numeradas de I a V. La localización de tres de los codones mutados con máxima frecuencia se muestra arriba; coinciden con regiones conservadas del dominio ligador al ADN.

en el cromosoma 17p13.1, y que se encuentra abolida funcionalmente en más del 50% de los tumores malignos, por lo cual se ha sugerido que es uno de los principales elementos "supresores" del desarrollo tumoral. También es característico de la p53 que muchos tipos de mutaciones supriman su actividad normal, en especial las mutaciones de "cambio de sentido" que sólo cambian un aminoácido y que en otros genes supresores, como la pRB, no suprimen la función de la proteína. Una enfermedad hereditaria muy rara, el *síndrome de Li-Fraumeni*, caracterizado por múltiples tumores mamarios y de otros tejidos, es producida por la transmisión del gen mutado de la p53 (gen *TP53*).[17]

La región del cromosoma 17, que contiene el gen *TP53* presenta alteraciones en numerosos tipos de cáncer como el cáncer de pulmón, el cáncer de colon, el mamario y muchos otros. En estos casos se ha observado que el paso de un tumor no invasor a uno maligno se acompaña de la abolición de la función de p53 en *ambos* alelos del gen, es decir que si uno de los genes estaba mutado en el estado de tumor benigno, es necesaria la pérdida de la función del segundo gen (llamada *pérdida de heterocigosidad* en oncología) para su desarrollo maligno. Por otro lado, se ha observado la predominancia de ciertas clases de mutación del gen *TP53* en tumores específicos, por lo cual es de interés el conocimiento de las funciones específicas de cada región de la proteína p53. Esta proteína ha podido ser estudiada en su forma espacial, lo cual ha revelado ciertas características de las mutaciones que se producen en ella.[18] La casi totalidad de las mutaciones de p53 recaen sobre los dominios centrales ligadores de oncoproteínas y también ligadores al ADN normal (fig. 19-9). La proteína p53 forma oligómeros en condiciones normales, es sumamente inestable (tiene una vida media de sólo 20-35 minutos) y presenta cinco regiones conservadas con el transcurrir de la evolución biológica (en numerosos organismos) y tres dominios funcionales: el de transactivación, el ligador al ADN y el de tetramerización.

Función normal de la proteína p53: interruptora del ciclo celular

La proteína p53 existe en muy bajas concentraciones en los núcleos de células normales, pero su concentración aumenta notoriamente ante una serie de "estímulos": radiación ultravio-

leta, radiación X, infección viral y agentes químicos radiomiméticos; es decir, todos factores que dañan el ADN, agentes mutagénicos o genotóxicos. Se considera que el estímulo concreto desencadenante de la síntesis de p53 es la producción de rupturas de las dos cadenas del ADN, ya que las enzimas de restricción y agentes similares también estimulan su producción.[19]

Es decir que la proteína p53 no es un componente de la regulación del ciclo celular de una célula sana, sino que actúa como un guardián ante todo daño percibido en el ADN celular; en este sentido, su control es extremadamente sensible, ya que bastan dosis mínimas de radiación (como las de un isótopo marcador) para despertar su producción y su mecanismo de control. La "reacción p53" parece exactamente diseñada para proteger la estabilidad del ADN: dado que toda alteración del ADN en una célula en reposo de síntesis de ADN *requiere un ciclo de síntesis de ADN* para "fijarse" como una mutación (véase cap. 8), la proteína p53 *interrumpe* el ciclo celular, impidiendo que se fije la mutación. Para cumplir esta función, la proteína p53 puede interrumpir el ciclo en cualquiera de los períodos: G1, S o G2-M. Dado que en cada período del ciclo hay ciclinas directoras diferentes y sus quinasas especiales, la magnitud de la interrupción causada por la p53 es notable, pero esto se explica porque la p53 actúa a través de un inhibidor "universal" de prácticamente todas las quinasas dependientes de ciclinas, la proteína p21 (véase más adelante). Otro interrogante es: ¿qué destino tiene una célula cuyo ciclo es interrumpido por la p53? La misma proteína 53 se encarga de ese destino: la p53 es capaz de iniciar el proceso de apoptosis de la célula, es decir, su muerte programada, con lo cual se elimina de manera definitiva la célula cuyo ADN estaba alterado.[19]

Lo mencionado con anterioridad se corrobora con el hecho de que los ratones con la anulación homocigótica (total) del gen *p53* pueden desarrollarse completamente, pero *sufren una altísima incidencia de tumores* (74% a los seis meses) comparados con sus hermanos normales. Esto significa que el ciclo mitótico puede desarrollarse sin la presencia de p53, pero a expensas de no contar con una "inspección de calidad del ADN" a cargo de ella, lo cual lleva a una gran incidencia de tumores. Las acciones de la p53 se llevan a cabo por medio de sus varias capacidades: 1) unirse específicamente a una secuencia consenso de ADN, 2) unirse específicamente a otras proteínas y 3) formar tetrámeros (de p53).

Si el gen *TP53* está anulado, o la función de su producto está alterada, la célula carece del interruptor principal que frena el ciclo natural ante un daño genotóxico.

Mecanismo de acción de p53

La proteína p53 actúa como un "iniciador" de la interrupción del ciclo celular, de manera que se coloca más arriba ("upstream") que los demás componentes de la red reguladora del ciclo. Por eso, no es de extrañar que cuando se produce la "reacción" vigilante de p53, una de las proteínas que quedan bajo su control es la pRB vista antes; pero la pRB es sólo una de las muchas proteínas y elementos génicos que sufren el control de p53. Dicho control parece establecerse básicamente mediante la activación del *gen p21* por parte de p53. La proteína p21 es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas y por su acción es capaz de inhibir los cambios necesarios para continuar el ciclo en cualquiera de los puntos críticos (fig. 19-10).

Este mecanismo probablemente es de rapidez insuficiente para actuar de inmediato en células en activa proliferación, por lo cual la p53 tiene, además, mecanismos directos: es capaz de unirse al factor de replicación del ADN, RPA, inhibiendo directamente la síntesis de ADN, y es capaz de desencadenar la muerte programada de la célula, por asociación directa con otras proteínas de ese circuito de apoptosis.[19] De esta manera, p53 cumple su papel de guardián, tanto en forma inmediata como mediata.

El camino regulador del erizo sónico (SHH) en el origen de algunos tumores

La vía de señales antes mencionada, Shh-Ptch-Gli (erizo sónico, parcheado y glioma) tiene múltiples funciones, por lo cual sus alteraciones pueden ocasionar diversos defectos del desarrollo embrionario y también pueden estar involucradas

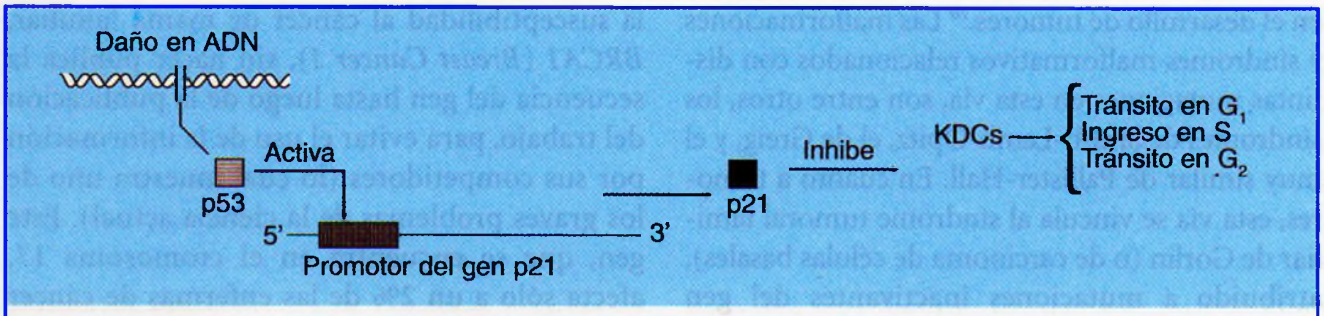


Fig. 19-10. Mecanismo de acción principal de p53. El daño en el ADN desencadena la producción de p53, que actúa como factor de transcripción del gen de p21. Éste da su producto, la proteína p21, que es un inhibidor universal de quinasas dependientes de ciclinas (KDC), con lo cual se frena el ciclo celular en varios de sus pasos.

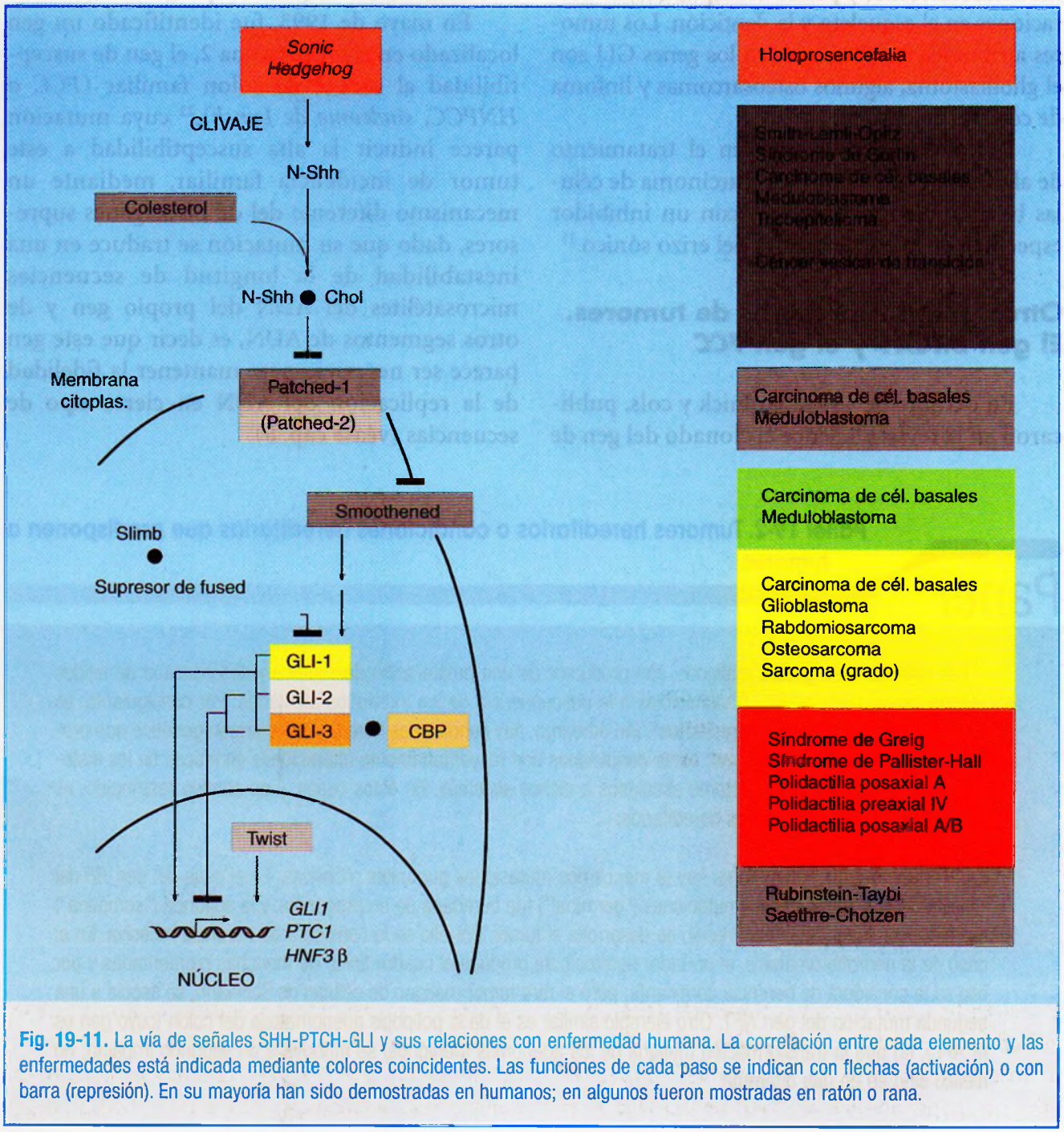


Fig. 19-11. La vía de señales SHH-PTCH-GLI y sus relaciones con enfermedad humana. La correlación entre cada elemento y las enfermedades está indicada mediante colores coincidentes. Las funciones de cada paso se indican con flechas (activación) o con barra (represión). En su mayoría han sido demostradas en humanos; en algunos fueron mostradas en ratón o rana.

en el desarrollo de tumores.[20] Las malformaciones y síndromes malformativos relacionados con distintas mutaciones en esta vía, son entre otros, los síndromes de Smith-Lemli-Opitz, el de Greig, y el muy similar de Pallister-Hall. En cuanto a tumores, esta vía se vincula al síndrome tumoral familiar de Gorlin (o de carcinoma de células basales), atribuido a mutaciones inactivantes del gen *PTCH1*, y los tumores esporádicos atribuidos a mutaciones en los genes *PTCH1*, *PTCH2* y *SMOH*. El síndrome de Gorlin presenta un riesgo incrementado de desarrollar meduloblastomas y rabdomiosarcomas y puede acompañarse de alteraciones en el esqueleto y la dentición. Los tumores atribuidos a mutaciones en los genes GLI son el glioblastoma, algunos osteosarcomas y linfoma de células (fig. 19-11).

Estudios recientes sugieren el tratamiento de algunos de estos tumores (carcinoma de células basales, meduloblastoma) con un inhibidor específico de la vía de señales del erizo sónico.[21]

Otros genes represores de tumores. El gen *BRCA1* y el gen *FCC*

En octubre de 1994, Skolnick y cols. publicaron en la revista Science el clonado del gen de la susceptibilidad al cáncer de mama familiar, *BRCA1* (*Breast Cancer 1*), sin hacer pública la secuencia del gen hasta luego de la publicación del trabajo, para evitar el uso de la información por sus competidores (lo cual muestra uno de los graves problemas de la ciencia actual). Este gen, que se encuentra en el cromosoma 17, afecta sólo a un 2% de las enfermas de cáncer mamario y parece no estar asociado con el desarrollo del tumor en los casos no familiares, que constituyen el 95% del total. Su mecanismo de acción se vincula con la reparación de fracturas del ADN (véase cap. 8).

En mayo de 1993, fue identificado un gen localizado en el cromosoma 2, el gen de susceptibilidad al cáncer de colon familiar (*FCC* o *HNPCC, síndrome de Lynch*),[22] cuya mutación parece inducir la alta susceptibilidad a este tumor de incidencia familiar, mediante un mecanismo diferente del de otros genes supresores, dado que su mutación se traduce en una inestabilidad de la longitud de secuencias microsatélites del ADN del propio gen y de otros segmentos de ADN, es decir que este gen parece ser necesario para mantener la fidelidad de la replicación del ADN en cierto tipo de secuencias (véase cap. 8).

Panel 19-2. Tumores hereditarios o condiciones hereditarias que predisponen a tumores

Panel

Los tumores, benignos o malignos, son productos de una proliferación desmedida y desordenada de tejidos somáticos; como tales, no son transmisibles a la descendencia de los individuos afectados. Por consiguiente, es discutible referirse a "tumores hereditarios". Sin embargo, hay condiciones heredables de origen genético que predisponen a ciertos tipos de tumores; estas condiciones son mayoritariamente alteraciones genéticas de los sistemas de reparación del ADN y factores asociados a dichos sistemas. En estos casos, y en sentido restringido, es posible referirse a ciertos tumores hereditarios:

1. En el origen de muchos tumores hay al menos dos mutaciones puntuales recesivas. En el caso del gen *RB* del retinoblastoma, una de estas mutaciones ("germinal") fue heredada de un progenitor, y la segunda ("somática") fue posterior, luego de la cual recién se desarrolla el tumor. Por ello se lo considera de herencia recesiva. En el caso de la neurofibromatosis, el portador heterocigota produce el cuadro típico de manchas pigmentadas y por ello se la considera de herencia dominante; pero el raro tumor maligno de células de Schwann, se asocia a una segunda mutación del gen *NF1*. Otro ejemplo similar es el de la poliposis adenomatosa del colon (cuyo gen es el *APC*), en que la transformación maligna de los adenomas (benignos) se atribuye a un segundo impacto, no alélico sino en un gen diferente.

2. Existen los "síndromes tumorales familiares" cuyo origen consiste en mutaciones presentes en las células germinales, transmisibles en forma dominante, por un individuo (heterocigota) afectado, al 50% de su descendencia. Habitualmente los tumores se desarrollan recién en la vida adulta, por lo cual los afectados llegan a tener descendencia y transmitir la mutación de generación en generación. Se han identificado los genes involucrados, lo cual ha permitido realizar diagnósticos moleculares antes de desarrollarse los tumores, incluso en etapas prenatales. Los tumores ocurren en diversos tejidos, según cuál sea el impacto adicional al gen heredado. Se los distingue por la diversidad de los tejidos afectados por los tumores.

Algunos de los síndromes de tumores "hereditarios" más estudiados y conocidos, por su relativa frecuencia y la importancia de su diagnóstico temprano se resumen en el cuadro 19-1.

Cuadro 19-1. Algunos síndromes de "tumores hereditarios"

Enfermedad	Genes	Producto	Función	Ubicación del tumor	Herencia
MEN1 [Wermer]	*MEN1*	Menina	Supresor tumoral	Hipófisis, páncreas paratiroides	AD (AR+LOH)
MEN2 [Sipple]	*RET*	RTK	Receptor de tiros. quinasa autoactivado	Tiroides,médula suprarrenal [megacolon]	AD (+otra mutación
Síndrome de Li-Fraumeni	*TP53, CHK2*	TRP53, prot. quinasa	Quinasa 2 reguladora del ciclo	Sarcomas, mama, cerebro, próstata	AD (+ otra?)
Síndrome de Lynch, HNPCC	*MSH2, MLH1*	MutS homologo	Reparación errores ADN	Colon, endometrio, piel, otros	AD
Síndrome de Fanconi	*FANCA-FANCN*	Múltiples integrantes	Reparación errores ADN	Leucemia [Dismorfias]	AR
Ataxia-telangiectasia	*ATM*	A-T *mutated*	PI3K quinasa fosforilación	Leucemia, [telangiectasia ataxia cerebelosa]	AR
Síndrome de Seckel	*ATR*	A-T-*and RAD3 rel.*	PI3 quinasa; fosforilación	Leucemia [Retardo mental]	AR
MEN4	*CDKN1B*	Kip1/p27	Inhibidor de CDK	Hipófisis, paratiroides	AD
Síndrome de von Hippel-Lindau	*VHL*	Proteína de 213 aa	Supresor tumoral	Retina,cerebelo, riñón, suprarrenal	AD (AR+LOH)
Retinoblastoma	*RB*	pRB	Supresor tumoral	Retina, osteosarcoma	AR [2° impacto]
Síndrome de Cowden	*PTEN*	Fosfatasa	Supresor tumoral	Piel, mama,tiroides, endometrio, GI, SNC	AD
Síndr.Bannayan-Riley-Ruvalcaba	*PTEN*	Fosfatasa	Supresor tumoral	Mama (raramente)	AD
Xeroderma pigmentoso	*XPA-XPG*	Helicasa, endonucl.	Reparación sistema REN	Piel (basocelular)	AR
Gorlin-BCNS	*PTCH1*	Receptor	Señalización	Ca.basocel., meduloblast.	AD

MEN = neoplasias endocrinas múltiples. BCNS = síndrome del nevus de células basales. RTK = receptor de quinasas de tirosinas. PI3K = fosfoinositol-3 quinasa. LOH = pérdida de heterocigosidad.

RESUMEN

Las células tumorales tienen típicamente alteraciones del genoma. Se acepta que el desarrollo tumoral requiere la acumulación de varias mutaciones sucesivas en un linaje celular, no menos de dos y usualmente entre cuatro y seis. Un primer paso en la evolución tumoral pueden ser los tumores benignos, en los cuales ya existe alguna mutación, como en la neurofibromatosis 1 y la esclerosis tuberosa; en esta última el gen *TSC2*, cuyo producto es la tuberina, con actividad GTPásica, es heredado en su forma alterada como una mutación dominante. En los tumores (hamartomas) se observa la pérdida del alelo normal (pérdida de heterocigosidad) en las células tumorales. Los oncogenes son genes promotores del crecimiento celular, que se originan en los protooncogenes, genes normales de las células que codifican quinasas de proteínas con dominios de receptores o si ellos. Los protooncogenes dan lugar a oncogenes virales cuando son capturados por el genoma de un retrovirus y puestos bajo control de promotores virales; pero principalmente dan lugar a los oncogenes celulares por mutación o por transposición cromosómica. El retinoblastoma es un tumor de los niños de 1 a 3 años (raramente de adultos), que en su forma hereditaria es dominante y que se debe a la mutación o pérdida del gen *RB* del cromosoma 13q14.2. Las células del tumor han perdido la función del alelo normal. El producto del gen *RB*, la proteína pRB, desempeña un papel regulador del ciclo celular en células normales, por lo cual este gen es un típico "supresor" de tumores. La pRB tiene cuatro dominios, de los cuales los centrales le sirven para unirse y "secuestrar" el factor de transcripción E2F, con lo que se inhibe la progresión del ciclo celular. A su vez, la función de la pRB depende de su estado de fosforilación, que es efectuada por quinasas dependientes de ciclinas. La proteína p53 funciona como protectora de la fijación de mutaciones interrumpiendo el ciclo celular ante la presencia de daño en el ADN, y es uno de los supresores tumorales más importantes. El gen *TP53* está alterado en las células de más del 50% de los tumores malignos. La proteína p53 actúa como factor de transcripción activando el gen de la p21, el cual por medio de su producto inhibe las quinasas dependientes de ciclinas y detiene el ciclo celular; además, actúa directamente sobre el complejo de replicación del ADN inhibiéndolo y, en ciertas condiciones, estimula el circuito de muerte celular programada (apoptosis). Otros genes vinculados con el desarrollo tumoral son el *BRCA1* y el *FCC*.

Los tumores hereditarios se transmiten en generaciones sucesivas habitualmente por recibirse un gen mutado (u otra alteración del ADN) de un progenitor al descendiente, y luego ocurrir una mutación subsiguiente en otro alelo (o en otro gen no homólogo). Los tumores puede aparecer tempranamente pero lo usual es que se manifiesten tardíamente.

REFERENCIAS

1. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Nati Acad Sci USA 1971;85:1590-1594.
2. Dix D. The role of age in cancer incidence: an epidemiological study. J Gerontol 1989;44:10-18.
3. Bell DW. Our changing view of the genomic landscape of cancer. J Pathol 2010;220:231-243.
4. Hoeijmakers , JH. DNA Damage, Aging, and Cancer. New Eng J Med 2009;361:1475-1485.
5. Kreeger PK, Lauffenburger DA. Cancer systems biology: a network modeling perspective. Carcinogenesis 2010;32(1): 2-8.
6. Sampson JR, Harris PC. The molecular genetics of tuberous sclerosis. Human Mol Genet 1994;3:1477-1480.
7. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. N Engl J Med 2006;355:1345-1356.
8. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews Cancer 2009;9:153-167.

9. Pleasance ED et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. Nature 2010b;463: 191-196.
10. Haber DA, Settleman J. Drivers and passengers. Nature 2007;446:145-146.
11. Spitz MR, Bondy ML. The evolving discipline of molecular epidemiology of cancer. Carcinogenesis. 2010 Jan;31(1):127-134. Epub 2009 Dec 18.
12. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. New Eng J Med 2008;359:2143-2153.
13. Shlien A, Maikin D. Copy number variations and cancer susceptibility. Curr Opinion Oncol 2010;22:55-63.
14. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. Carcinogenesis 2010;31: 9-18.
15. Hollingsworth RE, Hensey CE, Lee W-H. Retinoblastoma protein and the cell cycle. Current Opin Genet Develop 1993;3:55-62.
16. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 1995;81:323-330.
17. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ iine p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. Science 1990;250:1233-1238.
18. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. Science 1994;265:346-355.
19. Cox LS, Lane DP. Tumor suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. BioEssays 1995;17:501-508.
20. Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic-hedgehog-Patched-Gli pathway in human development and disease. Am J Hum Genet 2000;67:1047-1054.
21. Dlugosz AA, Talpaz M. Following the hedgehog to new cancer therapies. Editorial. NEJM 2009;361:1202-1205.
22. Barrow E, Alduaij W, Robinson L, Shenton A, Clancy T, Lalloo F, et. al. Colorectal cancer in HNPCC: cumulative lifetime incidence, survival and tumour distribution. A report of 121 families with proven mutations. Clin Genet 2008;74:233-242.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Takahashi C, Kanazawa N, Yoshikawa Y, Yoshikawa R, Saitoh Y, Chiyo H, et. al. Germiine PTCH1 mutations in Japanese basal cell nevus syndrome patients. J Hum Genet 2009;54:403-408.

8. Pleasance ED et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. Nature 2010b;463: 191-196.
10. Huber DA, Settleman J. Drivers and passengers. Nature 2007;446:145-146.
11. Split MR, Bondy ML. The evolving discipline of molecular epidemiology of cancer. Carcinogenesis. 2010 Jan;31(1):127-134. Epub 2009 Dec 18.
12. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. New Eng J Med 2008;359:2143-2153.
13. Siegfried JM, Stabile LP. Estrogen receptor signaling in cancer: Insights into cellular and molecular mechanisms of breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther. 2010 Jul;10(7):1109-1124.
14. Ahmadi SE, Soltani M, Kashi A, Shirzad M. Hedgehog signaling pathway: an attractive target for cancer therapy and challenges ahead. Expert Rev Anticancer Ther. 2021 Jun;21(6):617-635.
15. Hollingsworth RE, Wong K. Tumor suppressor genes: New perspectives and opportunities. Curr Drug Targets. 2007 Jul;8(7):862-879.
16. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 1995;81:323-330.
17. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science 1990;250:1233-1238.
18. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. Science 1994;265:346-355.
19. Cox LS, Lane DP. Tumor suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. Bioessays 1995;17:501-508.
20. Villevalcocio EH, Waterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic-hedgehog-Patched-Gli pathway in human development and disease. Am J Hum Genet 2000;67:1047-1054.
21. Duperez AA, Tejpar M. Following the hedgehog to new cancer therapies. Editorial. NEJM 2009;361:1202-1205.
22. Barrow E, Alduaij W, Robinson L, Shenton A, Clancy T, Lalloo F, et al. Colorectal cancer in HNPCC: cumulative lifetime incidence, survival and tumour distribution. A report of 121 families with proven mutations. Clin Genet 2008;74:233-242.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

Takahashi C, Kawazawa M, Yoshikawa Y, Yoshikawa R, Saitoh Y, Ohiye H, et al. Germline PTCH1 mutations in Japanese basal cell nevus syndrome patients. J Hum Genet 2009;54:403-408.

Capítulo 20

Aspectos éticos, sociales y legales en genética humana

Reproducción.
Etapa embrionaria y fetal. Vida perinatal o posnatal temprana.
Consulta genética. Pesquisa genética. Salud pública.
Ética de la investigación en Genética.
Aspectos legales.

INTRODUCCIÓN

La Genética Humana, y en especial su aplicación en Medicina, presenta una variedad de situaciones y de temas en debate de índole bioética. En este capítulo se mencionarán algunos ejemplos de las situaciones problemáticas que se pueden presentar en la práctica de la Genética en Medicina, y se dará una idea de las opciones posibles que se podrán ofrecer en cada caso específico. No se tratarán temas propios de la deontología (normas del ejercicio profesional) que corresponden a otros ámbitos.

Algunas de las situaciones posibles tienen implicancias para el individuo o su entorno familiar (microbioética), mientras que otras corresponden al ámbito social, ya sea en lo cultural, en lo jurídico, o en lo político (mesobioética o macrobioética).

Para ilustrar mejor la variedad de situaciones que se pueden presentar, usaremos la reconocida definición de los principios bioéticos, propuesta hace más de 30 años.[1] Son los del respeto por la autonomía (respeto por las decisiones de las personas); de la no maleficencia (el principio *primum non nocere* del código hipocrático); el de la beneficencia (proveer el bien), y el de justicia (normas para distribuir en forma justa los beneficios, riesgos y costos). Estos principios rigen fundamentalmente la conducta y decisiones personales (autonomía), las del profesional actuante (beneficencia, y no maleficencia), y las de la sociedad y las autoridades públicas (justicia).

Las cuestiones que se presentan en este capítulo plantean reflexiones sobre áreas muy variadas, pero que convergen en cada planteo específico. Por un lado, se encuentra la atención profesional de la salud (por parte de médicos, profesionales de enfermería, de rehabilitación y de psicología). Por otro lado se hallan las temáticas propias del servicio social, los problemas del ámbito filosófico, del religioso, del jurídico-legal, y del legislativo y político. Por ello, a menudo se debe recabar la asistencia de expertos en varias disciplinas, o bien presentar la cuestión ante un Comité de Ética, integrado por diversos profesionales y miembros de la comunidad.

Aquí no se intenta dar respuestas a todos los interrogantes, pues podrán depender de cri-

terios que varían según las circunstancias; sólo se desea alertar que existen, y que podrán requerir decisiones fundadas en argumentos sólidos, a veces basados en las conclusiones de debates y opiniones de personas de diversos ámbitos.

Numerosos temas de la bioética, tales como los trasplantes de tejidos u órganos, las etapas finales de la vida, los conflictos en la relación entre profesionales y pacientes, y varios otros, no serán tratados por no corresponder a un texto como el presente.

Para una mejor comprensión de esta discusión, se han dividido los temas y ejemplos en las siguientes áreas:

- Reproducción: opciones y derechos reproductivos
- Desarrollo prenatal humano
- Vida posnatal temprana y niñez
- Consulta genética individual o familiar
- Temas de Salud Pública
- Cuestiones de tipo legal y forense

Reproducción

Esta sección se refiere a las opciones y los derechos reproductivos; a la planificación familiar, la fecundación asistida y la vida embrionaria temprana.

Un ejemplo concreto sería el de una mujer de edad reproductiva avanzada (45 años) y su pareja, que desean tener un hijo. Sus opciones serían las siguientes: a) evitar embarazo debido a los riesgos atribuibles a su edad, y proceder a la adopción, legal o ilegal; b) buscar el embarazo y utilizar los métodos diagnósticos prenatales (véase más adelante) para decidir una eventual interrupción del embarazo, legal o ilegalmente (depende del país); c) arriesgar un embarazo sin estas medidas diagnósticas porque no les serán de utilidad para cambiar su conducta; d) gestionar la donación de un óvulo de mujer joven, fecundado por esperma del marido; e) otras opciones más complejas. Cada una de estas opciones presenta sus aspectos positivos o ventajosos, y sus riesgos o inconvenientes que deberán ser *explicados por el genetista.*

La llamada *planificación familiar* implica situaciones muy diversas: en algunos países (como en China) se dispuso por ley que, salvo en casos excepcionales, una pareja sólo puede tener un hijo o hija, para frenar el crecimiento excesivo de la población. Esto excede el marco del ejercicio profesional del genetista individual.

En un sentido opuesto, en muchos países europeos preocupa la baja tasa de nacimientos, por lo cual la población nativa se está reduciendo (tasa de nacimientos por vida fértil de una mujer menor de 2,1). En la Argentina la tasa es más baja que en la mayor parte de los países latinoamericanos; actualmente se estima en un 2,3 hijos por etapa fértil de una mujer. Se plantean las opciones sociales entre a) la decisión totalmente libre y sin intromisión de la autoridad, b) alentar y hasta subsidiar las medidas que favorecen la fertilidad y desalientan o prohíben los métodos anticonceptivos, c) apoyar (o al contrario, limitar) los subsidios y la protección a las familias numerosas y d) penalizar (de alguna manera) los nacimientos o embarazos excesivos.

Es demostrativo de la gran variedad de situaciones recalcar que existen lugares donde el aborto inducido está totalmente prohibido y penalizado; otros lugares donde es admitido bajo ciertas circunstancias como el riesgo de vida materno, y finalmente existen lugares donde no hay ninguna restricción al aborto salvo el criterio puramente médico. Las responsabilidades en las decisiones variarán según el lugar, desde aquellas de los progenitores solos, los profesionales a cargo de su salud física y mental, hasta las de las personas en cargos públicos (salud, legisladores, justicia). Para la Genética Humana y la Bioética, todo esto se relaciona con los eventuales efectos genéticos de la decisión reproductiva sobre la salud del descendiente, y el estatus de éste en cuanto a sus necesidades de protección y sus derechos.[2]

Otros temas con implicancias en genética reproductiva, ética y jurisprudencia son los siguientes:

A) la relación de la edad materna avanzada con un mayor riesgo de no disyunción cromosómica y también un mayor riesgo de pérdida espontánea del embarazo, bien evidenciada

en los casos de síndrome de Down y otras trisomías (véase cap. 17).

B) la relación de la edad paterna avanzada con un mayor riesgo de mutación de novo (véase cap. 8, panel 8-1).

C) los indicios de que algunos métodos de reproducción asistida (ICSI) puedan favorecer la ocurrencia de malformaciones en ciertas circunstancias (síndrome Beckwith-Wiedemann).[3]

D) el efecto de la congelación de embriones en los métodos de reproducción asistida, sobre su viabilidad e integridad física, y los cuestionamientos sobre si es éticamente aceptable su utilización o su descarte.[4]

Las opciones a nivel ético al respecto de D) son: a) que deba prohibirse su destrucción (lo incluyen algunos proyectos legislativos en la Argentina); b) que se admita su uso para fines de experimentación en temas del desarrollo humano; c) que puedan ser ofrecidos a parejas infértiles en un procedimiento análogo a la adopción; d) que se usen para producir células madre con el propósito de tratar enfermedades[5] (véase más adelante) y e) que se admita su descarte por no considerarse que tengan un estatus de persona jurídica.

E) la *donación de óvulos.* Las cuestiones que se han planteado tienen que ver con la posible remuneración de este servicio. Se ha argumentado que en vez de tratarse de una simple donación, si bien es una situación análoga a la de donación de sangre para transfusión, los inconvenientes (físicos u otros) ocasionados a la dadora de óvulos (medicación hormonal, intervención para extraer los óvulos) la hacen asemejar más a la donación de un órgano.[6] La ley argentina de trasplantes no admite el pago por la donación de un órgano como el riñón o la médula ósea, y por analogía excluye la remuneración citada.

Otros temas de bioética relacionados con la *fecundación asistida* se refieren a bancos de semen (anonimato de los donantes, riesgos posibles de consanguinidad) y al "alquiler de vientres" Son de indudable interés ético pero no directamente vinculados con Genética.

F) la *selección del sexo*: aunque no es admitida oficialmente en ningún país, hay evidencias de que se está practicando ampliamente en algunos países en forma oculta, favoreciendo el sexo masculino (India), aunque esta práctica es más frecuente de lo que se cree habitualmente.

G) el *diagnóstico preimplantatorio* tiene sus fundamentos y también eventuales riesgos.[7] Se lo ha utilizado para la selección de embriones compatibles ("bebé medicamento"), con el propósito de realizar una eventual donación de sangre del cordón umbilical (células troncales), o un trasplante de médula ósea u otros órganos o tejidos, a un hermano o hermana ya enfermo/a por una enfermedad hereditaria. Implica descartar los embriones que no cumplen los criterios de compatibilidad. La decisión de usar este método implica, además de su evidente costo económico, considerar la licitud o no de buscar un bebé con un definido propósito, y descartar a los no adecuados[8] aunque sean sanos.

H) hay casos de *discapacidades preferidas* por los progenitores para sus hijos (sordera, acondroplasia). Algunos progenitores prefieren tener a sus propios hijos igualmente limitados (discapacitados) como son ellos. Esto ha ocurrido concretamente en familias con ambos padres con acondroplasia, o ambos con sordera. El dilema se presenta entre el deseo o la preferencia de los padres, y la vida futura del hijo/hija que haya sido buscado específicamente de acuerdo con ese deseo.[9]

La eugenesia

El término eugenesia, acuñado por Francis Galton en 1883 y luego definido por él en 1904 para describir los esfuerzos para "mejorar la raza humana" ha perdido su sentido original, para llegar a indicar esfuerzos para "mejorar algunas razas humanas en detrimento de otras" por lo cual se tiende a no utilizarlo más en los textos de Genética. En una decisión lamentable en 1927, la Corte Suprema de los Estados Unidos avaló la decisión de un estado de realizar la esterilización compulsiva de una mujer (Carrie Buck) que su-

puestamente padecía retraso mental. Legislaciones eugenésicas similares fueron aplicadas también en varios países europeos en las primeras décadas del siglo XX; el caso más conocido es el de la Alemania bajo el régimen nazi. No sólo hubo (y todavía hay en muchos lugares) evidencia de discriminación del tipo racial, sino también social y sexual. La genética ha sido utilizada como pretexto para fundamentar muchas de estas ideas aberrantes.[10]

La "eugenesia" o las prácticas eugenésicas están específicamente prohibidas por los códigos de la casi totalidad de los países. Sin embargo, desde un punto de vista puramente teórico, hay intelectuales influyentes que propician o consideran inevitables ciertas prácticas de tal tipo.

El espectro de un eventual posible "mejoramiento" (*enhancement*) genético del embrión mediante ingeniería genética fue bien expuesto en la película *GATTACCA*. Otro, más actual y real, es el ofrecimiento de una clínica en Los Ángeles, para optar por procrear un niño con ciertos rasgos físicos (color de piel, pelo y ojos). La mayoría de los autores rechazan estas opciones, pero hay algunos que las aceptan con argumentos que podrían ser tenidos en cuenta.[11,12]

Desde un punto de vista de la Biología Evolutiva, la idea de ir creando subpoblaciones humanas con rasgos elegidos (mayor estatura, cociente intelectual o habilidades especiales) es un tema de profunda preocupación; y dado que la especiación se origina a partir del momento en que la meiosis es incompatible (esterilidad híbrida) y los actuales avances en meiosis (véase cap. 12) han identificado genes de bloqueo meiótico, la posibilidad de la creación de una subespecie humana no cruzable con la nuestra no parece más ser irrealizable en el futuro. Este tema merece un profundo debate que está más allá de esta obra.

Etapa embrionaria y fetal

Hay diversos temas éticos vinculados con la etapa embrionaria humana:

A) Se dispone de *medidas ambientales* preventivas de malformaciones que tienen variable eficacia según sea el tipo de medida, la población en la que se aplican y el grado de cumplimiento de ésta con las indicaciones (adherencia). Los ejemplos son algunas vitaminas, la nutrición materna, algunos tóxicos ambientales, la edad materna. Esta preocupación, fundamentada pero a menudo excesiva y potencialmente productora de ansiedad indebida, requiere una consideración y un conocimiento profundo por parte de los obstetras, genetistas y psicólogos.[13]

B) El *diagnóstico prenatal* se realiza sobre muestras de vellosidades coriónicas obtenidas por biopsia de la placenta, células del líquido amniótico obtenido por punción, en sangre materna (diversas sustancias químicas, células fetales o ADN fetal), y con ecografías de alto nivel de resolución (véanse caps. 17 y 18). El objetivo principal es el de dar tranquilidad a los consultantes en cuanto a la ausencia de las alteraciones genéticas que son preocupación concreta del caso. El procedimiento invasivo (punción) implica ciertos riesgos pequeños para la continuación del embarazo, que deben ser debidamente informados a la consultante antes de efectuarla. En ciertas instancias podrá justificarse tal estudio con el objetivo de decidir la conducta obstétrica en el parto. Algunas de las indicaciones se consideran aceptables, mientras que otras demandas son consideradas como irrazonables. Esto puede ser motivo de conflicto cuando alguien demanda un diagnóstico prenatal que médicamente no está indicado o no se lo considera razonablemente justificado.

C) El *feto anencefálico*. El embarazo con feto anencefálico se suele diagnosticar por ecografía con alta precisión, en el cuarto mes. Su ocurrencia es relativamente frecuente (~ 1‰), y su pronóstico 100% letal en etapa fetal tardía o posnatal temprana; produce un efecto psicológico profundo en la mujer y su familia, por lo cual se hacen necesarios un apoyo y orientación adecuados. Aun cuando en varias jurisdicciones del país se han aceptado las interrupciones de estos embarazos basándose en que se trata de una situación

irreversiblemente fatal, la decisión al respecto deberá ser tomada por la mujer embarazada en conjunto con su pareja y el médico que la atiende.[14]

D) El *resultado prenatal imprevisto*, que obliga a un replanteo de las decisiones. Un caso relativamente frecuente es el hallazgo, cuando se busca descartar una trisomía autosómica, y se encuentra en cambio un cariotipo XXY (síndrome de Klinefelter). Este cuadro, que es una afección con poca repercusión clínica, excepto la dificultad procreativa (véase cap. 17), suele provocar ansiedad a los padres prospectivos quienes acuden a la consulta genética. Los genetistas y los obstetras suelen tener diferentes maneras de asesorar en estos casos. Las decisiones al respecto suelen ser muy variadas, según muestra un estudio europeo.[15]

Vida perinatal o posnatal temprana

A) *Tamizaje* (*pesquisa*, "screening") neonatal para alteraciones genéticas o congénitas (véase la sección de Pesquisa Neonatal en el cap. 14). La tendencia actual en muchos países es extender la lista de alteraciones analizadas a 20 o 30 determinaciones simultáneas en una muestra de sangre obtenida por punción del talón del recién nacido. Ello implica diversas consideraciones de índole ética, confrontando las motivaciones estrictamente médicas con los intereses comerciales de los que las ofrecen.

B) Recién nacido gravemente afectado: posible *ensañamiento terapéutico.*

Se presentan frecuentes planteos relacionados con la decisión de su tratamiento: cirugía, terapia intensiva, estimulación temprana, o sólo paliativo. El niño indicado con el apellido ficticio "Doe" fue un recién nacido en la década de 1980, con síndrome de Down y una malformación del esófago que obstruía el paso de alimento por esa vía. Los médicos indicaron la cirugía para permitir la alimentación, a pesar del riesgo elevado de tal tratamiento en un recién nacido y con los déficits propios del síndrome. Los padres se oponían a que se operara al niño, para evitarle un sufrimiento que ellos consideraban excesivo, aun sabiendo que no podía sobrevivir sin poder alimentarse. Pidieron amparo a la Justicia. El caso suscitó una enorme discusión en los círculos médicos, jurídicos y gubernamentales del país (Estados Unidos) y obligó a establecer normas precisas para encarar tales casos.

A raíz de un caso similar reciente en nuestro país, afectado de trisomía 18 y múltiples malformaciones en el que se consideró que un tratamiento intensivo sería fútil y significaría un ensañamiento terapéutico, fueron publicados dos comentarios expertos de un eticista y un filósofo del derecho (Jurisprudencia Argentina 2007;IV: 86-96).

C) Los *registros de malformaciones* en recién nacidos existen en casi todos los países, con diversas metodologías y fundamentaciones. Fueron motivados en su mayoría por la epidemia de malformaciones causadas por la ingestión de talidomida por las madres durante las etapas tempranas de su embarazo en los años 1959 al 1961 (véase cap. 2). Uno de los primeros registros a nivel multinacional fue el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC)[16] que funciona con sedes en Río de Janeiro, Buenos Aires y La Plata; otros existen en México, España (ECEMC) y en varios países europeos y asiáticos.

D) El recién nacido con *genitales ambiguos* plantea difíciles enfoques, decisiones médicas, cuestiones sociales y situaciones legales. Sus múltiples variantes requieren que las decisiones se efectúen de común acuerdo entre los progenitores, los profesionales y consultores de diversas disciplinas. Como ejemplos podrán servir los casos de hermafroditismo verdadero: deben obtenerse un diagnóstico y un pronóstico precisos, efectuar una decisión en cuanto a la asignación de sexo, realizar o no la eventual corrección quirúrgica y elegir el momento más adecuado para ello. Podrá ser temprano, realizarse antes de comenzar la

escuela, antes de la pubertad, o al adquirir la plena libertad de decisión.

Cada una de estas opciones tiene su fundamentación y sus inconvenientes; se trata de producir el mayor beneficio posible (principio de beneficencia), con el menor sufrimiento y daño posible (principio de no maleficencia).

Será indispensable resolver quién debe tener la última palabra en cada situación: el niño, sus padres, los profesionales, o los jueces. Lo ideal será lograr un consenso entre todos ellos.

Consulta genética individual/familiar

A) *Asesoramiento genético.* El asesoramiento (o "consejo") genético es un acto profesional en el que se informa al (o los) consultante(s) sobre su diagnóstico, su posible evolución y pronóstico, sus riesgos reproductivos y sus opciones terapéuticas o preventivas. Implica diversas connotaciones éticas, tales como el respeto por la dignidad y los valores de las personas, sus creencias, sus fantasías e interpretaciones de la realidad, y su confidencialidad y privacidad. Este acto médico incluye varios aspectos de tipo ético.

B) El dilema de cómo *informar riesgos* (elevados, medianos y mínimos). No sólo interesan las cifras porcentuales (p. ej., 25% de riesgo de un hijo homocigota de una pareja de portadores heterocigotas). Lo que determina la magnitud del riesgo es, en primer lugar, la gravedad de la afección y la manera como la perciben los involucrados.

C) Las opciones de los padres en cuanto a *cirugía del tipo "cosmético"* en sus niños, por ejemplo la corrección del epicanto palpebral en los niños con síndrome de Down. En tales casos debe tenerse en cuenta no sólo el deseo de los padres de hacer a su niño menos llamativo ante el público, sino presumiblemente también para favorecer al mismo niño, aunque es difícil apreciar hasta qué grado ello le produce alguna satisfacción. La decisión dependerá de los valores individuales de las personas involucradas.

D) *Las pruebas genéticas* ("genetic testing") disponibles para el público y su comercialización (véase cap. 14).

El término "pesquisa" u otro equivalente (tamizaje, detección, cribado, *screening*), de uso común en medicina y en particular en Genética Humana, se refiere, en general, a la determinación de algún marcador, indicador o alteración, que denote la presencia de una situación particular (rasgo, enfermedad, variante, o simplemente riesgo), en personas o poblaciones definidas. Los métodos de búsqueda son múltiples: en Genética Humana se refieren a las descripciones del fenotipo físico y psicológico, a estudios de imágenes, de laboratorio químico, electrofisiológicos, microscópicos, y de análisis moleculares (véanse caps. 3 al 8).

El tamizaje en general se aplica a poblaciones grandes, a veces definidas ampliamente por límites de geografía, edad, sexo u origen étnico. Es usado habitualmente para comprobar la normalidad en la mayoría de los individuos, y hallar a aquellos individuos, relativamente raros en la población, que podrían beneficiarse (ellos, su familia y la sociedad) con el hallazgo de un resultado "positivo" (cuadro 20-1).

Criterios o normas para efectuar pesquisas

En el año 1968, la OMS publicó un trabajo que propuso los criterios para realizar estudios de pesquisa de enfermedades, desde la perspectiva de las autoridades de Salud Pública. Las condiciones propuestas por los autores son las siguientes, aplicables a todo estudio de pesquisa:

1. La enfermedad que se busca debe constituir un problema importante de salud pública.
2. Debería existir un tratamiento aceptado para las afectados.
3. Deberían estar disponibles las facilidades para el diagnóstico y tratamiento.
4. Debería existir un estadio latente o sintomático temprano reconocible.
5. Debería haber disponible una prueba o examen apropiados y fiables para el caso.

Cuadro 20-1. Ejemplos de pesquisa y de pruebas genéticas

Tipo de pesquisa	Dirigido a	Clasificac.	Ámbito	Ejemplos
Neonatal	Rec.nacidos	Obligat.	Poblacional	FCU, hipotiroidismo, FQ
Diag.prenatal	Embarazadas	Optativo	Embarazadas	Trisomías, DTN
Preimplantatorio	Progenitores	Optativo	Casos espec.	Mutaciones específicas
Predictivo	Pers. en riesgo	Optativo	Personal	Huntington, cáncer prost.
Portador sano	Pers. en riesgo	Optativo	Grupos de riesgo	Tay-Sachs, talasemia
Farmacogenómica	Pers. medicada	Indic. méd.	Farmacología	Anestésicos, antibióticos
Telómeros	Poblac. general	Optativo	Personal	Predicción de sobrevida
Identidad	Casos judiciales	Indic. judic.	Huellas ADN	Paternidad, crímenes
Cosmética	Poblac. general	Optativo	Progenitores	Selección p. color de pelo

FCU=fenilcetonuria; FQ=fibrosis quística; DTN=defecto de tubo neural.

6. La prueba o examen debería ser aceptable para la población.
7. La evolución natural de la enfermedad, incluso su progresión desde la etapa latente a la etapa manifiesta, debería ser adecuadamente conocida.
8. Debería haber una norma consensuada sobre quiénes serán tratados como pacientes.
9. El costo de la pesquisa deberá ser económicamente balanceado en relación con el costo global de la atención médica de la población.

En Genética Humana se dispone de diversas pruebas diagnósticas para las múltiples alteraciones genéticas existentes; obviamente es impensable ofrecer todas ellas a todo el mundo. La sola existencia y su disponibilidad ocasiona diversos dilemas y conflictos de tipo ético. Como ejemplo, la pesquisa neonatal para algunas enfermedades que pueden ser tratadas eficientemente desde el nacimiento, es obligatoria en muchos países. Los dilemas éticos se plantean frente a esa obligatoriedad, que puede ser vista como coercitiva, y también frente a la creciente tendencia a incluir cada vez más enfermedades en la pesquisa, aun aquellas que son de bajísima prevalencia.[17]

Otras cuestiones que se plantean en la consulta genética son las siguientes:

E) *Confidencialidad o privacidad.* Es la protección y resguardo de los datos genéticos personales. En todo acto médico que utiliza datos sensibles, y especialmente en el caso de los datos genéticos personales, es de suma importancia mantenerlos bajo estricto resguardo. Los términos utilizados en estas circunstancias, confidencialidad y privacidad, se refieren en general a los datos que le han sido comunicados (o confiados) al profesional, y a los datos surgidos de la consulta.[18,19]

F) *El derecho de saber y el de no saber.* Una persona que expresa el deseo de no ser informada de su posible alteración (o su riesgo) deberá ser respetada en su deseo. La situación más conocida es la de la enfermedad de Huntington, pero existen otras en las cuales se ha planteado el mismo dilema (véase cap. 9).

G) *Casos de pedidos de cambios de orientación sexual.* Se trata de una de las situaciones más exigentes en el ámbito de la genética médica, puesto que la decisión de indicar una asignación de sexo y los tratamientos respectivos

dependen mucho de la precisión del diagnóstico y del pronóstico por parte del especialista en genética. Se requiere la colaboración de expertos en varias disciplinas diferentes, o un comité de ética, quienes puedan aportar información valiosa a la Justicia, que suele tener que opinar. Las opciones que se le presentan a una persona con insatisfacción o duda sobre su identidad sexual podrán consistir en: a) estudios genéticos (examen clínico, determinación del tipo de gónada presente, cariotipo y eventual presencia o no del gen *SRY* y otros); b) consulta psicológica minuciosa; c) información precisa y clara al individuo (y los familiares en caso de ser menor); d) tratamiento hormonal cuando sea apropiado, con consentimiento plenamente informado y comprendido; e) tratamiento quirúrgico, también con consentimiento de la persona (y si es posible, otros involucrados) y f) reconocimiento eventual del cambio del sexo civil en los documentos públicos.

H) El caso de la genealogía, o una prueba de laboratorio, reveladora de *datos no buscados.* En una consulta genética pueden surgir datos y riesgos no explícitamente buscados por los consultantes. Se plantea la disyuntiva de si deben ignorarse o bien ser comunicados, a pesar de ser posible motivo de ansiedad y bochorno. Una variante con consecuencias potencialmente serias sería la revelación de no paternidad ignorada (en un estudio molecular, p. ej., por síndrome de Klinefelter). Tal información, no solicitada pero considerada indispensable, exige conducir la información con extrema cautela.

I) *Comunicación de riesgos,* a familiares no consultantes. Cada vez que se descubre un caso de mutación hereditaria en una persona y en su familia próxima, surge la posibilidad de que existan otros parientes en la genealogía más amplia, quienes puedan estar en riesgo de desarrollar o transmitir esa alteración sin saberlo. Como ejemplos están las mujeres posibles portadoras del gen de la distrofia muscular Duchenne; las mujeres con posible riesgo de poseer la mutación del gen *BCRA* causante de una parte minoritaria de cáncer; los parientes de un caso de la enfermedad de Huntington, y los posibles portadores de translocación cromosómica balanceada.

La decisión reproductiva del que se sabe portador no afectado pero con riesgo de transmitir una alteración grave a sus descendientes podrá ser variable (adoptar, arriesgar embarazo, pedir diagnóstico prenatal, realizar inseminación artificial en su pareja), pero estas opciones deberían ser encaradas antes de efectuar los procedimientos.

J) *Decisiones terapéuticas* (medicamentos, cirugía correctiva, cirugía estética) y objeción de conciencia. Como en toda situación de conflicto entre la solicitud por parte del paciente y la conciencia y convicción del profesional, éste podría excusarse de actuar en ciertas circunstancias, siempre que ello no produzca un daño mayor a aquél. En algunos casos de alteración de origen genético, pueden ocurrir situaciones en las cuales el profesional recurrirá a esta objeción.

K) *Genómica personal.* Después de los dos primeros genomas individuales íntegramente secuenciados que fueron los de Craig Venter y de James Watson, se procedió a analizar los genomas íntegros de un individuo chino (dinastía Han), uno africano (yoruba) y tres europeos. Poco después se completó el de un coreano, y recientemente se publicó la secuenciación de dos africanos más, uno de una tribu bosquimana y uno de la etnia bantú de Sudáfrica. Los dilemas bioéticos que ello plantea son mútiples: ¿Cuáles podrían ser las indicaciones para hacerlo? ¿Quién los indicará? ¿Quién interpretará los resultados? ¿Cuál posible utilidad, beneficio o incluso riesgo puede significar la información obtenida? ¿Cómo se archivará o guardará esta información (secuencia de 3×10^9 nucleótidos individuales), junto con regiones de mayor importancia (exones, promotores, marcas epigenéticas, marcadores de enfermedades, susceptibilidades a infecciones o a tumores, mutaciones recesivas en heterocigosis, incluso indicios de muerte prematura)? Al reducirse el costo a menos de 1.000 dólares, se podrá utilizar incluso

para diagnósticos de una enfermedad monogénica.[20]

L) *Células madre* (*células troncales*, stem cells) para eventual tratamiento de diversas enfermedades.

En este tema la discusión bioética se centra principalmente en dos aspectos: el uso de embriones humanos ("sobrantes" de fecundación asistida –véase arriba– u obtenidos mediante tecnología basada en la reprogramación de células somáticas de personas adultas) y la selección mediante fecundación asistida de embriones que puedan contribuir al tratamiento de un hermano/a enfermo/a (véase arriba).

Las investigaciones sobre las células madre originan toda una serie de cuestiones de índole bioética.[6]

Salud pública

Se han expresado varias opiniones, preocupaciones, y visiones sobre el futuro de la humanidad, en relación con los adelantos tecnológicos, científicos, y en el ámbito de la Genética Humana. Una de las más evidentes es si los enormes adelantos técnico-científicos en el campo de la genética podrán contribuir a mejorar la salud general de la población a nivel mundial, o al contrario, serán agentes de una mayor discriminación entre los de mayor y los de menor poder económico, político o social.[21-23]

A) *Medidas obligatorias indicadas por autoridades de Salud Pública*: frente a la libertad pretendida de las personas.

La pesquisa neonatal obligatoria es un ejemplo de la intervención del Estado en la vida privada de los ciudadanos (véase panel 14-4). Otras son la vacunación obligatoria (para ciertas enfermedades) y la fortificación de los alimentos (harina) para prevenir malformaciones y enfermedades en el recién nacido. Esta situación es análoga a la fluoración del agua potable y la comercialización obligatoria de la sal yodada. Estas medidas tienen su justificación bien fundamentada, pero a veces producen objeciones fundadas en argumentos basados en la autonomía. Las decisiones deben ser tomadas con pleno conocimiento de los beneficios y también de los riesgos o inconvenientes que ello implica. Cuando se dispone de datos fiables y experiencias previas, para las medidas preventivas de malformaciones (como la ingestión de ácido fólico para la prevención de malformaciones fetales), la sociedad o las autoridades de Salud tienen diversas opciones: a) campañas de difusión intensivas a la población en general; b) ofrecimiento gratuito del medicamentos en dispensarios y otras instituciones oficiales; c) administración compulsiva al estilo de la vacunación obligatoria; o bien d) introducción de la sustancia en alimentos de consumo masivo (fortificación).[24]

En los Estados Unidos se optó por fortificar los cereales habituales del desayuno; en otros países (en particular en varios latinoamericanos) se fortifica la harina de trigo o de maíz; en la mayoría de los países europeos se prefirió usar, difusión mediante, campañas de información al público y a los profesionales de la salud.

Hasta ahora, 20 años después de la publicación seminal que dio origen a estas medidas, los resultados más prometedores fueron los de los países que fortifican los alimentos (p. ej., Chile, República Argentina y Brasil, en los que los defectos del tubo neural disminuyeron en un 40-50%).

Algunas cuestiones éticas son las que plantean la justificación o no de imponer una ingestión no voluntaria de sustancias por parte de personas que no las necesitan (sexo masculino, personas ancianas) ni se les ofrece la alternativa de obtener estos alimentos sin fortificar.

B) La *discriminación* sobre la base de diferencias genéticas: racial, de empleo, en seguros, en la escolaridad.

La discriminación, directa o indirecta, puede tener profundos efectos sobre las personas como individuos, familias, grupos sociales y etnias.[25] Algunas formas son insidiosas y no fácilmente evidenciables, por lo cual la refle-

xión ética deberá ser permanente, en particular en genética humana.

C) *Genómica poblacional y étnica*: los grandes biobancos genómicos y sus planteos éticos y legales.

Se han establecido amplios estudios poblacionales destinados a conocer la variación genómica humana y sus asociaciones con enfermedades. Las motivaciones aducidas son para la investigación y como servicio ofrecido al público. Podrán aportar información valiosa, y de hecho sus datos aparecen en múltiples publicaciones científicas en los últimos años. Se plantea la cuestión del uso de las muestras aportadas por los individuos para fines específicos, o para cualquier propósito; su almacenamiento indefinido o su descarte una vez efectuado el estudio, y su identificación apropiada sin invadir la privacidad. Con la información tan detallada será muy difícil mantener el anonimato y la privacidad de las personas.[26] Los ejemplos de biobancos genómicos más grandes (y algunos proyectados) son: Islandia, 270.000 registros (empresa DeCODE), Islas Tonga, 108.000, Reino Unido, 500.000, Estonia, 1.400.000.

D) *Otros estudios poblacionales*, con enfoque más limitado, son los encaminados hacia variaciones hereditarias individuales en la forma de metabolizar los medicamentos: mediante la disciplina de la farmacogenómica se espera que se podrán reducir los múltiples casos de reacciones adversas a medicamentos en personas con mutaciones en los mecanismos de su metabolización.

E) *Ética en la investigación en Genética. Patentamiento de genes.* La creciente presión por parte de la industria biotecnológica para obtener patentes sobre sus descubrimientos en genómica humana han originado múltiples opiniones adversas y algunas favorables. Se trata de lograr un consenso sobre cuestiones de enorme influencia, tanto a nivel de la salud humana como en los aspectos económicos, políticos y legales. Se ha insistido en la forma clara e inequívoca en que debe estar formulado el consentimiento informado por parte de los sujetos que participan en estas investigaciones.[27]

F) *Ecotoxicología.* Los factores ambientales nocivos se han incrementado en las últimas décadas, por el creciente acúmulo de productos químicos de diversos orígenes: fertilizantes y pesticidas agrícolas, aditivos alimentarios, desechos industriales. Se ha estimado en 10.000 el número de productos nuevos que se introducen cada año en el ambiente (aire, suelo, agua). No todos, ni siquiera una proporción importante, son sometidos a análisis toxicológicos y genotóxicos apropiados. La legislación existente no alcanza a controlar todos estos riesgos, y la responsabilidad del profesional de la salud dependerá de los conocimientos e informaciones de los que pueda disponer.

La introducción de organismos genéticamente modificados para lograr mejores cualidades de los productos, o para evitar daños por diversas plagas, ha provocado fuertes polémicas sobre la justificación o no de su uso. El énfasis ético se aplica principalmente sobre la honestidad y veracidad de los datos por parte de ambos campos enfrentados, y en la evaluación de la magnitud de los beneficios en comparación con los eventuales efectos desfavorables, los actuales y los previsibles para las generaciones futuras.[23]

G) *Equidad en el acceso* a los adelantos recientes y costosos en el campo de la genética. Uno de los temas básicos de la bioética es el de velar por la justa distribución y asignación de los recursos en salud (siempre insuficientes), evitando así la lamentable inequidad de acceso que sufre la población.[28] Las autoridades enfrentan el dilema entre remunerar mejor a su personal, aumentar la cantidad de profesionales, mejorar los ámbitos de atención y los insumos, o resolver los casos de urgencias con mayor eficiencia (principio bioético de justicia).

H) *Comunicación. Periodismo científico y seudocientífico.* Es indiscutible la necesidad de un papel responsable del periodismo y otros medios públicos (cine, literatura) en informar al público en forma veraz, completa y

comprensible. El lenguaje periodístico debe ser suficientemente claro y comprensible para el lector no profesional. Es fundamental evitar confusiones en la interpretación de las informaciones científicas, tanto por el periodista insuficientemente ilustrado, como por el público receptor.[29]

La motivación fundamental detrás del periodismo es la de informar al mayor número posible de individuos sobre cuestiones que puedan interesarles, en este caso sobre su salud y sobre avances en la investigación, relacionados con Genética Humana. Para alcanzar el máximo número posible de destinatarios, el periodismo (sea escrito, auditivo o combinado [TV, Internet y otros]) utiliza a menudo énfasis y exageraciones, sensacionalismo, títulos llamativos, medias verdades e incluso falsedades y datos erróneos. Esto constituye uno de los problemas harto frecuentes en la difusión de informaciones científicas que ya de por sí resultan difíciles de exponer y esclarecer a personas no expertas. Lamentablemente, para la mayoría de los periodistas resulta lo mismo publicar datos científicamente bien fundamentados, como los de muy dudosa procedencia y justificación. Un ejemplo cabal de esto ha sido la extraordinaria difusión que se le dio a la película argentina *XXY* en el año 2007, pese a que tanto su título como su contenido presentaban una serie de falsedades y conceptos genéticos erróneos que inducían a interpretaciones equivocadas del síndrome representado por el cariotipo XXY.

En una visión más amplia que apunta a vislumbrar hacia dónde nos pueden conducir los enormes adelantos en genética molecular, y las consecuencias previsibles sobre el futuro de la especie humana, se han expresado opiniones profundas y ampliamente fundamentadas.[23]

Derecho

A) La Declaración Universal sobre Genoma y Derechos Humanos[30] publicada en 1997 contiene varios de los temas que se han expuesto en este texto. Su redacción fue ampliamente comentada y, aunque pueda tener algunas falencias, se recomienda su estudio detenido.

B) *Demandas de personas con discapacidades.* Hubo casos de demandas por progenitores de tales personas, por no habérseles informado de la posibilidad del diagnóstico prenatal. Otros, por el contrario, manifiestan públicamente su oposición a que se recomiende el diagnóstico prenatal, con el argumento de que ello constituye una forma de discriminicación. Cuando se les ofrece un diagnóstico prenatal para un defecto de tubo neural (DTN, p. ej., espina bífida) con el propósito de abortar el embarazo si fuera positivo, lo consideran como que estos padres no quieren a ese futuro hijo con esa afección (algo así como "oferta y demanda" o como consumidores y mercancía).

C) *Privacidad, confidencialidad, identidad.* Además de su mención más arriba, en relación con la protección de los datos médicos personales, este tema tiene su implicancia jurídica, sobre todo en vista de la legislación sobre la protección de los datos personales.[31] En la Argentina existen la Ley 25.326, de protección de datos personales (llamada también de *Habeas Data*), un Banco Nacional de Datos Genéticos creado por la Ley 23.511 y ampliado por Ley 26.548 y la Comisión Nacional por el Derecho a la Identidad (CONADI), creada por la Ley 25.457.

D) *Filiación de personas* (posible parentesco de personas adoptadas ilegalmente, paternidad disputada, búsqueda de personas secuestradas). En agosto de 2009, la Corte Suprema de la Nación argentina avaló una decisión judicial que ordenó la obtención de muestras de material biológico que permita la identificación de una persona mediante análisis de ADN, sospechada de ser descendiente de personas secuestradas y/o desaparecidas durante la dictadura militar de 1976-83, aun en contra de la voluntad de esa persona, e incluso ordenando invadir su domicilio y secuestrar sus elementos personales. La justificación fue la de privilegiar el derecho de los familiares

de conocer la identidad biológica de esa persona. La decisión produjo diversas opiniones en distintos ámbitos jurídicos y bioéticos.

E) *Genética forense.* Identificación de restos y materiales humanos.[32] Desde la década de 1980, con dos importantes avances en técnicas de laboratorio, se logró realizar estudios de alta precisión y fiabilidad sobre la base de pequeñas muestras de sangre o tejidos, para identificar la procedencia de esas muestras. Estos avances fueron: la técnica de PCR (véase cap. 3) y la de las "huellas de ADN".[33] Actualmente se logra identificar a personas (excepto sus gemelos monocigóticos) con una fiabilidad mayor que 99,99%, y se logró un establecimiento de bases de datos de ADN como instrumento en la Justicia, mediante la identificación molecular y el registro de criminales sospechados.[34]

F) Genética al servicio de *control de alimentos.* Los análisis genéticos (moleculares u otros) pueden utilizarse también para la protección de la población humana, al indagar posibles contaminaciones foráneas de alimentos u otros elementos de utilización por seres humanos. Esto constituye otro ejemplo de la función de la autoridad sanitaria y de la Justicia en la protección de los ciudadanos.[35]

RESUMEN

Las reflexiones del tipo ético son parte integrante de toda actividad Humana y especialmente en el desempeño del profesional de la salud humana. Como tal, la Genética Humana en general y la Genética Médica en particular se enfrentan continuamente con dilemas y planteos de índole ética. Las situaciones surgen principalmente en la atención de personas que presentan alteraciones de origen hereditario o heredable y las que están en riesgo de presentarlas, y tienen que ver con las decisiones diagnósticas, pronósticas, terapéuticas y de orientación procreativa. En este último ámbito, el de las decisiones procreativas, se presentan los múltiples dilemas relacionadas con la planificación, orientación preconcepcional, atención durante el embarazo, perinatal y posnatal, y el asesoramiento genético de las familias. En el aspecto profesional en general, debe destacarse la importancia de la docencia a nivel individual, familiar o público, mediante un lenguaje sencillo y claro, pero a la vez completo y verídico. Muchas de las cuestiones planteadas requieren colaboración por parte de otros profesionales o expertos en temas tan diversos como psicología, rehabilitación, laboratorios especializados, ciencias sociales, filosofía y derecho. Cada situación individual requerirá un análisis profundo y detenido por parte del profesional interviniente y de los que hayan sido consultados. No existen normas rígidas que indiquen la manera de resolver cada caso. Con más intensidad que en otras áreas de la salud, en Genética se trata de desafíos planteados no sólo por una persona con una alteración hereditaria, sino también de la salud de sus descendientes, y de otros familiares, presentes o futuros. Los adelantos en Genética Humana de hoy y mañana tendrán repercusión sobre la salud de la humanidad en todo el siglo presente.

REFERENCIAS

1. Beauchamp TL, Childress JF. Principles of biomedical ethics. 5th ed. Oxford University Press: New York; 2001.
2. Johnston J. Tied up in Nots over genetic parentage. In: Regulating Reprogenetics. Hastings Center Report 2007;37(4):Jul-Ago:28-31.
3. Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, Amor D J. Beckwith-Wiedemann Syndrome and IVF: A Case-Control Study. Am J Hum Genet 2004 September; 75(3): 526-528.
4. Guenin LM. (Harvard) Morality of unenabled embryo use. Commentary. Mayo Clin Proc 2004;79:801-808.
5. Green RM. Can we develop ethically universal embryonic stem-cell lines? Nat Rev Genet 2007;8(6):480-485.
6. Johnston J. Paying egg donors. Hastings Center Report 2006;36(1):28-31.
7. Fritz MA. Perspectives on the efficacy and indications for preimplantation genetic screening: where are we now? Hum Reprod 2008 Dec;23(12):2617-2621.
8. Turner S. Preimplantation genetic diagnosis for donor babies carries some harm. BMJ 2002;324:976-977.
9. Epstein, CJ. 2001 William Allan Award Address. From Down syndrome to the "human" in "human genetics". Am J Hum Genet 2002 Feb;70(2):300-313.
10. Nagel Rosa. Genética, razas y eugenesia. Ciencia Hoy 2008(Jun-Jul);18(105):18-26.
11. Hall A, et al. Prenatal genetic screening for cosmetic features. http://www.phgfoundation.org/news/4507/
12. Velázquez Jordana JL. ¿Qué hay de inmoral en modificar la naturaleza humana? Revista Latinoamericana de Bioética 2007;8(13):118-123.
13. Lyerly AD, et al. Risk and the pregnant body. Hastings Center Report 2009;39(6):34-42.
14. Comité de Ética del Hospital Privado de Comunidad. La anencefalia como problema bioético. Mar del Plata: Suárez; 2008.
15. Hall S, et al. Counselling following the prenatal diagnosis of Klinefelter syndrome: comparisons between geneticists and obstetricians in five European countries. Community Genet 2001;4:233-238.
16. Castilla EE, Orioli IM. ECLAMC – the Latin-American collaborative study of congenital malformations. Community Genet 2004;7:76-94.
17. Caulfield T, Wertz D. Creating needs? A Review of survey data and concerns relevant to the commercialization of genetic testing. Community Genet 2001;4: 68-76.
18. Coupland R, Martin S, Dutli M-T. Protecting everybody's genetic data. Comment. Lancet 2005;365:1754-1756.
19. Roche PA, Annas GJ. DNA Testing, Banking, and Genetic Privacy. N Engl J Med 2006;355:545-546.
20. Lifton RP. Individual genomes on the horizon. Editorial. N Engl J Med 2010;362:1235-1236.
21. Penchaszadeh VB. Genética y Salud Pública. Ciencia e Saúde Colectiva 2002;7:33-36.
22. Halliday JL, Collins VR, Aitken MA, Richards MPM, Olsson CA. Genetics and public health evolution, or revolution? J Epidemiol Community Health 2004;58:894-899.
23. Neel JV.Some ethical issues at the population level raised by 'soft' eugenics, euphenics, and isogenics. Hum Hered 2000 Jan-Feb;50(1):14-21.
24. Roubicek M. ¿Es posible implementar un programa de prevención de defectos congénitos en nuestro país? En: Bergel SD, Cantú JM. Bioética y Genética: II Encuentro Latinoamericano de Bioética y Genética. Buenos Aires. Buenos Aires: Ciencia Argentina; Buenos Aires 2000. p. 337-346.
25. Morrison PJ. Insurance, unfair discrimination, and genetic testing. Comment. Lancet 2005;366:877-880.
26. Greely HT. The uneasy ethical and legal underpinnings of large-scale genomic biobanks Annu Rev Genomics Hum Genet 2007;8:343-364.
27. Nuffield Council on Bioethics. The ethics of patenting. DNA. A discussion paper. London, 2002. http://www.nuffieldbioethics.org
28. Cappelen A W, Norheim OF, Tungodden B. Genomics and equal opportunity ethics. J Med Ethics 2008;34:361-364.
29. Dentzer S. Communicating medical news – pitfalls of health care journalism. N Engl J Med 2009;360:1-3.
30. Unesco: Declaración universal sobre el genoma y los derechos humanos http://www.unal.edu.co/dib/normas/etica_genoma.html.
31. Lunshof JE, Chadwick R, Vorhaus DB, Church GM. From genetic privacy to open consent. Nat Rev Genet 2008;9(5):406-411.
32. Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. Annu Rev Genomic Hum Genet 2003;4:119-141.
33. Jeffreys AJ, Wiison V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature 1985;316(6023):76-79.
34. Lojo MM. Base de datos de ADN. Instrumento indispensable para la justicia penal. Ciencia Hoy 2007;17(98) 98. (Abr-May):58-64.
35. Posik DM, Ripoli MV, Peral García P, Giovambattista G. El veredicto de la genética. Ciencia Hoy 2007;17(98):51-57.

REFERENCIAS

1. Beauchamp TL, Childress JF. Principles of biomedical ethics. 5th ed. Oxford University Press: New York; 2001.
2. Johnston J. Trial up to [illegible] genetic paramtage. In: Regulating [illegible] Hastings Center Report 2007;37(4):Jul-Aug:28-31.
3. Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, Amor D J. Beckwith-Wiedemann Syndrome and IVF: A Case-Control Study. Am J Hum Genet 2004 September; 75(3): 526-528.
4. Guenin LM. (Harvard) Mentality of unneeded embryo use. Commentary, Mayo Clin Proc 2004;79:801-808.
5. Green RM. Can we develop ethically universal embryonic stem-cell lines? [illegible] Rev Genet 2007;8(6):480-485.
6. Johnston J. Paying egg donors. Hastings Center Report 2006;36(1):28-31.
7. Reiz MA. Perspectives on the efficacy and indications for preimplantation genetic screening: where are we now? Hum Reprod 2008 Dec;23(12):2817-2821.
8. Turner S. Preimplantation genetic diagnosis for donor babies carries some risks. BMJ 2002;324:978-977.
9. Epstein, CJ. 2001 William Allan Award Address. From Down syndrome to the "human" in "human genetics". Am J Hum Genet 2002 Feb;70(2):300-313.
10. Hegel Rosa. Genética, raza y eugenesia. Ciencia Hoy 2008(Jun-Jul);18(105):18-26.
11. Hill A, et al. Prenatal genetic screening for cosmetic features. http://www.prpjournal.org/news/4507/
12. Velasco-Jordana JL. ¿Qué hay de inmoral en modificar la naturaleza humana? Revista Latinoamericana de Bioética 2007;8(13):118-123.
13. Lipsky AD, et al. Risk and the pregnant body. Hastings Center Report 2009;39(6):34-42.
14. Comité de Ética del Hospital Privado de Comunidad. La anencefalia como problema bioético. Mar del Plata: Suárez; 2008.
15. Hill S, et al. Counselling following the prenatal diagnosis of Klinefelter syndrome: comparisons between geneticists and obstetricians in five European countries. Community Genet 2007;4:233-238.
16. Castilla EE, Orioli IM, ECLAMC – the Latin-American collaborative study of congenital malformations. Community Genet 2004;7:76-84.
17. Caulfield T, Watts D. Creating metis? A Review of survey data and consensus relevant to the commercialization of genetic testing. Community Genet 2001;4: 68-76.
18. Caulfield R, Martin S, Dudi M-T. Protecting everybody's genetic data. Comment. Lancet 2005;365:1754-1756.
19. Rocha PA, Annas GJ. DNA Testing, Banking, and Genetic Privacy. N Engl J Med 2008;365:545-546.
20. Lifton RP. Individual genomes on the horizon. Editorial. N Engl J Med 2010;362:1235-1236.
21. Penchaszadeh VB. Genética y Salud Pública. Ciencia e Salude Colectiva 2002;7:33-38.
22. Halliday JL, Collins VR, Aitken MA, Richards MPM, Olsson CA. Genetics and public health - evolution, or revolution? J Epidemiol Community Health 2004;58:894-899.
23. Neal JV.Some ethical issues at the population level raised by "soft" eugenics, eugenics, and isogenics. Hum Hered 2000 Jan-Feb;50(1):14-21.
24. Roubicek M. ¿Es posible implementar un programa de prevención de defectos congénitos en nuestro país? En: Bergel SD, Cantú JM. Bioética y Genética: II Encuentro Latinoamericano de Bioética y Genética. Buenos Aires. Buenos Aires: Ciencia Argentina; Buenos Aires 2000. p. 327-346.
25. Morrison PJ. Insurance, unfair discrimination, and genetic testing. Commentt. Lancet 2005;365:877-880.
26. Greely HT. The uneasy ethical and legal underpinnings of large-scale genomic biobanks Annu Rev Genomics Hum Genet 2007;8:343-364.
27. Rothstein Comment on Bioethics. The ethics of patenting DNA: A discussion paper. London, 2002. http://www.nuffieldbioethics.org
28. Cappelen A W, Rietveld CF, Tungodden B. Genomics and equal opportunity ethics. J Med Ethics 2008;34:381-384.
29. Denton S. Communicating medical news – pitfalls of health care journalism. N Engl J Med 2008;360:1-3.
30. Unesco: Declaración universal sobre el genoma y los derechos humanos http://www.wsis.edu.co/cib/normas/etica_genoma.htm#.
31. Lunshof JE, Chadwick R, Vorhaus DB, Church GM. From genetic privacy to open consent. Nat Rev Genet 2008;9(5):406-411.
32. Budowle B, Allard MW, Wilson MR. Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. Annu Rev Genomic Hum Genet 2003;4:119-141.
33. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific fingerprints of human DNA. Nature 1985;316(6023):76-79.
34. Lojo MM. Base de datos de ADN. Instrumento indispensable para la justicia penal. Ciencia Hoy 2007;17(98) 98. (Abr-May):58-64.
35. Polak DM, Ripoll MV, Pinel García P, Donambattista G. El veredicto de la genética. Ciencia Hoy 2007;17(98):51-52.

Glosario

Acéntrico: Referido a un fragmento cromosómico desprovisto de centrómero.

Aceptador (sitio): Extremo posterior o 3' de un intrón, que actúa durante el procesamiento del ARN transcripto en dos pasos; el segundo de ellos consiste en recibir el extremo anterior (sitio dador) y unirse a él para formar una molécula descartable con forma de lazo ("lariat").

Acondroplasia: Enanismo hereditario originado por mutación dominante del gen *R3FCF* (véase cap. 9).

Acrocéntrico: Dícese de un cromosoma cuyo centrómero está casi en un extremo (del griego *akros*: extremo).

Activador (referido a la transcripción génica): Proteínas intranucleares reguladoras de la transcripción, que se unen a la secuencia de un "intensificador" por "dedos de zinc" y forman puentes con los elementos del complejo de transcripción (véase cap. 5).

Adipocito: Célula adiposa especializada en la acumulación de grasas; sus variedades son el adipocito blanco y el pardo.

Aditivo (efecto aditivo): Dícese del efecto de los varios genes que determinan un carácter poligénico o cuantitativo, cuando sus contribuciones al fenotipo son aproximadamente iguales y se suman para producir el carácter.

ADN: Ácido desoxirribonucleico (DNA en inglés).

ADN_{dc}: ADN de doble cadena.

ADN-A, ADN-B, ADN-C, ADN-Z: Conformaciones de la molécula de ADN, que ésta puede adquirir de acuerdo con las variaciones fisicoquímicas de su entorno. La conformación habitual es la B.

ADNc, ADN complementario: ADN sintetizado a partir de ARNm mediante la transcriptasa inversa, que es complementario al ARNm y carece de intrones (véase cap. 3).

ADN recombinante, ADN mestizo: ADN producido mediante el pegado de fragmentos de distinto origen, usando enzimas de restricción y otros elementos de "ingeniería genética"

ADN superenrollado: Moléculas de ADN circular o cerrado que se tuercen sobre sí mismas y forman una espiral mayor (véase cap. 4).

Agarosa (electroforesis en geles de): Sustancia péctica derivada del agar-agar (de algas)

cuyos geles son muy usados para separar fragmentos de ácidos nucleicos en electroforesis.

Alcaptonuria: defecto genético de carácter leve, caracterizado por el ennegrecimiento espontáneo de la orina en pocas horas (véase cap. 14).

Albinismos (oculocutáneo y ocular simple): Defectos genéticos totales (oculocutáneo) o restringidos (ocular) de la pigmentación normal (véase cap. 20).

Alelo (también "alelomorfo"): Cada una de las formas alternativas que puede tener un gen. Cada uno de los alelos de un gen ocupa el mismo lugar o **locus** en un cromosoma (p. ej., alelo de la huntingtina normal y alelo de la huntingtina mutada).

Alelo normal (también "silvestre"): El gen normal, por oposición a los alelos mutantes. Cuando se reconocen varias formas de un alelo normal, se habla de un sistema de **alelos múltiples** (p. ej., los alelos de los grupos sanguíneos 0, A y B). Desde un punto de vista molecular, hay tantos alelos normales como variantes funcionales del gen, incluidas las formas polimórficas.

Alfoide: Tipo de ADN satélite que se encuentra localizado en los centrómeros de los cromosomas (véase cap. 4).

Alostérico (efecto): Distorsión de la estructura espacial de una proteína, generalmente una enzima, cuando se asocia con otra molécula; de esta distorsión surgen propiedades nuevas en la proteína "alostérica".

Alternativo (empalme alternativo): Producción de varios ARN mensajeros diferentes a partir del mismo transcripto primario, debido al uso de señales opcionales de empalme, y que finalmente da lugar a la producción de varias formas de la proteína (véase cap. 5).

Alu: Tipo de secuencia de bases del ADN, correspondiente a las "SINEs" (secuencias repetidas, cortas y dispersas) y que forman una "familia" de secuencias, muy abundantes en el genoma humano (véase cap. 4).

α-Amanitina: Octapéptido extraído del hongo *Amanita phalloides*, altamente tóxico e inhibidor de la transcripción por la polimerasa II.

"Ámbar": Nombre dado en genética de procariontes al codón de terminación UAG.

Ambigüedad (del código genético): La laxitud de reconocimiento entre señales de extremos de diferentes intrones en el empalme alternativo: el empalmosoma puede usar cualquiera de dichas señales.

Amelia: Malformación consistente en la falta de desarrollo de los miembros.

Aminoácidos (aa): Cualesquiera de los 20 tipos de moléculas que constituyen las proteínas.

Aminoacil-ARNt-sintetasa (enzima "activante"): Cada una de las 20 enzimas que catalizan, específicamente, la activación de un aminoácido y su unión a un ARNt.

Amplicones: Segmento de ADN amplificado natural o artificialmente (por RCP= PCR). Amplicones naturales se encuentran en el cromosoma Y (véase cap. 18).

Amplificación (de ADN por RCP): Multiplicación (en laboratorio) de un segmento de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Amplificación génica: Fenómeno natural que ocurre en ciertas células en las que se replica específicamente un sector genómico; patológicamente en los "diminutos dobles" (véase cap. 4).

Aneuploidía: Condición de no poseer el número normal de cromosomas (el conjunto "euploide"), que determina un defecto o un exceso de cromosomas.

Aniridia: Carencia congénita del iris, asociada con mutaciones del gen PAX6 (véase cap. 16).

Anotamiento (de un gen): localización exacta de la secuencia de bases de un gen, su descripción detallada y sus relaciones con otros genes y los productos génicos (véase cap. 6).

Anticipación: Fenómeno observado en la enfermedad de Huntington y en otras mutaciones por expansión de repeticiones de tripletes, por el cual la eclosión de la enfermedad o la gravedad de sus síntomas se incrementa en generaciones sucesivas (véase cap. 9).

Anticodón: Triplete de nucleótidos del ARNt que reconoce al codón del ARNm.

Anticuerpo: Proteína (inmunoglobulina) de muchísimos tipos, cada uno específico contra un antígeno determinado.

Antiparalelo: Condición de tener orientaciones opuestas (las dos hélices complementarias de una molécula de ADN) (véase cap. 4).

Antisentido (hélice del ADN; cadena positiva): Cadena o hélice que sirve de molde o templado para la transcripción del ADN y cuya secuencia de bases no es idéntica, sino complementaria al ARN transcripto. Por convención, al secuenciar ADN se escribe la secuencia complementaria (de sentido o negativa).

APC (Anaphase Promoting Complex): Complejo de proteínas esencial en la división celular (véase cap. 12).

Apoptosis: Muerte celular programada, ejecutada por un mecanismo propio de la célula.

Aquiasmático: Que no posee quiasmas; defecto de la meiosis.

Aquiropodia: Falta de desarrollo de los miembros originada en una mutación (véase cap. 2).

ARN de antisentido es un ARN complementario a un ARNm y que, por consiguiente, hibrida con ese mensajero inactivándolo.

Autosoma: Cualquier cromosoma que no sea un cromosoma sexual.

AZF (Azoospermic Factor): Región del cromosoma Y relacionada con azoospermia, que contiene tres segmentos (A, B y C) (véase cap. 18)

Azoospermia: Ausencia de espermatozoides en el semen.

BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), Cromosoma artificial en bacterias: Vector usado para vehiculizar segmentos de ADN humano en técnicas de Genética molecular. Se usan frecuentemente colecciones ("bibliotecas") de BACs que contienen, en conjunto, el genoma humano completo.

Bacteriófago (= fago): Virus que ataca y se hospeda en bacterias. P. ej.: fagos T; fago lambda.

Bandeado (cromosómico): Técnicas varias que consisten en demostrar un patrón de segmentos alternantes, claros y oscuros, a lo largo de cada cromosoma (véase cap. 17).

Base (referido a ácidos nucleicos): Cada una de las cuatro bases nitrogenadas (A, G, C y T) del ADN y las que posee el ARN. El tamaño de un segmento de ácidos nucleicos se mide por la cantidad de bases (o de pares de bases, pb, en el ADN).

Biotina: Coenzima y factor vitamínico de bajo peso molecular y muy fuerte afinidad por la proteína "avidina" por lo cual se usa en técnicas de hibridación "HISYF" (véase cap. 17).

Bivalente: Par de cromosomas homólogos, que conforman una unidad durante la primera división meiótica (véase cap. 12).

Blastocisto: Embrión esférico muy temprano, que aún está libre (no implantado en el útero) y posee una cavidad central.

Bromodominio (de proteínas nucleares): segmento especial de ciertas proteínas, que se asocia específicamente con histonas acetiladas, para la activación de un gen (véase cap. 7).

Buffer (del inglés): Solución de diversas sales usada como amortiguador de los cambios de pH en medios de cultivo y otras soluciones de uso biológico.

Cadena molde, templado, patrón, o antisentido (del ADN de cadena doble): Es la cadena seleccionada por la ARN polimerasa para servir de templado para la transcripción. Esta selección se hace porque la cadena posee la secuencia para asociarse con la polimerasa (secuencia promotora). En la cadena molde del ADN, el sentido de avance de la ARN polimerasa es de 3' a 5'. Sin embargo, por convención, para representar una secuencia de cualquier ADN se usa la otra cadena, llamada "de sentido codificante" o simplemente **de sentido**, porque en ella se lee la misma secuencia que en el ARNm y en la misma dirección, lo cual es muy práctico.

Cadena positiva (o negativa) del ADN de cadena doble: Convención usada en los actuales mapas de ADN humano (Mapviewer, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/-mapview/), para designar cada una de las dos cadenas (ambas contienen genes), por la cual la cadena que desde el telómero del

brazo corto corre hacia abajo (hacia el otro extremo) se denomina positiva, y la cadena que corre en sentido opuesto se denomina negativa.

Cadherinas: Proteínas de adhesión intercelular, que se unen también al ión calcio, importantes en la piel (como las desmogleínas y las desmocolinas) y otros epitelios.

"Caja" CAAT: Secuencia comúnmente encontrada en la región promotora de un gen, alrededor de 75 pares de bases previas al inicio de la transcripción (véase cap. 5).

"Caja homeótica", "homeocaja": Secuencia conservada de 180 pb que está presente en importantes genes reguladores del desarrollo embrionario temprano (véase cap. 16).

"Caja" TATA: Secuencia propia de la región promotora de muchos genes, que se asocia al factor de transcripción FTIID.

"CAL" (cromosomas artificiales de levadura, "YAC"): Vector de gran capacidad de transporte de ADN, usado en clonación de ADN (véase cap. 3).

"CAM" (cromosomas artificiales de mamíferos, "MAC"): Moléculas de ADN construidas en 1997 repegando fragmentos teloméricos, centroméricos y orígenes de replicación con otros segmentos de ADN y que son funcionales en la mitosis.

Caperuza (del ARNm): Grupo 7-metil-guanosina trifosfato, unido al extremo 5' del ARNm.

Cápside: Recubrimiento proteínico de muchos tipos de virus, formado por partículas similares.

Cariotipo: Conjunto ordenado de los cromosomas de un organismo determinado, clasificados por su forma, tamaño y estructura de bandas. El esquema de un cariotipo es el "idiograma" (véase cap. 17).

Centimorgan (cM): Unidad usada en los mapas de ligamiento, correspondiente a una distancia de separación entre dos genes que poseen una probabilidad de recombinar del 1%. En la especie humana 1 cM equivale aproximadamente a 1 Mb (véase cap. 11).

Céntrico (refiriéndose a estructura cromosómica): Relativo a la región centromérica. P. ej., "fusión céntrica"

Centrómero: Constricción primaria de un cromosoma, que separa sus brazos. La región centromérica usualmente contiene "heterocromatina" inactiva, con ADN de tipo "alfoide" y proteínas especiales. En su periferia está el "cinetocoro"

CGH, Hibridación genómica comparativa: Procedimiento técnico de Genética molecular por el ual se comparan dos muestras de genomas, mediante hibridación de sus ADN. Este procedimiento tiene varias variantes técnicas; una de las más utilizadas es mediante el uso de microarreglos de ADN que cubren todo un genoma; el microarreglo provisto comercialmente (de un control o persona normal) se usa para hibridar un genoma para comparar, por ejemplo proveniente de un enfermo, a fin de encontrar las diferencias (hibridación diferente) con el control. Si en vez de usarse ADN nativo del enfermo se usa ADN complementario, la hibridación resultante permite determinar su "perfil de expresión génica" es decir, el conjunto de sus ARN mensajeros. Otra variante de la CGH es usar este procedimiento para una preparación microscópica, es decir, un "FISH"

Chaperona molecular: Proteína acompañante, necesaria para el plegamiento o el tráfico intracelular de otras proteínas, sin intervenir en las funciones de estas últimas.

Chi: Secuencia octanucleotídica que es blanco de acción de la recombinasa RecBCD (véase cap. 12).

Cinetocoro: Estructura trilaminar, donde se insertan los microtúbulos del huso mitótico en un cromosoma. El cinetocoro se encuentra en la región periférica del centrómero y es de composición preponderantemente proteínica (véase cap. 4).

Cis (configuración en "cis"): Dícese de dos genes que están localizados en el mismo cromosoma, por oposición a aquellos que, aunque corresponden a los mismos "loci" están localizados en cromosomas homólogos (configuración *trans*). Por extensión, acción en cis es la acción sobre el mismo cromosoma donde está localizado el agente, o sobre

la misma cadena de ADN que lo contiene. P. ej., acción en cis del gen *XIST* sobre el mismo cromosoma X que lo aloja.

Cistrón: Denominación, actualmente poco usada, para genes.

Citoesqueleto: Término usado en Biología celular para designar el conjunto de microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios de las células.

Clatrina (Biología celular): Proteína que se asocia a la membrana celular e interviene en la formación de vesículas recubiertas que actúan en la endocitosis o incorporación de sustancias.

Clon (en sentido general): Progenie derivada asexualmente de un mismo progenitor y que comparte el mismo genoma. Las células derivadas por mitosis de una célula progenitora constituyen un clon, al igual que las progenies de organismos asexuales.

Clonar (ADN), clonación molecular: Replicar en el laboratorio un segmento de ADN, que puede contener o no un gen, mediante su escisión previa de un genoma, su separación electroforética, su repegado en un "vector" y su pasaje a un microorganismo, donde se multiplica con el vector y luego puede ser aislado. La clonación es un paso importante y previo para la identificación molecular de un gen mediante su secuenciación.

Co-activadores (en el complejo de transcripción): Grupo de proteínas, "factores asociados a TATA" (FAT = TAFs) que forman parte del complejo de transcripción funcional, capaces de asociarse con "activadores"

Código genético (universal): es la correspondencia entre tripletes de bases del ADN (o del ARNm) con aminoácidos de la proteína codificada.

Código de histonas: es la correspondencia entre determinadas modificaciones químicas (acetilación, metilación, etc.) de histonas nucleosomales con el grado de activación o silenciamiento transcripcional del ADN asociado a esas histonas (véase cap. 7).

Codominancia: Expresión en el fenotipo de los dos alelos, sin que la de uno oculte a la del otro.

Codón: Triplete de nucleótidos (del ARNm) que codifica un aminoácido o la iniciación o la terminación de un polipéptido.

Codones sinónimos o "degenerados" son los que codifican al mismo aminoácido.

Codones de terminación (UAA, UAG, UGA) son los reconocidos por los factores proteínicos de terminación.

Coeficiente de correlación: Coeficiente estadístico que mide el grado de asociación entre dos (o más) variables.

Cohesinas: complejos formados por varias subunidades proteínicas cuyas funciones principales son mantener la unión entre cromátidas hermanas de un cromosoma hasta su separación en la división celular. Comprenden las cohesinas mitóticas con las proteínas SMC1 y SMC3, la SCC1 y la SCC3 y las meióticas, que contienen la proteína Rec8 y la SMC1β. reemplazando a la SMC1.

Colágenos: Familia de numerosas proteínas del tejido conectivo; los tipos de colágeno se numeran con números romanos (más de 27 en el año 2003).

Competencia (en clonación de ADN): Estado de una bacteria que le permite incorporar el ADN de un vector, en el proceso de clonación.

Complejo de transcripción: Conjunto de proteínas que actúan entre sí y con el ADN, necesarias para la transcripción de la información genética del ADN. El **complejo basal** comprende la ARN polimerasa II y una docena de "factores de transcripción"; el funcional abarca medio centenar de proteínas (véase cap. 5).

Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH, ALH = HLA): Región del cromosoma humano 6p que contiene los genes de los antígenos leucocitarios humanos (ALH).

Complejo sinaptonémico: Estructura tripartita que se forma en la profase meiótica y que asocia cada par de cromosomas homólogos (véase cap. 12).

Complementariedad (de estructuras): Capacidad de ajustarse espacialmente dos estructuras moleculares, como molde y pieza mol-

deada, de donde resultan ciertas propiedades, como el "reconocimiento molecular" De bases: referido a los pares A-T y C-G en el ADN.

Concordancia: Presencia del mismo rasgo o enfermedad en un par de mellizos (opuesto a "discordancia" (véase cap. 2).

Condensinas: Complejos formados por varias subunidades proteínicas, cuyas funciones son, entre otras, regular la condensación de la cromatina y su transcripción. Están compuestas por cinco proteínas, de las cuales dos son la SMC2 y la SMC4, que corresponden al grupo de proteínas "SMC" (*s*tructural *m*aintenance of *c*hromatin).

Conexinas: Familia de numerosas proteínas, que forman uniones de tipo "nexo" entre células. También llamadas proteínas GJ (de unión nexo).

Consenso (secuencia consensuada o secuencia consenso): Secuencia teórica (promedio) de bases de ADN que se encuentra, con algunas variaciones, en un grupo de genes relacionados. En esta secuencia, cada base representa a la encontrada más frecuentemente en esa posición, en cada uno de los diferentes genes.

Conservación (de secuencias de bases): Propiedad que tienen las secuencias del ADN que son de gran importancia funcional para el organismo y, por consiguiente, tienden a no variar mucho con el paso del tiempo y con la evolución de los organismos. Por lo general, las secuencias traducidas de genes básicos son "conservadas" También son "conservadas" las secuencias de aminoácidos que tienden a permanecer sin cambios en el curso de la evolución, por constituir "motivos" necesarios para el funcionamiento de la proteína. Algunas secuencias no génicas son conservadas; por ejemplo las secuencias teloméricas (véase cap. 4).

Constitutivo: Comportamiento o función que se establece con prioridad a cualquier otra, mientras no se agregue ninguna señal en contrario, es decir que está establecida "por defecto" (en inglés, "default") de cualquier otra indicación: por ejemplo, el sexo constitutivo es el femenino (véase cap. 10). Los **genes constitutivos o de mantenimiento** son aquellos que funcionan constantemente. La **heterocromatina constitutiva** es aquella mayormente desprovista de genes, que contiene secuencias muy repetidas.

Contiguo, Contig (en mapeo génico: "contig" en inglés): Fragmentos de ADN que se superponen parcialmente con otros, usados en mapas "físicos" de ADN.

Conversión génica: Proceso asociado a la recombinación meiótica, pero que en vez de originar intercambios recíprocos de segmentos de ADN, altera una cadena haciéndola complementaria de otra, cuando ambas cadenas no eran complementarias.

Cósmido: Vector usado en clonación de ADN, con capacidad mayor que la de los plásmidos habituales (véase cap. 3). Un cósmido se construye insertando a un plásmido un segmento del ADN del fago lambda con el sitio "cos" lo cual permite empaquetar el ADN del cósmido en la cápside del fago.

"Cot": Parámetro usado en el análisis de la renaturalización del ADN, igual al producto de la concentración original y el tiempo de reacción (véase cap. 4).

CpG: Dinucleótido de citosina y guanina, que es muy frecuente en regiones reguladoras de un gen (p. ej., "islas CpG"; véase cap. 5).

"Cremalleras de leucinas" ("motivo"): Regiones de ciertas proteínas reguladoras, con varios residuos de leucinas orientados hacia el exterior; dos monómeros de estas proteínas se asocian por dichas regiones (véase cap. 16).

Cromátida, cromátide, cromatidio: Fibra fundamental de cada cromosoma, que contiene la larguísima molécula de ADN característica de ese cromosoma. El cromosoma metafásico contiene dos cromátidas "hermanas"; el anafásico, sólo una.

Cromatina: Material que compone los cromosomas (aproximadamente partes iguales de ADN y proteínas).

Cromatina sexual = Corpúsculo de Barr: Corpúsculo visible en los núcleos interfásicos,

que corresponde al cromosoma X condensado (lionizado) de las células que poseen dos cromosomas X (normalmente, mujeres).

Cromodominio (en proteínas nucleares): Segmento muy conservado de 50 aa, con alta afinidad para histonas metiladas, que interviene en la regulación de la transcripción (véase cap. 7).

Cromómero: Cada una de las condensaciones de cromatina dispuestas como cuentas de collar a lo largo de los cromosomas en la profase meiótica.

Cromosoma: Cada uno de los 23 pares de estructuras definibles por el microscopio de luz, que llevan las moléculas de ADN que contienen los genes. El conjunto de los cromosomas ("complemento cromosómico") se representa en un "cariotipo"

Cromosoma homólogo: Cada uno de los dos miembros de una pareja de cromosomas de igual forma y tamaño, uno de los cuales proviene del padre y el otro de la madre.

Cuerpo XY: Corpúsculo visible en los espermatocitos de todos los mamíferos euterios y metaterios durante la profase meiótica, formado por la asociación de los dos cromosomas X e Y silenciados transcripcionalmente y con su cromatina empaquetada en una forma característica y con la presencia de la histona modificada gamma-H2AX.

Dalton: Unidad de masa molecular, igual a la masa de un átomo de hidrógeno.

Daltonismos: Defectos hereditarios de la visión de los colores (véase cap. 11).

"Dedos de zinc" ("motivo"): Regiones presentes en ciertas proteínas reguladoras, cada una formada por un pliegue de unos 30 aminoácidos, que posee en su base un átomo de zinc coordinado (véase cap. 16).

Degenerado (código): Cuando hay más de un codón (varios codones "sinónimos") que codifique el mismo aminoácido. Esta redundancia es ventajosa y está relacionada con las reglas del "balanceo" (véase cap. 5).

Deleción (deficiencia): Aberración cromosómica en la que falta un segmento de cromosoma.

Deleción de ADN: Pérdida de un segmento de la molécula normal de ADN.

Dermatoglifos: Patrón de dibujos de las crestas dérmicas digitales, palmares y plantares ("huellas digitales"), que tienen un patrón hereditario de tipo poligénico (véase cap. 2).

Desequilibrio de ligamiento: Presencia de una asociación entre dos o más alelos de loci diferentes, en proporciones distintas de las causadas sólo por el azar. Cuando se observa un desequilibrio de ligamiento entre dos genes, se sospecha que hay razones para que estos dos genes permanezcan más ligados de lo que sería esperable por puro azar; por ejemplo, una mutación de aparición reciente presentará un desequilibrio de ligamiento con genes cercanos, porque no ha transcurrido el número suficiente de generaciones como para romper esta asociación (véase cap. 11).

Desnaturalización (de ADN): Separación parcial o total de las dos hélices de la molécula de ADN, por acción del calor u otros agentes (formamida, etc.; véase cap. 4).

Desnaturalización (de proteínas): Pérdida de la conformación espacial nativa de la proteína (por calor u otros agentes), que generalmente conlleva una pérdida de su función.

Diandria: Condición anormal de un cigoto que posee un genoma de origen exclusivamente paterno; es letal. **Diginia:** Condición similar y también letal, con genoma de origen exclusivamente materno.

Dicéntrico: Aberración cromosómica, presencia de dos centrómeros.

DICER: véase "Trozador".

Didesoxinucleótidos (dideoxinucleótidos): Nucleótidos desprovistos del oxhidrilo en la posición 3', usados en el método de secuenciación del ADN (véase cap. 5).

Diferenciación (celular): Adquisición de funciones, estructuras o metabolitos especializados y propios de un tipo de tejido o de célula.

Diploide: Que posee dos conjuntos cromosómicos, uno proveniente de cada progenitor. El número diploide humano es 2n = 46, con 23 parejas de cromosomas homólogos.

Dismorfia: Deformación o malformación congénita.

Disomía uniparental: Presencia de los dos cromosomas homólogos de un par, originados de un mismo progenitor (síndrome de Prader-Willi, síndrome de Angelman; véase cap. 12).

Displasia: Falla o defecto de desarrollo de un tejido u órgano (muchas son genéticas).

Distal (en cromosomas): Alejado del centrómero de ese cromosoma. Opuesto a **proximal:** cercano al centrómero.

Disyunción (meiótica): Separación normal de los dos cromosomas homólogos en la anafase de la primera división meiótica. Cuando falla, la "no disyunción" origina importantes enfermedades cromosómicas.

Disyunción mitótica: Separación normal de las cromátidas hijas en la anafase de la mitosis.

Divergencia: Diferencias porcentuales entre las secuencias nucleotídicas de genes relacionados, o de secuencias de aminoácidos entre proteínas de organismos emparentados.

Dominancia: Expresión exclusiva de uno de los dos alelos de un gen en el fenotipo (véase cap. 9).

Dominancia negativa: Tipo de dominancia mendeliana en la cual el producto del alelo mutado intefiere con la función del alelo sano, anulando o alterando su función (p. ej. una cadena de colágeno mutante, véase cap.15).

Dominancia por ganancia de función: Tipo de dominancia mendeliana en que el producto del alelo mutado adquiere una función nueva y por eso se expresa (véase cap. 9).

Dominancia por insuficiencia haploide: Tipo de dominancia mendeliana en la cual el producto de un solo alelo normal es insuficiente para mantener una función, por lo cual se expresa como una función alterada.

Dominio: Una parte de la secuencia aminoacídica de una proteína, que posee una forma espacial singular, una función especial y que generalmente está codificada por un sector bien definido de su gen.

Dosis génica (compensación de): Mecanismo celular que permite que individuos de diferente sexo, con la consiguiente diferencia de la cantidad de genes (el cromosoma Y posee pocos genes), puedan compensar la presencia de dos genes en el sexo femenino por cada gen en el masculino. En la especie humana este mecanismo es la "lionización" de un cromosoma X (véase cap. 11).

Ectópico: Fuera de su localización normal (célula ectópica).

ELSI: Sección del Proyecto Genoma Humano dirigido al estudio de las consecuencias éticas, legales y sociales de los nuevos conocimientos genéticos.

Empalme, "splicing" en inglés: Corte y remoción de los intrones y repegado de los exones entre sí, que ocurren en el ARN transcripto en su proceso de "maduración" para formar ARNm.

Empalme alternativo: Mecanismo, actualmente de creciente importancia, por el cual un mismo gen puede producir más de un ARNm, usando "sitios de empalme" diferentes, con lo cual algunos exones pueden quedar excluidos del ARNm final, y consecuentemente el gen puede codificar varias proteínas diferentes (véase cap. 5).

Empalmosoma, "espliceosoma": Estructura compleja formada por partículas pequeñas y nucleares de ribonucleoproteína, que interviene en el proceso de empalme.

ENCODE (Proyecto): Proyecto de investigación destinado a identificar todos los elementos funcionales del ADN humano (véase cap. 5).

Endonucleasas: Enzimas que cortan ácidos nucleicos en lugares intersticiales (no en los extremos). Endonucleasas de restricción = enzimas de restricción (véase cap. 3).

Entrecruzamiento, "crossing-over": Intercambio de material genético entre cromosomas homólogos. Citológicamente se expresa como un "quiasma" visible con el microscopio de luz; en las progenies se expresa por una recombinación de caracteres o rasgos, y molecularmente se expresa por la formación de dos moléculas de ADN diferentes de las originales (o "parentales") porque son mixtas, al haber intercambiado recíprocamente un segmento de cada una

de ellas (véase cap. 12). Entrecruzamiento **ilegítimo** es aquel que ocurre entre dos segmentos que no son correctamente homólogos y que con frecuencia origina fenómenos patológicos.

Epidermólisis: Enfermedades de la piel, muchas de ellas genéticas, en las cuales la epidermis se despega de su base (ampollares, de la unión, etc.).

Epigenético (efecto, fenómeno): Relativo a los cambios en la expresión de un gen durante el desarrollo del organismo, sin la intervención de mutaciones que alteren el genoma. Los efectos epigenéticos pueden ser producidos por metilación u otros cambios químicos de histonas nucleosomales, que inhiben o activan la expresión del gen, o por la presencia de proteínas activadoras o represoras (véase cap. 7).

Episomas: Plásmidos integrables al genoma bacteriano.

Epistasis: Efecto por el cual la acción de un gen ("epistático") enmascara o interfiere la expresión de otro u otros genes (hipostáticos). P. ej., la mutación de albinismo AOC-I oculta la expresión de los genes de color moreno, pelirrojo, etcétera.

Erizo sónico (SHH): Nombre de un gen (y de su proteína) que inician un camino de señalización celular muy importante en el desarrollo embrionario (véase cap. 16). Hay otros dos genes de esta familia, el "erizo del desierto" y el "erizo índico"

Espectro mutacional: Representación del conjunto de mutaciones que pueden afectar un gen, que muestra su ubicación dentro del gen y el tipo de alteración mutacional (véase cap . 8).

Estudios de amplitud genómica (= GWS): Análisis de propiedades del genoma haciendo uso de la totalidad de las secuencias del ADN humano, mediante microarreglos que contienen esas secuencias. Actualmente estos estudios se hacen para detectar asociaciones de marcadores con ciertas enfermedades comunes como la diabetes, usando SNPs como marcadores y evaluando dos grupos, uno de enfermos y otro de controles sanos, en números de varios miles de individuos (véase cap. 13).

Etiología: Origen o causa de un rasgo o enfermedad.

Eucarionte: Organismo con núcleo y carioteca, más complejo que los "procariontes", como las bacterias.

Eucromatina: Cromatina funcionalmente activa, por oposición a la "heterocromatina", condensada e inactiva.

Euploide (célula): Que posee un complemento cromosómico normal.

Euterios: Correspondiente a los mamíferos con placenta.

Exón: Segmento del ADN de un gen que corresponde a los sectores no eliminados del transcripto primario por el proceso de empalme y que en gran parte se traduce en secuencia de aminoácidos de una proteína. La mayoría de los genes humanos poseen varios exones (hasta un máximo de 363 exones en el gen de la titina TTN) y esta estructura exónica es uno de los datos básicos sobre cada gen humano.

Exonucleasas: Enzimas que cortan un nucleótido terminal de un ácido nucleico; las hay para el extremo 3' y para el 5'.

Expresión génica: Efecto del gen sobre el fenotipo; la expresión se inicia por el proceso de transcripción y continúa por la traducción. El **vector de expresión** es un vector construido de tal forma que permite la transcripción y la traducción del gen vehiculizado (véase cap. 3).

Factores de crecimiento: Cualquiera del numeroso grupo de polipéptidos que estimula específicamente un tejido o tipo celular.

Factores de crecimiento y transformación β (TGF-β): Superfamilia de más de 30 proteínas que regulan importantes aspectos del crecimiento y la diferenciación celular y que incluyen las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), la hormona antimülleriana y otras. La familia TGF-β estricta está codificada al menos por cinco 5 genes.

Factores de transcripción: Numeroso grupo de proteínas regulatorias, que funcionan en el interior del núcleo, poseen "motivos" que les

permiten asociarse al ADN o a otras proteínas intranucleares y que comprenden las proteínas integrantes del complejo de transcripción funcional. Son especialmente importantes en los procesos de desarrollo embrionario.

Facultativa (heterocromatina): Aquella cromatina con capacidad de transcribir pero inhibida por un mecanismo regulador estable.

FCE (EGF en inglés): Factor de crecimiento epitelial.

Fenocopia: Cambio fenotípico inducido por factores ambientales, que remeda los efectos fenotípicos de una mutación (véase cap. 2).

Fenotipo: Conjunto de caracteres observables del organismo o de sus componentes.

"FISH": Véase hibridación in situ y fluorescencia (**HISYF**).

Filial I, Filial II: Primera (F1) o segunda (F2) generación derivada de los progenitores en una genealogía.

Frágil (sitio): Cualquiera de los lugares específicos de ciertos cromosomas en los cuales, bajo ciertas condiciones de cultivo celular, los cromosomas muestran una estrangulación que tiende a convertirse en una ruptura cromosómica. Los sitios frágiles mejor conocidos son los del cromosoma X, el FRAXA y el FRAXE, pero hay otros similares en autosomas (véase cap. 18).

Fundador (efecto): Frecuencia alta de una mutación en una población, debido a que esa población derivó de un pequeño número de pobladores, uno de los cuales ("fundador") era portador de la mutación.

Fusión céntrica = translocación robertsoniana: Reordenamiento estructural cromosómico, por el cual dos cromosomas acrocéntricos pierden sus brazos cortos heterocromáticos (inactivos) y se fusionan por sus regiones centroméricas, para formar un cromosoma nuevo, con dos brazos bien definidos (bibraquiado).

GALT: nombre de la enzima galactosa uridil transferasa (y nombre de su gen), alterada en la galactosemia.

γH2AX (gamma H2AX): Variante de la histona H2A, que es una marcadora de remodelación de la cromatina y de la cromatina "silenciada" del cuerpo XY (véase cap. 7 y cap. 12).

GAM (HMG en inglés): proteínas del "grupo de alta movilidad" (electroforética); y también el nombre de la "caja" en el ADN que codifica 80 aminoácidos propios de este grupo de proteínas. Un ejemplo de "caja" GAM es la parte central del gen *SRY* de determinación del sexo (véase cap. 10).

Gameta, gameto: Células sexuales reproductoras (espermatozoide y óvulo) que tienen un complemento cromosómico "haploide" (23 cromosomas).

Gen: Unidad hereditaria que corresponde a un segmento de molécula de ADN que codifica una o más proteínas o un ARN funcional con sus secuencias de control, intrones y secuencias reguladoras (véase cap. 5). Cada cromosoma humano contiene miles de genes y el total de genes humanos oscila en alrededor de 30.000. Gen de mantenimiento ("housekeeping") es aquel que funciona permanentemente.

Genealogía, árbol genealógico: diagrama que contiene la información de la descendencia de uno o más individuos, con respecto a un rasgo genético. Se usan símbolos estandarizados (véase cap. 9)

Genodermatosis: Enfermedades hereditarias o genéticas de la piel, de gran importancia en Dermatología, especialmente las enfermedades ampollares y desórdenes de la queratina.

Genoma: Total del ADN nuclear de una célula y conjunto de la información genética que lleva ese ADN. El genoma nuclear humano es aproximadamente de 3.000 megabases.

Genoma mitocondrial: ADN mitocondrial, que comprende 16.569 pares de bases en la especie humana.

Genómica (disciplina): Estudio de los genomas como un todo: su funcionamiento (genómica funcional) o las comparaciones entre genomas de diversos organismos (genómica comparada). Véase el cap. 6.

Genoteca de ADNc (ADN complementario o copia): Colección de moléculas (no son fragmentos cortados al azar) de ADN copiados a partir de moldes de ARNm, que representan, cada uno de ellos, la región traducible de un gen. Las genotecas de ADNc no comprenden todo el genoma, sino sólo los genes expresados en un tipo celular. Así, hay genotecas de ADNc de hepatocitos, etcétera.

Genoteca genómica (*genomic DNA library*, en inglés): Colección de fragmentos de ADN clonados, provenientes de un organismo, y que comprenden, en conjunto, la totalidad del genoma de ese organismo. Las genotecas genómicas contienen fragmentos con genes o sin ellos, ADN de copia simple o repetida, secuencias propias o secuencias parásitas.

Genotipo: Conjunto de la información genética propia de un organismo (véase cap. 2).

Ghrelina: péptido hormonal segregado por la mucosa del estómago, importante en la regulación de la masa corporal.

Girasa: Enzima del tipo de las topoisomerasas II, que puede inducir superenrollamiento negativo en el ADN.

GLI: (de "glioma", tumor del tejido nervioso): nombre del grupo de proteínas (y sus genes codificantes) que actúan como factores de transcripción en el camino de señalización celular del "erizo sónico" (SHH) (véase cap.16).

Hamartoma: pequeños tumores benignos de la piel (glándula sebácea), propios de la esclerosis tuberosa (véase cap. 19).

HapMap: Nombre inglés de un proyecto de enumeración de los haplotipos en poblaciones humanas.

Haploide (del griego *haplos*: mitad): Que posee un solo juego de cromosomas (no hay parejas). El número haploide humano es n = 23.

Haplotipo: Cualquier conjunto de genes, estrechamente ligados, que están en una misma región de un cromosoma y que forman un conjunto génico característico de ese individuo, de una familia o de una población. El haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad CMH (ALH = HLA) sirve para identificar individuos.

Helicasa: Cualquiera del grupo de enzimas, dependientes de ATP, capaces de destorcer la doble hélice del ADN y separar ambas hélices por un trecho variable; hay helicasas con sentido de avance de 5' a 3' y otras con sentido inverso. Intervienen en la replicación del ADN y en su reparación, y sus mutantes están asociadas con enfermedades como el xeroderma pigmentoso, el síndrome de Bloom, el síndrome de Werner y otras (véase cap. 8).

α-Hélice (hélice alfa): Uno de los tipos de estructura secundaria de las proteínas, en el cual la cadena peptídica toma una forma espacial de hélice dextrógira.

Hemicigota: Que contiene un solo miembro de un par de genes o de un par de cromosomas. El varón es hemicigótico para la mayoría de los genes del cromosoma X.

Hemofilia: Enfermedad genética caracterizada por un defecto de la coagulación de la sangre. Hay dos tipos; la principal es la hemofilia A, cuyo gen está en el cromosoma X (gen del factor VIII) (véase cap. 11).

Heredabilidad: Parte de la varianza fenotípica que corresponde a un origen genético (véase cap. 2).

Hermafroditismo: Presencia de tejido ovárico y testicular en el mismo individuo, o de gónadas de ambos sexos; la mayoría de los casos posee un cariotipo 2n = 46, XX (véase cap. 10).

Heterocigota, heterocigoto, heterozigota: Individuo que posee dos alelos diferentes para un gen.

Heterocromatina (en general): Cromatina que no transcribe, ya sea porque carece de genes (**constitutiva**) o porque está inhibida de hacerlo (**facultativa**).

Heterodúplex (ADN): ADN de doble cadena, pero de origen híbrido (de dos moléculas de ADN progenitoras), que se forma en un paso intermedio de la recombinación meiótica (véase cap. 12).

Heterogamético (sexo): Que produce dos tipos genéticos de gametos; sexo masculino humano, espermatozoides con X y espermatozoides con Y.

Heterogeneidad genética (de enfermedades hereditarias): Concepto, cada vez más abarcador de enfermedades hereditarias, el cual postula que muchas enfermedades hereditarias se originan en más de una mutación de un gen (heterogeneidad **intragénica**) y en mutaciones de más de un gen (heterogeneidad **interalélica**) y, por consiguiente, es infrecuente el origen único de una enfermedad hereditaria (véase cap. 2).

Heteroplasmia: Heterogeneidad del genoma mitocondrial en diferentes mitocondrias del mismo organismo (véase cap. 13).

Hibridación celular: Procedimiento experimental por el cual se fusionan células de distinto origen, con la ayuda de agentes como el virus Sendai o sustancias que tienden a fusionar las membranas celulares. Las células híbridas, por ejemplo, de ratón y ser humano, permiten desarrollar el análisis genético de células somáticas.

Hibridación (de ácidos nucleicos): Proceso basado en la complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos, cuando forman cadenas dobles, por el cual las cadenas simples, que tengan secuencias de bases complementarias, se unen progresivamente con más afinidad cuanto más larga es la secuencia totalmente complementaria (véase cap. 4).

Hibridación in situ y fluorescencia (HISYF, FISH): Técnica citológica, por la cual se detectan secuencias de ácidos nucleicos directamente en un corte histológico o en células pegadas a un portaobjetos, mediante el uso de sondas específicas para esas secuencias, que a su vez se detectan por colorantes fluorescentes (véase cap. 17).

Hipertelorismo: Separación excesiva de las órbitas, presente en varios síndromes hereditarios.

Holándrico: Transmitido hereditariamente por el varón en forma exclusiva. Los genes del cromosoma Y son de herencia holándrica.

Homeótico (gen): Genes cuyas mutaciones cambian la identidad o la diferenciación de un segmento del organismo; son básicos en el desarrollo embrionario. En el hombre comprenden las cuatro series de genes *HOX-A* a *HOX-D*. Los genes *HOX* contienen una secuencia característica, la "homeocaja" (véase cap. 16).

Homocigota, homocigoto, homozigota: Individuo que posee dos alelos del mismo tipo.

Homología (génica y cromosómica): Que poseen suficiente similitud en el ADN como para aparearse en la profase meiótica y recombinar en forma regular. Cromosomas homólogos son los dos miembros de un par, provenientes de los dos progenitores; genes homólogos son alelos, es decir, corresponden al mismo locus, y moléculas de ADN homólogas son las que pueden recombinar regularmente.

Hoogsteen: Denominación de un tipo de uniones de bases del ADN diferente del tipo habitual descrito por Watson y Crack (proviene del apellido del investigador que las propuso).

HUGO: (*Hu*man *G*enome *O*rganization). Organización internacional para el estudio del genoma humano.

HUPO (*Hu*man *P*rotein *O*rganization): Organización internacional que coordina estudios del proteoma humano (véase cap. 6).

Ictiosis: Enfermedades de la piel, en las que la piel se torna escamosa (véase cap. 18).

Idiograma: Diagrama esquemático de un cariotipo.

Impronta de Northern, transferencia de Northern, Northern: Técnica similar a la de Southern para transferir segmentos de ARN a una membrana, con el fin de que sean identificados con sondas.

Impronta de Southern, transferencia de Southern, "Southern-blot" (inglés): Método desarrollado por E. Southern, para transferir segmentos de ADN (previamente separados por electroforesis) desde el gel de la electroforesis a una membrana o filtro, en la cual se detecta el segmento mediante una sonda radiactiva (véase cap. 3).

Impronta de Western o Western: Técnica similar a la de Southern para transferir proteínas a una membrana, para que sean identificadas mediante anticuerpos.

Impronta genómica ("imprinting" en inglés): Cambios ocurridos en el genoma durante la ovogénesis o la espermatogénesis de los progenitores y que se ponen en evidencia en el desarrollo embrionario, distinguiendo los genes de origen materno de los de origen paterno. Esta impronta se atribuye a una metilación diferente del ADN en la espermatogénesis y en la ovogénesis (véase cap. 12).

Índice de masa corporal (IMC): Cociente entre el peso en kg y el cuadrado de la estatura en metros.

Información (genética): Información contenida en secuencias de nucleótidos de ADN o ARN y que codifica secuencias de aminoácidos en proteínas u otras señales específicas.

Información posicional: Información adquirida por las células que están en un lugar determinado durante el desarrollo embrionario y que determina la conducta posterior de dichas células. Las células quedan "instruidas" para su conducta posterior, mediante la acción de gradientes de sustancias especiales.

Inserto (de ADN): Segmento de ADN foráneo que se une artificialmente a un "vector" y es vehiculizado por éste, durante la clonación de ADN y otras manipulaciones del ADN (véase cap. 3).

In situ: En su lugar. En general, se refiere a lo que ocurre en células o tejidos organizados, por oposición a las preparaciones aisladas de ellas (p. ej., hibridación in situ).

Integración (de ADN a un genoma): Fenómeno celular por el cual un segmento o molécula de ADN externo al genoma es unido de manera covalente al ADN genómico.

Integrasa: Nombre de una enzima propia de ciertos virus, que la usan para integrarse al genoma humano.

Intensificador = "Enhancer": Secuencia del ADN, generalmente alejada del gen con el cual interactúa, que cuando funciona acelera (o disminuye) la transcripción de ese gen, es decir que es una región reguladora alejada del gen (véase cap. 5).

Integrinas: Familia de proteínas que, en el caso de los queratinocitos, son receptoras y hacen de puente entre las proteínas del tejido conectivo y las células del epitelio.

Interferencia (quiasmática): Fenómeno por el cual la presencia de un suceso de recombinación meiótica o entrecruzamiento en un lugar de un cromosoma inhibe la producción de otro entrecruzamiento en un sector cercano al primero. Interferencia negativa o facilitación es un fenómeno relacionado por el cual, luego de un segmento con interferencia, se aumenta la probabilidad de que suceda un entrecruzamiento en la región adyacente.

Interferencia de ARN, ARNi: Degradación de moléculas de ARN inducida por la presencia de ARN de doble cadena, que lleva a la destrucción de dicho ARN y en general a reprimir la transcripción efectiva y específica de ciertas secuencias. **siARNs:** (*small interference RNAs*): ARN pequeños de interferencia, de doble cadena y 21-22 nucleótidos fabricados artificialmente para "silenciar" la expresión de un gen determinado (véase cap. 7).

Interleuquina, interleucina: Proteínas segregadas principalmente por linfocitos, que intervienen en la comunicación entre células de diversos tipos.

Intrón, "secuencia interviniente": Región del ADN intercalada entre los exones, que no codifica aminoácidos y es eliminada por el empalme.

Inversión cromosómica: Reordenamiento de un segmento cromosómico, que queda colocado en sentido opuesto; **pericéntrica**, cuando el segmento incluye el centrómero; **paracéntrica**, si no lo incluye.

In silico: Referido a secuencias que se encuentran en bases de datos (bioinformáticas) y que pueden ser sintetizadas artificialmente.

In vitro: Lo que ocurre fuera del organismo intacto, con partes, células o sustancias del organismo; p. ej., crecimiento de cultivos celulares "in vitro"

In vivo: En el organismo intacto, por oposición a "in vitro"

Isla CpG : secuencia del ADN muy rica en citosinas seguidas de guanina, que se encuentran

en muchas regiones "promotoras" de genes de mantenimiento (véase cap. 5).

Isocromosoma: Cromosoma anormal, resultado de la pérdida de un brazo y la duplicación del restante (véase cap. 17).

Isodicéntrico: Cromosoma anormal, con dos centrómeros próximos y brazos iguales, como un isocromosoma.

Isoenzima, isozima: Enzimas diferentes que poseen la misma actividad catalítica, pero distintas propiedades fisicoquímicas.

Lambda (fago): Bacteriófago comúnmente usado como "vector"

Lámina (proteína): Proteínas relacionadas con las queratinas y otras proteínas formadoras de filamentos intermedios y que forman un recubrimiento del lado interno de la membrana nuclear (láminas nucleares).

Laminina: Proteína de la matriz extracelular, constituyente de las membranas basales.

Lazo D: (de Desoxirribonucleico): lazo formado por una de las dos cadenas del ADN que queda sin asociarse con la cadena complementaria. **Lazo R:** lazo formado por una cadena del ADN correspondiente a un intrón cuando un ARNm hibrida con el ADN de los exones, dejando los intrones libres.

Lazo T: Lazo o vuelta sobre sí mismo, del extremo del ADN telomérico, para formar una estructura particular del telómero (véase cap. 4).

Leptina: péptido hormonal segregado por los adipocitos o células del tejido graso, importante regulador de la masa corporal.

Leptoteno, leptonema, estadio leptoténico: Primer estadio característico de la profase de la primera división meiótica, caracterizado por la apariencia de los cromosomas como filamentos delgados y con engrosamientos de "cuentas de collar"

Letal (gen, factor): Mutación que determina la muerte del individuo antes de la edad reproductiva.

Ligamiento: Asociación de genes durante la transmisión hereditaria. Dos genes están ligados cuando el grado de asociación con los que se transmiten excede a lo que correspondería al azar. Los genes ligados están en un mismo cromosoma, y cuanto más cercanos entre sí, mayor es su ligamiento. El ligamiento de genes se origina en que pertenecen a la misma molécula de ADN, y la probabilidad de que se fracture esta molécula entre los dos genes es pequeña cuando son cercanos entre sí (véase cap. 11). Un **grupo de ligamiento** es equivalente a un cromosoma, y el número de grupos de ligamiento es igual al número haploide.

Ligamiento al sexo, ligamiento al X: Relativo a los genes que se encuentran en el cromosoma X (en su porción "diferencial") y que por consiguiente están en "dosis" única en el varón y doble en la mujer (véase cap. 11).

Ligando: sustancia (muchas veces hormona) capaz de unirse con un receptor en forma específica (con una afinidad química muy alta).

Ligasa: Enzima que cataliza la unión de fragmentos de ADN de cadena doble.

LINEs: Secuencias largas (6,4 kb), dispersas y repetidas del ADN, localizadas en las bandas G de todos los cromosomas humanos, cuyo origen está asociado a la retroposición de secuencias por medio de la transcriptasa inversa (véase cap. 4).

Lionización, lyonización, inactivación del cromosoma X: Proceso celular propuesto por Mary F. Lyon, por el cual uno de los dos cromosomas X de la mujer y de las hembras de los mamíferos placentados es inactivado transcripcionalmente en forma estable pero eventualmente reversible, constituyendo un corpúsculo de "cromatina sexual" o corpúsculo de Barr (véase cap. 11).

Locus (plural: loci): Sitio definido de un cromosoma o de una molécula de ADN, donde se puede encontrar un gen u otro tipo de secuencia bien definida. Un locus de un gen puede estar ocupado por cualquiera de los "alelos" de ese gen. Un locus representa la posición que tiene un gen o una secuencia en una molécula de ADN.

"Lods" (del inglés, *logarithm of odds*): Medida de la probabilidad de que dos o más genes estén "ligados": una puntuación de 3 o 2 en la

escala de "lods" indica ligamiento (véase cap. 11).

Mal apareamiento (reparación de), REMA, "mismatch repair" en inglés: Proceso celular por el cual inmediatamente después de la replicación del ADN por la ADN polimerasa, la célula "reconoce" la región del ADN donde hay una o unas pocas bases incorrectamente apareadas, y un sistema de proteínas (sistema REMA) procede a acoplarse a esa región, cortar la cadena incorrecta y repararla con la secuencia correcta (véase cap. 8).

Mapa (genético): Representación de la secuencia lineal de la información genética en cada cromosoma. Los **mapas de ligamiento** representan el orden de disposición de los genes y las **frecuencias de recombinación** entre pares de ellos, que son proporcionales a la distancia física que los separa; estos mapas de ligamiento tienen como unidad el centimorgan (cM). Los mapas **"físicos"** son representaciones directas de la molécula de ADN, con la secuencia de bases completa, y sus unidades son las megabases (Mb, un millón de ([pares de] bases), kilobases (kb, mil [pares de] bases) o pares de bases (pb). Los mapas físicos incompletos, pueden ser **mapas de sitios de restricción** (posiciones que son cortadas por una enzima de restricción); **mapas de segmentos contiguos** (que representan el orden de fragmentos que se superponen parcialmente) y **mapas de sitios rotulados por secuencias conocidas** (SRSC) (véase cap. 5).

Marcadores (de ligamiento; génicos): Segmentos del ADN cuya posición ya es conocida y que sirven como hitos para la localización de otras secuencias u otros genes, en la confección de mapas genéticos. Los marcadores pueden ser genes o (más frecuentemente) secuencias no génicas. Son marcadores útiles las secuencias polimórficas, como los polimorfismos de longitudes de fragmentos de restricción (PLFR), los minisatélites y los microsatélites (véase cap. 11).

Marco abierto de lectura (MAL), cuadro de lectura, "open reading frame" (ORF): Secuencia codificadora del ADN que no está interrumpida tempranamente por un triplete de terminación y, por consiguiente, sugiere la existencia de un gen funcional (véase cap. 5).

Megabase: un millón de bases nitrogenadas, o el segmento de una hélice de ADN que contiene esa cantidad de bases. Unidad de los mapas físicos del ADN (véanse caps. 5 y 6)

Meiocito: Célula germinal que ingresa en meiosis, ya sea masculina (espermatocito) o femenina (ovocito).

Meiosis: Proceso celular complejo, propio de los organismos con reproducción sexual, que comprende dos divisiones sucesivas (meiosis I y II) y que cumple varias funciones fundamentales para la especie: reduce el número cromosómico, de diploide a haploide; distribuye al azar los cromosomas maternos y paternos en las gametas, e introduce la principal fuente de variación genética mediante los entrecruzamientos y la recombinación génica consiguiente (véase cap. 12).

Melanosoma: Organoide citoplasmático en el cual se fabrica el pigmento melánico.

Mella, melladura, ruptura de cadena simple ("nick" en inglés): Fractura de una sola de las dos cadenas del ADN, en la cadena "vertebral" de uniones fosfato-azúcar, ya sea espontánea o provocada por la acción de una enzima. "Técnica de traslado de mella" ("nick translation") es una técnica enzimática usada para fabricar "sondas"

Mendeliana (herencia): Patrón de transmisión hereditaria que sigue las reglas establecidas por G. Mendel; se refiere a rasgos codificados por un único gen nuclear.

Meromelia: Malformación embrionaria en la que faltan segmentos de los miembros.

Metacéntrico: Cromosoma con brazos de aproximadamente la misma longitud porque su centrómero está en posición mediana.

Microarreglos ("microarrays" ADN chips): Técnica que usa portaobjetos especiales con varios miles de microgotas depositadas con mucha precisión en un cuadriculado, y que permite el estudio simultáneo de la función

de varios miles de genes, y hasta de todo el genoma, comparando una muestra normal con otra diferente (véase cap. 6).

Microsatélites: Secuencias muy cortas de bases del ADN (usualmente dinucleótidos) repetidas un número variable de veces, dispuestas en posiciones fijas en cada cromosoma y heredadas en forma mendeliana. Son muy útiles como "marcadores" porque el número de repeticiones es muy variable entre personas no emparentadas, es decir que son muy polimórficas.

Microdeleciones, microduplicaciones: Pérdidas o duplicaciones de segmentos cromosómicos imposibles de ser detectadas por un cariotipo de rutina con microscopio de luz, pero detectables con métodos moleculares (FISH, MLPA, microarreglos). Afectan menos de 5 megabases de ADN.

Minisatélites, repeticiones en tándem de número variable (RTNV, VNTR en inglés): Secuencias cortas (10-15 pb) repetidas una detrás de la otra, con un número variable de repeticiones, que por ser polimórficas en la población humana, sirven como "marcadores", aunque menos eficientes que los microsatélites.

MLPA ("*M*ultiplex *l*igation dependent *p*robe *a*mplification"): Amplificación de Sondas Múltiples dependiente de Ligadura es un procedimiento técnico de Genética molecular en el cual se amplifican, con el procedimiento de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), varias (hasta 40) sondas diferentes, que corresponden a diferentes segmentos de ADN, todas las cuales se amplifican simultáneamente por contener los mismos prímeros, y solamente se amplifican cuando encuentran una cadena complementaria de ADN "blanco" que permita su ligadura en cada caso. Los productos amplificados se separan en el segundo paso de la misma técnica, por electroforesis capilar. Esta técnica se usa para determinar deleciones y duplicaciones y también para el número de copias de cada ADN.

Monogénicas: Enfermedades o rasgos provocados por la alteración de un único gen.

Monosomía: Condición anormal en la que falta uno de los dos miembros de una pareja de cromosomas homólogos; son letales, salvo la del cromosoma X (véase cap. 17).

Mosaicismo (cromosómico): La presencia, en el mismo individuo, de líneas o progenies de células que tienen diferente cariotipo. Los mosaicismos cromosómicos son muy frecuentes en las personas que poseen una anormalidad cromosómica; por ejemplo, síndromes de Turner mosaicos 2n = 45, XO/2n = 46, XX. Cuando se enuncia un mosaicismo, se escriben los números de los dos tipos celulares separados por una barra inclinada (véase cap. 17).

Multivalente (cromosómico): Complejo anormal formado por más de dos cromosomas que forman una asociación peculiar en la primera división meiótica en individuos poseedores de una anormalidad cromosómica que involucra más de dos cromosomas, por ejemplo, una trisomía, una translocación recíproca (involucra cuatro cromosomas), etc. Los multivalentes evidencian la presencia de dicha anormalidad, por oposición a los "bivalentes" normales.

Mutación: Cambio permanente en una secuencia de bases del ADN. Las mutaciones pueden clasificarse de varias maneras: morfológicamente y funcionalmente (véase cap. 8).

Mutación neutral es aquella que no significa una desventaja selectiva para el organismo ni para la especie y que tiende a persistir.

Mutación de sitio dirigido, mutación dirigida ("site-directed mutagenesis"): Manipulación genética dirigida a obtener la mutación de un gen o una secuencia específicos (véase cap. 8).

Mutágeno: Todo agente capaz de inducir mutaciones. La prueba o test de Ames generalmente se usa para detectar la mutagenicidad de sustancias sospechosas (véase cap. 8).

Nanómetro (nm): Mil millonésima parte del metro. $1nm=10^{-9}$ m= 10^{-3} μm (0,001 micrón)

Neutralista (teoría): Teoría que postula que la mayoría de los cambios mutacionales, en el curso de la evolución, son mutaciones neutrales (véase cap. 8).

No disyunción: Error celular causante de anomalías del número cromosómico (véanse "disyunción" y cap. 12). Puede ser meiótica (falla en la segregación de cromosomas homólogos en la meiosis I) o mitótica (falla en la separación de cromátidas hijas en la mitosis). También puede ocurrir en la meiosis II, siendo entonces equivalente a la mitótica.

Nódulo de Hensen: Pequeña región del embrión muy temprano, antes de la gastrulación.

"Noqueo génico" anulación génica, "knockout" en inglés: Manipulación ejercida sobre un gen celular, por medio de la cual se anula la actividad de dicho gen y sólo de él. Por lo común, se anula o noquea un gen induciendo la recombinación artificial homóloga de ese gen con un vector que contiene una secuencia muy parecida (homóloga) a la del gen pero que es inactiva. El noqueo génico permite estudiar la función de un único gen en un organismo completo, especialmente durante el desarrollo embrionario (véase cap. 8).

NOR, organizador nucleolar, región organizadora del nucléolo: Región de ciertos cromosomas que contiene los genes ribosómicos, o del ARNr y que es detectable por las técnicas para NOR y también como constricciones secundarias en esos cromosomas.

Notocorda: Estructura embrionaria del embrión muy temprano, subyacente en el ectodermo.

Nucléolo: Estructura intranuclear redondeada, sitio de síntesis y preensamblamiento de los ribosomas.

Nucleosoma: Partícula proteínica formada por dos tetrámeros de histonas, sobre el cual se enrolla un segmento de ADN de 147 pares de bases.

Nulo (gen, alelo): Aquel que no es funcional por efecto de una mutación o por una deleción.

Oligonucleótidos, oligos: Fragmentos cortos de polinucleótidos, de 12 a 20 bases y de secuencia definida, que son fabricados para servir como sondas para la detección de mutaciones o con otros propósitos.

Oncogén: Gen productor de crecimiento celular desregulado, originado en una mutación de un gen normal (protooncogén) que codifica señales reguladoras o factores de crecimiento. Varios oncogenes son codificantes de quinasas de tirosinas, de ligadoras de guanosintrifosfato (GTP) o de factores proteínicos de crecimiento.

Orientación (de un gen). Determinación del sentido en el que avanza la transcripción de un gen, que es siempre de 5' hacia 3': positiva si va hacia el centrómero, desde el extremo del brazo corto del cromosoma; negativa, si es a la inversa (cap. 6).

Ortólogos (genes): Genes derivados de uno ancestral o primitivo, en el curso de la evolución.

Palíndromo: Repetición invertida de una secuencia de pares de bases de ADN, de modo que la secuencia puede leerse igual de derecha a izquierda en una cadena o en sentido inverso en la cadena complementaria (véanse caps. 3 y 4). Hay numerosas secuencias palindrómicas en el ADN, que pueden ser blanco para el ataque de las enzimas de restricción.

Paquinema, paquiteno, estadio paquiténico: Tercer estadio de la profase meiótica I, en el cual los cromosomas homólogos están completamente apareados y sufren los fenómenos de recombinación meiótica (véase cap. 12).

Parálogo: Genes miembros de una familia génica, derivados de una o más duplicaciones de una región del ADN en el curso de la evolución, y con funciones relacionadas pero diferentes; un ejemplo son los genes correspondientes u homólogos en las cuatro series de genes homeóticos humanos, los genes *HOX* (véase cap. 16).

Patogenia: Mecanismo por el cual una enfermedad causa daños orgánicos, mediante los cuales surgen los signos y síntomas de la enfermedad.

Pérdida de la heterocigosis (LOH): Expresión muy usada en el estudio de los tumores, que indica que las células pretumorales o tumorales han perdido el alelo normal correspondiente a un gen anormal de desarrollo tumoral y están en curso de volverse totalmente malignas (véase cap. 19).

Perfil de expresión génica: estudio comparado de la expresión génica de un tejido normal o patrón comparado con otro diferente, por medio de microarreglos (véase cap. 6).

Piebaldismo: Defecto genético segmentario de la pigmentación, producido por mutaciones del gen *KIT*.

Plaquinas: Familia de proteínas (como la desmoplaquina) importantes en la piel y otros epitelios.

Plásmido: Molécula pequeña (generalmente de unas pocas kb) de ADN circular que es usado como "vector" para vehiculizar fragmentos de ADN en manipulaciones genéticas. Los plásmidos **naturales** existen como ADN extracromosómico en muchas bacterias, de donde se aíslan. Los plásmidos **artificiales** (o "construcciones") son fabricados por manipulaciones e injertos de moléculas de plásmidos, fagos y otros orígenes (véase cap. 3).

Pleiotropía: Expresión de un gen normal o mutante que produce efectos aparentemente no relacionados entre sí; manifestaciones múltiples y aparentemente independientes, de la expresión de un único gen.

Ploidía: Número de copias de conjuntos cromosómicos (diploide, poliploide, etc.).

Poliadenilación: Agregado de una "cola" de docenas de residuos de adenosina al extremo 3' del ARN transcripto, al final del proceso de maduración de éste.

Poligénico: Rasgo o enfermedad originado por la acción de varios genes normales o mutados; tiene un patrón no mendeliano de herencia.

Poliglutaminopatías: Grupo de enfermedades originadas en la expansión de repeticiones del triplete CAG (codificante de glutamina); incluye la enfermedad de Huntington (véase cap. 9).

Polimerasas: Enzimas que sintetizan polinucleótidos (ADN, ARN).

Polimerasas termorresistentes, polimerasa Taq: ADN polimerasas extraídas de bacterias termófilas (que viven a altas temperaturas), tales como la Taq, que han hecho posible la "reacción en cadena de la polimerasa".

Polimorfismo (de ADN): Presencia en la población humana de variantes inocuas, y en número significativo, de secuencias de ADN en loci determinados; por ejemplo, variantes en el número de repeticiones de microsatélites. Estos polimorfismos, para ser útiles en el mapeo génico, deben ser frecuentes en la población (véase cap. 11).

Polimorfismos cromosómicos: Presencia simultánea, en una población, de variantes cariotípicas inocuas; por ejemplo, duplicaciones de la heterocromatina del cromosoma Y.

Polimorfismos de longitudes de fragmentos de restricción (PLFR): Véanse "Restricción, polimorfismos" y cap. 11).

Polimormismos de mononucleótidos ("SNP"): variantes de una única base en una secuencia de ADN, sobre todo en regiones no codificantes de proteínas, que son heredables, pueden ser usadas como "marcadores" y son en promedio sólo 1 en 1.200 bases (véase cap. 6).

Poliploidía: Presencia de más de dos conjuntos cromosómicos. Es letal en la especie humana.

Presión de mutación: Expresión usada en Genética evolutiva para designar los efectos acumulativos de las mutaciones sobre la composición del genoma.

Primero (= cebador): Oligonucleótido, sintetizado a pedido y de acuerdo con una secuencia preestablecida, de 17-25 bases y que es utilizado como iniciador de la copia de segmentos de ADN en la reacción en cadena de la polimerasa. **Primero delantero** es el que se ubica al principio y **primero posterior** o **trasero** el que se ubica al final del fragmento para copiar. La secuencia de los primeros es complementaria de los extremos 3' del fragmento para replicar, pero en cadenas diferentes, y esas secuencias deben conocerse previamente; cada primero provee un extremo 3' con un oxhidrilo libre para la polimerasa (véase cap. 3).

Promotor: Secuencia reguladora de un gen, colocada en sentido 5' con respecto al gen,

y sobre la cual se asocia la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

Propósito, propositus: Miembro de la familia afectado por la enfermedad, con el que se inicia la investigación de una genealogía.

Proteoma: Conjunto de todas las proteínas que un organismo puede sintetizar, porque están codificadas en su genoma. El estudio del proteoma humano (alrededor de 1.000.000 proteínas) recién está en sus comienzos (véase cap. 6).

Proteosoma, proteasoma: Estructura cilíndrica multimérica presente en células eucariontes, cuya función es la degradación enzimática de proteínas celulares, marcadas por la ubicuitina para su destrucción.

PRS (SRP): (de Biología celular) Partícula de reconocimiento de la señal, en la secreción celular, compuesta de seis subunidades de proteína y una molécula de ARN.

Pruebas de ADN, pruebas genéticas: Pruebas (tests) que permiten diagnosticar una alteración del genoma o una enfermedad hereditaria (véase cap. 1).

"Puntos calientes" (de recombinación meiótica): Regiones del ADN donde hay más eventos de recombinación que lo que es habitual en el restro del genoma.

Quiasma: Entrecruzamiento formado por dos de las cuatro cromátidas de un bivalente, visible desde el diplotene en la profase meiótica I, que señala el lugar donde se produjo un entrecruzamiento con recombinación meiótica (véase cap. 12).

Quimera: organismo obtenido por la fusión de dos cigotos de diferente origen, que dan lugar a tejidos y órganos con linajes de células con genomas diferentes; por ejemplo, la fusión de un cigoto 46,XY con otro 46,XX, que da un organismo "quimera" generalmente hermafrodita. Son muy raros, excepto los provocados artificialmente.

Rad: Unidad de radiación ionizante absorbida por el organismo, aproximadamente igual a 1 Roentgen (véase cap. 8).

Reacción en cadena de la polimerasa, RCP = PCR en inglés: Técnica muy empleada para "amplificar" ADN, es decir, replicar una o más moléculas de ADN que sirvan de molde, en millones de copias idénticas, en un aparato "termociclador", mediante la intervención de polimerasas termorresistentes y "primeros" de secuencia prefijada (véase cap. 3).

RecA (Recombinasa A): La primera de las proteínas identificada como un factor de recombinación (en procariontes, donde no hay meiosis, hay recombinación génica entre el ADN bacteriano y ciertos ADN que ingresan en la célula). En los eucariontes, se reconocen proteínas homólogas a la RecA bacteriana: la RAD51 y la DMC1 (véase cap. 12).

Receptor (celular): Proteínas integrales de la membrana celular, que poseen un "dominio" especializado para reconocer una sustancia externa o "ligando" (otra proteína, una hormona, etc.) y unirse a ella con gran afinidad y que por otro "dominio" de su estructura pueden transmitir la señal de la asociación con el ligando ("transducción" de señal).

Recesividad: Condición de una mutación por la cual, para su expresión en el fenotipo, es necesario que sea homocigota (que esté en dosis doble).

Receptores nucleares: grupo de proteínas nucleares que al unirse a un "ligando" o sustancia que ingresa desde fuera del núcleo, pueden actuar como factores de transcripción, activando o inhibiendo la transcripción de uno o más genes (véase cap. 7).

Recombinación (génica): Producción de nuevas combinaciones de genes ligados por entrecruzamiento. La recombinación típica ocurre en la profase meiótica ("recombinación meiótica") y consiste en un proceso complejo, por el cual dos moléculas de ADN, una materna y otra paterna, intercambian recíprocamente segmentos (véase cap.12).

Recombinasas: Enzimas involucradas específicamente en la recombinación meiótica (RecA, RecBCD y otras; véase cap. 12).

REN, reparación por escisión nucleotídica: Mecanismo fundamental de reparación de errores y cambios en el ADN (véase cap. 8). En el REN intervienen numerosas proteínas como las helicasas específicas y endonucleasas, cuyo genes, en caso de estar alterados, determinan "enfermedades por fallas del REN"

Reparación de ADN (sistemas de): Mecanismos celulares de varios tipos, por medio de los cuales se corrigen errores introducidos en el ADN durante su replicación y cambios moleculares inducidos por factores externos "mutagénicos" Los principales sistemas de reparación del ADN son el de "reparación de mal apareamiento" (REMA = MMR, "mismatch repair" en inglés; véase "mal apareamiento") y el de "reparación por escisión nucleotídica, REN = NER en inglés).

Replicón: Unidad del genoma que posee un "origen de replicación" funcional o "secuencia de replicación autónoma" (SRA). Cada cromosoma humano posee centenares de replicones (véase cap. 4).

Represor: Molécula proteínica que se asocia al promotor de un gen e impide su transcripción.

Resolvasas: Enzimas involucradas en los pasos finales del proceso de recombinación meiótica; también enzimas involucradas en recombinación de sitio específico, entre transposones.

Restricción (enzimas de): Endonucleasas que cortan ADN en secuencias específicas y que se usan en las manipulaciones genéticas "in vitro" en las técnicas de "ADN recombinante" (véase cap. 3).

Restricción, polimorfismos de longitudes de fragmentos de; PLFR; RFLP: Variaciones (polimorfismos) heredables en secuencias de ADN que poseen puntos de ataque para enzimas de restricción y producen, por consiguiente, fragmentos de longitudes diversas, que son útiles como "marcadores".

Retrovirus: Virus con genoma de ARN, que tiene la capacidad de copiar su genoma a ADN mediante la transcriptasa inversa, e integrar ese ADN al ADN genómico de una célula; por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous o el virus HIV (del SIDA).

Ribosomas: Estructuras citoplasmáticas de 25 nm de diámetro, asociadas al retículo endoplasmático o libres, que son el sitio del proceso de traducción o síntesis de proteína.

Ribozima: Molécula de ARN dotada de actividad catalítica, que la hace similar a una enzima. La actividad de tipo ribozima se evidencia en muchos ARN, como se observa en los casos en que un ARN transcripto procede a su "autoempalme" cortando y repegando su propia molécula.

RISC, Complejo silenciador inducido por ARN: complejo proteínico que destruye los ARN en los fenómenos de interferencia de ARN (véase cap. 7).

Roentgen: Unidad de dosis de radiación ionizante (aproximadamente 2×10^9 pares de iones en 1 cm^3 de aire); para dosis de radiación absorbida en personas se usa el gray, equivalente aproximadamente a 100 roentgens absorbidos, o su unidad similar, el sievert (Sv) (véase cap. 8).

ROS: Formas reactivas del oxígeno, que producen importantes daños celulares y han sido vinculadas con aspectos del envejecimiento.

Rupturas (fracturas) del ADNdc: Fractura de las dos hélices del ADN en un sitio determinado. Pueden ser naturales (durante la meiosis), producidas por la proteína SP011 (véase cap. 12) o accidentales (por radiaciones ionizantes; véase cap. 8).

Sanger (método de): Método de secuenciar el ADN mediante enzimas y didesoxirribonucleótidos (véase cap. 5).

Satélite (ADN): ADN formado por secuencias muy repetidas ("altamente repetidas"), localizado en regiones de heterocromatina constitutiva. Originalmente fue llamado "satélite" por separarse como un "pico satélite" del pico principal de ADN nuclear, en procedimientos de centrifugación isopícnica en gradientes de CICs.

Satélite (cromosómico): Pequeña masa cromatínica unida por una constricción al brazo corto de los cromosomas acrocéntricos 13-15 y 21-22 en la especie humana. Esta cromatina es casi totalmente inactiva (heterocromatina constitutiva).

Secuenciación (de ADN): Determinación del orden estricto de las bases a lo largo de una molécula de ADN, con el fin de descodificar su información. La secuenciación se realiza sobre una cadena sola y generalmente mediante el método de Sanger. La secuenciación de todo el genoma humano constituye el "Proyecto Genoma Humano"

Secuencias consenso, de consenso o consensuadas: Véase "Consenso"

Secuencias de replicación autónoma (SRA = "ARS" en inglés): Secuencias de alrededor de un centenar de pares de bases, que contienen "secuencias de consenso" de 11 nucleótidos, reconocidas por proteínas especiales que se asocian con ellas, para constituir "complejos de origen de replicación" en los replicones (véase cap. 4).

Secuencias repetidas cortas y dispersas (SINEs): En la especie humana, representadas por la familia de secuencias Alu (véanse Alu y cap. 4).

Secuencias repetidas en tándem (SRT = TRS en inglés): Copias de secuencias colocadas sin interrupción una tras otra y en el mismo sentido (cabeza a cola), para diferenciarlas de las repeticiones con sentido inverso.

Secuencias repetidas largas y dispersas: Véase "LINEs"

Segregación (cromosómica): Separación normal de los miembros de una pareja de cromosomas homólogos en la anafase de la división meiótica I. Similar a "disyunción"

Segregación (génica): Separación de un par de alelos presentes en un individuo, al examinar su progenie; esta separación se expresa en la segunda ley de Mendel y es el resultado de la segregación meiótica de los cromosomas homólogos.

Selección (natural, darwiniana): Proceso que guía una parte significativa de la evolución biológica, al limitar la reproducción de algunos miembros de poblaciones y hacer variar consiguientemente los parámetros génicos de la población (el agregado total o "pool" de genes). El "coeficiente de selección" es una medida de la intensidad de la selección contra un determinado gen o contra un genotipo determinado.

Seudogén: Secuencia muy similar a la de un gen y originada por una duplicación de éste, pero que no es funcional, debido a mutaciones, pérdidas o duplicaciones en su secuencia. Hay muchos seudogenes en las "familias génicas", por ejemplo, de las α y β globinas.

Seudogén procesado: Seudogén de origen especial, producido por retroposición de una secuencia de ARNm. Se caracterizan por una secuencia poliadenílica en 3' y frecuentemente están truncados en el extremo 5' (véase cap. 4).

Seudohermafroditismo: Anomalía en la cual las gónadas son de un tipo único y bien definido (masculino o femenino) pero otros caracteres del fenotipo sexual no se corresponden con el sexo gonadal o son ambiguos; con frecuencia estos elementos discordantes son partes derivadas de los conductos de Wolff o de Müller, o de los genitales externos (véase cap. 10).

Sinapsis: Apareamiento de los cromosomas homólogos, que se produce en la profase meiótica. Sinapsis homóloga es la que se realiza entre segmentos homólogos; sinapsis heteróloga o heterosinapsis es la que ocurre entre segmentos no homólogos.

Sindactilia: Anomalía congénita consistente en la presencia de pliegues cutáneos que cierran los espacios interdigitales ("manos de rana").

Síndrome: Conjunto de síntomas y signos característico de un estado patológico, pero del cual, al ignorarse algunos aspectos, en especial el origen, no es posible aún calificarlo como una enfermedad definida.

Síndrome de Rett: Grave enfermedad hereditaria ligada al sexo, que provoca profundo

retraso mental en mujeres y es letal en varones (véase cap. 7).

SINEs: Véanse "Secuencias repetidas cortas y dispersas" y "Alu".

Sinténico: Genes o secuencias pertenecientes al mismo cromosoma; este término es más general que el de "ligamiento" porque todos los genes de un cromosoma son sinténicos, aunque su ligamiento sea ligero o nulo (porque están distantes).

Sitio: Refiriéndose a un genoma o un ADN, lugar específico de una secuencia; por ejemplo, "sitio de restricción de una enzima" es la secuencia reconocida por ella.

SNP "Single Nucleotide Polymorphism" pronunciado "snip"). Polimorfismo de un único nucleótido dentro de la secuencia del ADN, generalmente en una región no génica. Existen más de diez millones en el genoma humano y sirven como "marcadores" para estudios de ligamiento.

Sonda ("probe" en inglés): Segmento de ADN o de ARN, marcado ya sea con un isótopo radiactivo o con un compuesto capaz de ser identificado por un reactivo fluorescente, usado para hibridarse "in vitro" con un ADN o un ARN, con el fin de identificar la localización de la secuencia complementaria a la sonda. Las sondas hacen posibles la técnica de Southern, la impronta puntual (*dot-blot*), la hibridación in situ y fluorescencia (HISYF = FISH) y muchos otros procedimientos.

Southern (técnica): Véase "Impronta de Southern".

SRA: Véase "Secuencias de replicación autónoma"

SRY ("Sex region, Y"): Gen del cromosoma Y, fundamental para la determinación sexual; es el gen "conmutador" que determina la vía de formación del testículo.

Subclonación (de ADN): Procedimiento para clonar los fragmentos más pequeños que produce un fragmento mayor ya clonado.

Superenrollamiento (de ADN): Enroscamiento sobre sí misma de una molécula cerrada o circular de ADN; en el superenrollamiento, la molécula de ADN de doble hélice se tuerce en una espiral mayor, que puede ser de sentido negativo o positivo (véase cap. 4).

SYCP1 (=Syn1), SYCP3 (=Cor1): Proteínas constitutivas de los filamentos transversales (SYCP1) y de los elementos laterales (SYCP3) de los complejos sinaptonémicos (véase cap. 12).

Talasemias: Grupo de enfermedades hereditarias de la sangre, caracterizadas por deficiencias de globinas α o β (véase cap. 15).

Talidomida: Medicamento usado como tranquilizante hasta 1963, cuando se probó que tenía un poderoso efecto teratogénico (véase cap. 2).

Tasa de mutación espontánea: Número de mutantes aparecidos en una generación, para un gen específico, respecto del número total de ese gen en estado normal. Es diferente en varones y en mujeres, y es variable de un gen a otro (véase cap. 8).

Telomerasa: Enzima ribonucleoproteínica, necesaria para replicar los extremos teloméricos mediante un proceso específico para esas regiones.

Telómeros: Regiones terminales de un cromosoma, que poseen propiedades especiales y una estructura molecular propia. El ADN telomérico es característico: está formado por centenares de repeticiones de un hexanucleótido TTAGGG, hasta formar un segmento de 10 a 15 kb; también posee proteínas especiales (véase cap. 4).

Teratógeno: Agente capaz de inducir malformaciones congénitas al actuar sobre el embrión.

Termocicladores: Aparatos que permiten programar y condicionar temperaturas constantes y cambios cíclicos de ellas, para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa.

Tesaurosis: Enfermedades por acumulación de una sustancia (la "atesoran") en los tejidos (véase cap. 14).

Titina: Proteína filamentosa de gran longitud propia de células musculares, cuyo gen tiene el máximo número de exones (véase cap. 6).

Traducción (del código genético): Síntesis de proteínas, codificadas en ARN mensajero.

Transcripción (del código): Síntesis de ARN sobre el molde del ADN.

Transcriptasa inversa ("reverse transcriptase"): Enzima codificada en el genoma de retrovirus, que permite la síntesis de ADN de cadena simple a partir de un ARN. Esta enzima es muy usada en manipulaciones genéticas.

Transformación (bacteriana): Incorporación de ADN foráneo a una bacteria; paso usual en las técnicas de clonado de genes.

Transgénico (organismo): Que posee genes foráneos, artificialmente introducidos en el cigoto que lo originó.

Transición (de una base de ADN): Cambio mutacional de una base de tipo purínico o pirimidínico por otra de su mismo tipo.

Translocación (cromosómica): Anomalía cromosómica estructural, por la cual dos cromosomas no homólogos se intercambian trozos (t. recíproca) o un cromosoma recibe un segmento de otro (t. simple, transposición) (véase también "fusión céntrica").

Translocación robertsoniana = Fusión céntrica: Tipo de translocación que ocurre entre cromosomas acrocéntricos (véase "Fusión céntrica" y cap.18).

Transposón: Segmento de ADN que tiene la capacidad de insertarse en variados lugares del genoma, cambiando de uno a otro y sin tener homología con ellos. Los transposones codifican las enzimas transposasas para sus movimientos y tienen repeticiones invertidas en sus extremos; cuando se insertan, generan duplicaciones cortas en dicho sitio.

Transversión (de una base de ADN): Cambio mutacional de una base de tipo purínico por otra de tipo pirimidínico y viceversa.

Triploidía: Presencia de tres conjuntos cromosómicos. Es letal en la especie humana.

Trirradio: Punto de convergencia de tres áreas de crestas dérmicas y las tres crestas limitantes, formando un dibujo en Y (véanse "Dermatoglifos" y cap. 2).

Trisomía: Presencia por triplicado de un cromosoma; la más frecuente es la del cromosoma 21, que causa el síndrome dé Down.

Trozador, "DICER": Complejo proteínico con actividad de ribonucleasa tipo III que interviene en los fenómenos de interferencia de ARN (véase cap. 7).

Varioma: Conjunto de las mutaciones que pueden afectar el genoma humano (véase cap. 1).

Vector: Cualquiera de los diferentes tipos de moléculas de ADN utilizadas para vehiculizar fragmentos de ADN en el interior de una bacteria o de otra célula, con el fin de clonar el fragmento vehiculizado. Los principales vectores son "plásmidos", "cósmidos" y "cromosomas artificiales" (véase cap. 3).

WAGR (Síndrome): Asociación del tumor renal (de Wilms), aniridia, anomalías genitales y retraso mental, relacionada con deleciones del gen PAX6 (véase cap. 16) y con síndromes de genes contiguos (véase cap. 18).

XIST: Gen no traducible que es fundamental en la lionización del segundo cromosoma X de la mujer (véase cap. 11).

X frágil (síndrome del): Véanse "Frágil" y cap. 18.

"Zonas críticas" de síndromes por deleción o duplicación: Mediante el refinamiento de los métodos para determinar genes decisivos en los segmentos delecionados o duplicados, se determinan cuáles son las regiones más importantes para la producción del síndrome (véase cap. 18).

BIBLIOGRAFÍA

Lewin B. Genes VI. Oxford, UK: Oxford University Press; 1997.

Rieger R, Michaelis A, Green MM. Glossary of Genetics. Classical and Molecular, 5th ed. Berlin: Springer-Verlag; 1991.

Traducción (del código genético): Síntesis de proteínas, codificadas en ARN mensajero.

Transcripción (del código): Síntesis de ARN sobre el molde del ADN.

Transcriptasa inversa ("reverse transcriptase"): Enzima codificada en el genoma de retrovirus, que permite la síntesis de ADN de cadena simple a partir de un ARN. Esta enzima es muy usada en manipulaciones genéticas.

Transformación (bacteriana): Incorporación de ADN foráneo a una bacteria; paso usual en las técnicas de clonado de genes.

Transgénico (organismo): Que posee genes foráneos, artificialmente introducidos en el cigoto que lo originó.

Transición (de una base de ADN): Cambio mutacional de una base de tipo purínico o pirimidínico por otra de su mismo tipo.

Translocación (cromosómica): Anomalía cromosómica estructural, por la cual dos cromosomas no homólogos se intercambian trozos (t. recíproca) o un cromosoma recibe un segmento de otro (t. simple, transposición) (véase también "fusión céntrica").

Translocación robertsoniana = Fusión céntrica: Tipo de translocación que ocurre entre cromosomas acrocéntricos (véase "Fusión céntrica" y cap. 18).

Transposón: Segmento de ADN que tiene la capacidad de insertarse en ventanos lugares del genoma, cambiando de uno a otro y sin tener homología con ellos. Los transposones codifican las enzimas transposasas para sus movimientos y tienen repeticiones invertidas en sus extremos; cuando se insertan, generan duplicaciones cortas en dicho sitio.

Transversión (de una base de ADN): Cambio mutacional de una base de tipo purínico por otra de tipo pirimidínico y viceversa.

Triploidía: Presencia de tres conjuntos cromosómicos. Es letal en la especie humana.

Trirradio: Punto de convergencia de tres áreas de crestas dérmicas y las tres crestas limí-

tantes, formando un dibujo en Y (véanse "Dermatoglifos" y cap. 2).

Trisomía: Presencia por triplicado de un cromosoma; la más frecuente es la del cromosoma 21, que causa el síndrome de Down.

Trozador, "DICER": Complejo proteínico con actividad de ribonucleasa tipo III que interviene en los fenómenos de interferencia de ARN (véase cap. 7).

Varioma: Conjunto de las mutaciones que pueden afectar el genoma humano (véase cap. 1).

Vector: Cualquiera de los diferentes tipos de moléculas de ADN utilizadas para vehiculizar fragmentos de ADN en el interior de una bacteria o de otra célula, con el fin de clonar el fragmento vehiculizado. Los principales vectores son "plásmidos", "cósmidos" y "cromosomas artificiales" (véase cap. 3).

WAGR (Síndrome): Asociación del tumor renal (de Wilms), aniridia, anomalías genitales y retraso mental, relacionada con deleciones del gen PAX6 (véase cap. 16) y con síndromes de genes contiguos (véase cap. 18).

XIST: Gen no traducible que es fundamental en la inactivación del segundo cromosoma X de la mujer (véase cap. 11).

X frágil (síndrome del): Véanse "Frágil" y cap. 18.

"Zonas críticas" de síndromes por deleción o duplicación: Mediante el refinamiento de los métodos para determinar genes decisivos en los segmentos delecionados o duplicados, se determinan cuáles son las regiones más importantes para la producción del síndrome (véase cap. 18).

BIBLIOGRAFÍA

Lewin B. Genes VI. Oxford, UK: Oxford University Press; 1997.

Rieger R, Michaelis A, Green MM. Glossary of Genetics. Classical and Molecular, 5ª ed. Berlin: Springer-Verlag; 1991.

Apéndice I

ADVERTENCIAS IMPORTANTES PARA ADQUIRIR INFORMACIÓN ADICIONAL SOBRE ADELANTOS EN GENÉTICA HUMANA Y MÉDICA A TRAVÉS DE INTERNET

1. Importancia de Internet

La "red de redes" informáticas o Internet se está desarrollando como un instrumento útil para la difusión de los conocimientos sobre Genética Médica. Internet no es, al menos en su estado actual, un medio apropiado para *aprender Genética*, y quien lo intentare verá rápidamente la futilidad de su propósito. Por otra parte, la enorme cantidad de información actualmente depositada en la Red ("Web") es de muy variada relevancia y calidad, de tal manera que quien se aventura en su "navegación" sin conocimiento previo del tema, muy probablemente perderá tiempo valioso y contribuirá a la congestión de los canales de información, con escaso provecho. Es aconsejable, al recurrir a Internet, saber previamente: a) *qué es lo que se busca*, con definiciones y siglas exactas y b) *dónde* hay que buscar esa información, dentro de la Red, con precisión. Los siguientes son sitios de la Red que son aconsejables para adquirir información útil en forma cómoda y rápida.

2. Sitios aconsejados en la Red para Genética Médica

Dos sitios son altamente aconsejables, cada uno con sus características propias:

A. El OMIM ("Online Mendelian Inheritance in Man"). Excelente sitio, que contiene la mayor cantidad de información disponible sobre enfermedades hereditarias humanas, y que se actualiza en forma muy frecuente. Dispone de información sumamente autorizada, que proviene de su Director, el Prof. Dr. Victor A. McKusick y sus colaboradores de la Universidad Johns Hopkins (Baltimore, MD, EE.UU.) y del National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, EE.UU.). OMIM es una marca registrada y debe citarse como tal, con sus dos instituciones patrocinadoras ya citadas. La dirección en la Red (URL) es:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/

El OMIM ofrece muchos tipos de información, que se indican en su página inicial ("home page"). El usuario puede buscar artículos completos a través de palabras clave (p. ej., "albinism", o "fragile X", o la sigla de un gen, como "FMR-1" o una región cromosómica, como "Xq"), o puede pedir una lista ordenada de genes en cada cromosoma. Además posee numerosas referencias automáticas ("hipervínculos") que trasladan al usuario al "sitio" correspondiente. El uso del OMIM es gratuito y no requiere registro del usuario. La base de datos, o partes de ella, se pueden volcar al usuario ("bajar"), aunque no es aconsejable, dado su fácil acceso y su continua actualización.

B. Los "GENE CARDS" del Centro del Genoma, del Instituto Weizmann, y de la Unidad de Bioinformática del mismo Instituto. Este "sitio" de la Red es probablemente el que proporciona información fiable en la forma más clara, concisa y útil para el médico.

Esta base de datos está construida alrededor de "tarjetas" una para cada gen, que traen la información condensada en la cómoda forma de una única tabla o "tarjeta" con las siglas oficiales y los sinónimos del gen, la proteína codificada y sus propiedades, las afecciones causadas por sus mutaciones y las referencias, por "hipervínculos" a otras bases de datos. Su dirección (URL) es:

http://www.genecards.org/index.shtml

Su uso es gratuito y no requiere registro del usuario.

3. Otros "sitios" de la Red

Hay numerosos sitios adicionales en la Red, que son de uso altamente especializado (p. ej., para obtener secuencias almacenadas de bases) o son repetitivos y complicados para acceder, y también hay sitios de información irrelevante o de escasa fiabilidad. Entre los sitios fiables y especializados señalamos:

A. SWISS-PROT, para la información sobre proteínas, incluida su estructura espacial. Su dirección es:

http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html

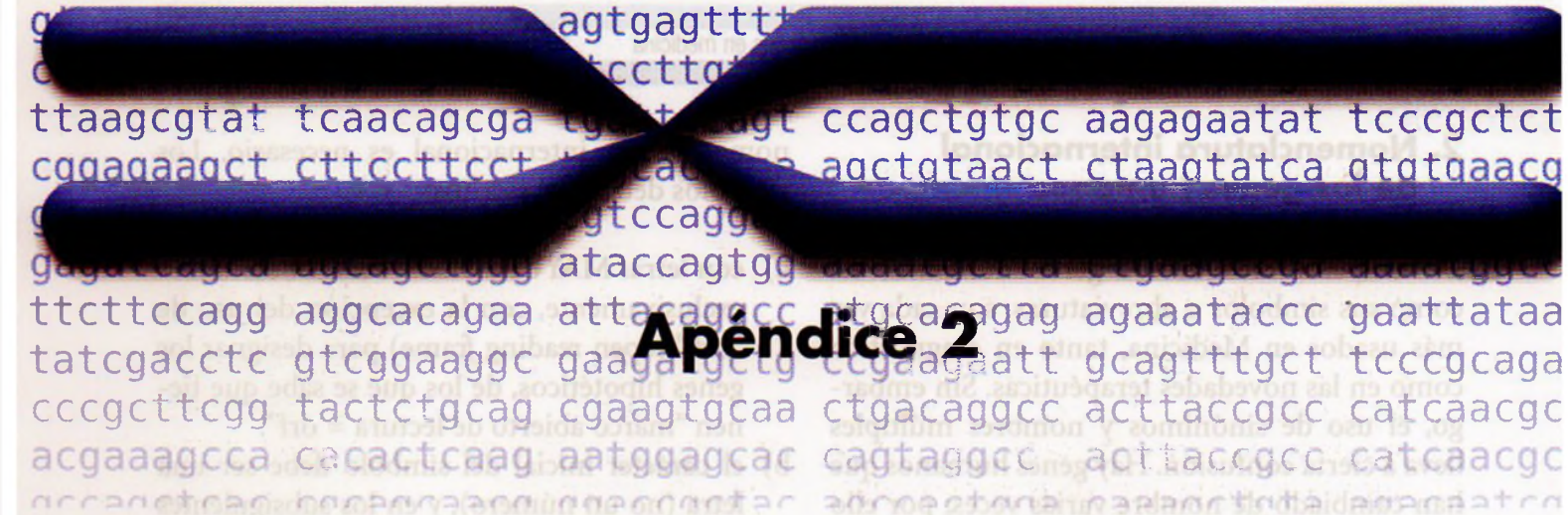
B. La base de datos de "Entrez", para secuencias. Su dirección es:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/index.html

C. La PUBMED, base de datos bibliográficos, de la National Library of Medicine (EE.UU.), que permite acceder a los resúmenes de varios millones de trabajos científicos publicados en las últimas décadas. Su dirección es:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/

Finalmente, no es superfluo insistir en que la utilidad de la información obtenida está directamente relacionada con el conocimiento previo del área (se buscan detalles) y con el espíritu crítico del usuario.



Apéndice 2

1. **ABREVIATURAS DE LOS AMINOÁCIDOS NATURALES. CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS**
2. **NOMENCLATURA INTERNACIONAL DE LOS GENES HUMANOS**
3. **REGLAS DE NOMENCLATURA PARA LAS MUTACIONES HUMANAS**
4. **REGLAS DE NOMENCLATURA PARA CITOGENÉTICA HUMANA**

1 Abreviaturas de los aminoácidos naturales

Los veinte aa naturales son cada vez más representados por su abreviatura de una *única* letra (que es menos reconocible que la de tres letras, pero es la más usada en bioinformática). A continuación se expresan los nombres y los dos tipos de abreviatura de cada aa.

Cuadro 1. Abreviaturas de los aminoácidos naturales

Nombre	Símbolo de tres letras	Símbolo de una letra	Carácter de residuo
Alanina	Ala	A	hidrofóbico
Arginina	Arg	R	básico
Asparagina	Asn	N	neutro
Ac. aspártico	Asp	D	ácido
Cisteína	Cys	C	neutro, hidrofóbico
Glutamina	Cln	Q	neutro
Ac. glutámico	Glu	E	ácido
Glicina	Gly	G	——
Histidina	His	H	básico
Isoleucina	Ile	I	hidrofóbico
Leucina	Leu	L	hidrofóbico
Lisina	Lys	K	básico
Metionina	Met	M	neutro
Fenilalanina	Phe	F	hidrofóbico, aromático
Prolina	Pro	P	rígido
Serina	Ser	S	neutro
Treonina	Thr	T	neutro
Triptofano	Trp	W	hidrofóbico, aromático
Tirosina	Tyr	Y	hidrofóbico, aromático
Valina	Val	V	hidrofóbico

Selenocisteína Sec U*

* (La selenocisteína se encuentra en algunas proteínas humanas, tales como las de la vaina mitocondrial de los espermatozooides, que incorporan el elemento Selenio.)

2. Nomenclatura internacional de los genes humanos

Los nombres de los genes humanos, así como sus símbolos o abreviaturas, son cada vez más usados en Medicina, tanto en diagnóstico como en las novedades terapéuticas. Sin embargo, el uso de sinónimos y nombres múltiples lleva a cierta confusión. Hay genes humanos que han cambiado de nombre varias veces; por ello es conveniente ajustarse a las normas internacionales de la Organización del Genoma Humano (Human Genome Organization; abreviado: HUGO), que están disponibles en Internet (www.genenames.org).

En caso de dudas, conviene consultar una base de datos que contiene los sinónimos, tal como Gene Cards (www.genecards.org/index.shtml) u OMIM (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim).

3. Normas generales sobre nomenclatura de genes humanos

En principio, los nombres de los genes humanos deben ser únicos, al igual que su abreviatura o símbolo; deben contener sólo números arábigos (no romanos) y sólo letras de alfabeto latino (no griego), no deben contener signos de puntuación y no deben terminar con la letra "G" para indicar que es un gen, ni "H" o "h" para significar que es humano.

Para esta nomenclatura, un gen es "un segmento de ADN que se manifiesta en el fenotipo o en una función", aunque sea hipotética en muchos casos. Un "locus" es un lugar en un mapa genético, contenga o no genes. Una "región cromosómica" es una región del genoma que se asocia con un fenotipo o un síndrome.

5. Símbolos o abreviaturas de genes humanos

Los símbolos de los genes humanos son importantes para encontrarlos rápidamente en las bases de datos. En ese sentido, el uso de la nomenclatura internacional es necesario. Los símbolos deben ser escritos:

a) con letras MAYÚSCULAS, del alfabeto latino exclusivamente, con la excepción del uso de "orf" (*o*pen *r*eading *f*rame) para designar los genes hipotéticos, de los que se sabe que tienen "marco abierto de lectura = orf"
b) el carácter inicial del símbolo debe ser una letra (no un número), y en los subsiguientes no puede haber suscritos ni superscritos.
c) las letras griegas presentes en los nombres previos de genes son sustituidas por su equivalente del alfabeto latino (p. ej., gen de la subunidad alfa, o beta, queda como subunidad A o B). Los diferentes ARN transcriptos por empalme alternativo no reciben símbolos de genes; las proteínas variantes derivadas de esos empalmes alternativos se abrevian con el símbolo de la proteína mayor y luego un guión bajo y la letra "v" (de variante) y el número que le corresponda.
d) ciertos caracteres quedan reservados para usos específicos:

AS: antisentido
AP: *p*roteína asociada o *a*ccesoria
BP: proteína ligadora de, o ligante a
C: catalítico
CR: región cromosómica
DC: dominio que contiene
FAM: familia (con similitud de secuencias)
N: inhibidor
IP: proteína interactiva
IT: transcripto intrónico
LG: ligando
L: (de "like") símil
MT: mitocondrial
P: seudogén
R: receptor
RG: regulador

En el caso de que un gen pertenezca a una familia de genes, se coloca un número (arábigo) correspondiente, inmediatamente después de la sigla del gen.

De esta manera, el símbolo *UGT1A1* corresponde al gen de la proteína *UDP glicosil-transferasa, familia 1, polipéptido A1.*

Algunos ejemplos de nombres de genes humanos y sus símbolos son:

AR ("androgen receptor"): receptor de andrógenos

G6PD: glucosa-6 fosfato deshidrogenasa, gen de

HD ("Huntington disease"): enfermedad de Huntington, o huntingtina, gen de la

CFTR ("Cystic fibrosis transmembrane regulator"): gen de la enfermedad fibroquística

COL1A1: colágeno de tipo I, cadena alfa-1.

3. Reglas de nomenclatura para las mutaciones humanas

La nomenclatura de los cambios en el genoma (mutaciones y polimorfismos) pueden ser expresados ya sea en el nivel de ácidos nucleicos o de proteínas: se recomienda que la expresión de los cambios se haga en *ambos* niveles, y hay diferencias de nomenclatura en ambos.

Expresión de las mutaciones a nivel del ADN:

En primer lugar, es necesario indicar si se refiere al ADN genómico o al ADN complementario (ADNc). Más raramente, si se trata de ADN mitocondrial (se precede por "m"), o una secuencia de ARN (se precede por "r").

En los casos generales, si se trata de ADN genómico, se precede su designación con "g" y si se trata de un ADN complementario, se precede con "c". En ambos casos es necesario identificar la secuencia nucleotídica por su "número de acceso" que es el número con el cual se introduce cada secuencia en una base de datos.

Además del número de acceso, debe figurar el número del nucleótido (o nucleótidos) donde se produjo el cambio. Para ello, se usan las siguientes convenciones:

Nucleótido +1 : es el A (adenina) del triplete ATG de iniciación; todos los demás van en orden, de 5' hacia 3'. Hacia la izquierda (5') se numeran con signo negativo.

Nucleótido *1 : es el nucleótido final del triplete de terminación.

IVS ("intervening sequence"): abreviatura usada para las secuencias de intrones.

Mutaciones en intrones: IVS, luego el número del exón precedente, la posición del nucleótido y un signo + si se numera el nucleótido mutado desde el inicio del intrón, es decir, desde la G del GT constante en ese inicio. Luego sigue el cambio en dicho nucleótido.

Sustituciones de nucleótidos: se expresan con el signo ">" que viene a sustituir al signo de flecha también usado anteriormente. Primero se coloca la base original, luego el signo > y luego la base mutante, todo precedido por el número (de posición del nucleótido).

Por ejemplo: "g.35A>T" expresa una sustitución de una adenina por una timina (mutante) a nivel del nucleótido +35 del ADN genómico, en una secuencia identificada con su número de acceso (de cinco cifras y una letra). Anteriormente, esta mutación se expresaba: A → T, en el nucleótido 35.

Las deleciones e inserciones de nucleótidos se designan con un signo "_" encerrado entre el número del nucleótido anterior y el posterior al cambio, y un "del" o un "ins" si se trata de deleción o de inserción, más la o las bases cambiadas; por ejemplo:

g.35_38del AC expresa la deleción de las bases A y C en las posiciones 36 y 37 de un ADN genómico.

Expresión de las mutaciones a nivel de la proteína

Para las mutaciones, a nivel de las proteínas, se usa el código de aa de una sola letra (véase antes), con la numeración de los aa empezando por el +1 correspondiente a la metionina inicial; pero, a diferencia del ADN, el número del aa cambiado va en el medio y no al principio, y sin otro signo. Por ejemplo:

"W26C" en una proteína designa el cambio del aa número 26, del triptofano (W) original a una cisteína (C) mutante.

En estas expresiones, cuando un aa es cambiado a un codón de terminación que deja trunca la proteína, ese codón se expresa con la letra "X"

4. Reglas de nomenclatura para la Citogenética humana

La nomenclatura citogenética se emplea desde hace años en el ambiente hospitalario. Las normas más básicas son:

Número modal + complemento sexual + tipo de aberración + cromosoma(s) alterado(s) + brazo y número de banda involucrado(s). El número modal es el número total de cromosomas por célula en una línea celular determinada. El complemento sexual es la enumeración de los cromosomas sexuales de una célula. El (o los) cromosoma alterado se coloca entre paréntesis. También entre paréntesis se coloca el número de la banda anormal. Algunas abreviaciones de las aberraciones son:

del: deleción o pérdida
der: cromosoma derivado (producto de una o más translocaciones)
dic: dicéntrico
dup: duplicación
fra: sitio frágil
h: región heterocromática
i: isocromosoma
ins: inserción
inv: inversión
mar: cromosoma marcador
-: pérdida cromosómica
+: ganancia de un cromosoma
pat: derivado paternal
p: brazo corto
q: brazo largo
t: translocación
ter: extremo terminal de un brazo
tri: trisomía
; signo separador, cuando hay más de dos cromosomas alterados

Por ejemplo:

46,XY,del(5)(p15) expresa una línea celular de 46 cromosomas, con cromosomas sexuales X e Y, que presenta una deleción terminal en el brazo corto del cromosoma número 5, en la banda 15.

Equivalencias del alfabeto griego (minúsculas) con el latino (mayúsculas)

alfa	α	A
beta	β	B
gamma	γ	G
delta	δ	D
épsilon	ε	E
zeta	ζ	Z
eta	η	H
theta	θ	Q
iota	ι	I
kappa	κ	K
lambda	λ	L
mu	μ	M
nu	ν	N
xi	ξ	X
ómicron	ο	O
pi	π	P
rho	ρ	R
sigma	σ	S
tau	τ	T
ípsilon	υ	Y
fi	φ	F
ji	χ	C
psi	ψ	U
omega	ω	W

REFERENCIAS

Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, et al. Guidelines for human gene nomenclature. Genomics 2002;79:464-470.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of sequence variations. Hum Genet 2001;109:121-124.

Mitelman F. An International system for human cytogenetic nomenclature. ISCN (1995). Basel: S. Karger.

Índice analítico

Los números de página seguidos por "c" indican un cuadro, los seguidos por "f" una figura, y los seguidos por "p" un panel.

A

Aberraciones (cromosómicas), 177, 314, 315p, 457, 462
  abreviaciones, 540
  estructurales, 314, 433, 434, 435, 442, 483
  numéricas, 430, 442, 483
  somáticas, 318
Acción pleiotrópica, 212
Ácido desoxirribonucleico, Véase *ADN*
Ácido retinoico, 404
Ácido ribonucleico, Véase *ARN*
Acondroplasia, 196
Adenina, 59
Adipocitos, 130
ADN, 5, 14
  ADNc, 33
  alfoide, 72
  centromérico, 77
  chips, 129
  circular, 66
  clasificación de las secuencias, 71, Véase también *Secuencias*
  clonación, 49
  codificación de la herencia, 9
  complementario, 33
  conformaciones especiales, 66
  cruciforme, 67
  desnaturalización, 68
  desperdicio, 72
  dimensiones de la molécula, 8
  egoísta, 72
  empaquetamiento, 76
  estructura, 59
  forma A, 7
  forma B o fisiológica, 7, 61
  forma Z, 61
  genotecas, 51
  de hélice triple, 68
  hibridación, 69
  humano, 20, 29
    Proyecto Genoma Humano, 10
  de lazos deslizantes, 67
  microarreglos, 129
  minisatélite, 327
  de las mitocondrias, 66
  modelo de la doble hélice, 6
  modelo molecular, 6
  molécula, estructura, 61
  morfología, 63
  polimerasas, 160
  pruebas diagnósticas, 11
  recombinante, técnicas, 39
  reparación, sistemas posreplicativos, 161
  satélites, 72
  secuenciación, 9, 53, 105
  sondas, 52
  superenrollamiento, 66
  tamaño de cada cromosoma, 119
  telomérico, 72, 81
  temperatura de fusión, 68
Agentes mutagénicos, 175
  químicos, 177
  rayos X, 175
Albinismo(s), 2, 213, 218
  AOC-1A, 213
  AOC-2, 215
  AOC-3, 215
  oculares (AO), 213
  oculocutáneo(s) (AOC), 219c
    1A, 220
Alcaptonuria, 348

Alelos, 2, 189
Alfabeto griego, equivalencias, 540
Alu, 73
Amelia, 18
Aminoácidos naturales, abreviaturas, 537
Androgénesis, 280
Anemia(s), 373
  falciforme, 392
  de Fanconi, 171
  hemolíticas, 272
Aneuploidía, 313, 432
Angiogénesis, 334, 480
Angiotensinógeno, 332
Aniridia, 407
Anticodón, 95
Antioncogenes, 482
Aquiropodia, 18
Aracnodactilia, 383
Arco tibial, 25
ARN, 9, 13
  heterogéneo nuclear, 109
  interferencia, 143
  mensajero, 9
  mundo del ARN, 93
  no codificante(s), 13, 91, 112, 113, 113f, 137, 143, 282p, 283
  nucleares pequeños, 102
  polimerasas, 109
  procesamiento, 112
  ribosómico, 102
  de transferencia, 102
Asociación SRY-ADN, 238
Aspectos éticos, 497
Aspectos legales, 497
Ataxia-telangiectasia, 12c, 493
Atrofia muscular
  espinobulbar, 242
  peronea, 31

B

Bacteriófagos, 40
Balanceo, 100
BamHI, 41
Bandeado cromosómico, 423
  bandas N, 425
  C, 425
  R, 425
Bases nitrogenadas, 9
Beta-amiloide, 336
Biometría, 19
Bouquet, 297
BRCA1, 173f, 180, 181, 492, Véase también *Gen(es), BRCA1, BRCA2*
BRCA2, 173f, 180, 181, Véase también *Gen(es), BRCA1, BRCA2*
  reparación de rupturas de ADN, 183f
Bromodominio, 140
Bromuro de etidio, 45

C

Cadherina, 334
Caja
  apareada, 406
  de CENP-B, 78
  GAM, 237
Cambio epigenético, 140
Camino metabólico, 347
  de la fenilalanina, 354
  de la galactosa (camino de Leloir), 351
Canal(es)
  de calcio, 195, 270p, 418
  de cloro, 131, 209, 211
  epitelial de sodio, 331p
  de potasio, 330
  de sodio, 330, 332f
Cáncer, 22, 478, 479
  colónico hereditario no polipósico, 165
  mamario y familiar, 181
  marcadores, 479
Cap, 98
Caperuza, 98
Caracteres
  cuantitativos, 18
  discretos, 18
Carga mutacional, 103
Cariotipo, 423, 430
  humano, 431
Cartílago, 410
Cascadas regulatorias, 400
Celera, 128
Célula(s)
  germinales, 227
  de Leydig, 228
  madre, 505
  de Sertoli, 226
Centimorgan, 259
Centro de inactivación del cromosoma X, 282
Chips de ADN, 134, Véase también *Microarreglo(s)*
Ciclo celular, 485f
Cigoteno, 296
Ciliopatías, 416, 417

poliquistosis renales, 418
retinitis pigmentaria, 419
síndrome de Bardet-Biedl, 418
síndrome de Kartagener, 416
Cinetocoros, 78
Citogenética, 423
estructural, 301
humana, nomenclatura, 540
Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana, 430
Citosina, 59
Clonación, 49
Clonamiento direccional, 47
CMT1A-REP, 31
Código genético, 9, 94
Código de histonas, 137
Código de principios éticos, 497
Códigos imbricados o superpuestos, 95
Códigos, redundancia, 99
Codones, 95
sinónimos, 99
de terminación, 98
Coeficiente de correlación, 23
entre parientes, 323
Cohesinas, 303
Cola poliadenilada, 51
Colágeno(s), 373, 378, 379p
II, 379p
VII, 385, 385f
IX, 379p
X, 379p
XI, 379p
XV, 378p
XVII, 375f
anomalías genéticas, 378
genes, 379
tipos, 379
Colas N-terminales, 139
Color de la piel, 26
Coloración del iris, 20
Compensación de dosis génica, 280
Complejo(s)
multiproteínico RISC, 144
de origen de replicación, 88
sinaptonémicos, 296
cariotipos, 301
cohesinas, 303
componentes, 297
elementos laterales, 297
filamentos transversales, 297
de transcripción, 108
basal y funcional, 110
Condensinas, 291
Condición XYY de los varones, 450
Condrocitos, 198
Condrodisplasias, 381
Conducto(s)
mesonéfricos o de Wolff, 229
paramesonéfricos o de Müller, 229
Confidencialidad, 503, 507
Conservación genética, 20
Consorcio de Ontología Genética, 126
Control de alimentos, 508
Corea de Huntington, 198
edad de aparición, 202
fenómeno de la anticipación, 198
fisiopatología, 206
huntingtina, 198
mecanismo de la dominancia, 203
poliglutamina, 206
variaciones raciales, 202
Cósmidos, 49
Creatinfosfoquinasa, 267
Cremallera de leucinas, 402
CREST, 78
Crestas dérmicas, 322
recuento total, 23
Crick, Francis H.C., 7
Cromátidas, 8
Cromodominio, 141
Cromosoma(s), 2
13, trisomía, 442
18, trisomía, 441
21, trisomía, 435, Véase también *Síndrome de Down*
alteraciones estructurales, 433
artificiales de levadura (CAL), 49
bandeado cromosómico, 423
deleciones, 432
duplicaciones, 432
inactivación del cromosoma X, 278
inversiones, 432
métodos de estudio, 423
número, 1
plumulados, 303
sexuales, 231
alteraciones numéricas, 442
apareamiento parcial, 232
contenido génico, 234
morfología, 231
región pseudoautosómica, 232
sitios frágiles, 457
translocaciones, 153
recíprocas, 435

Cromosoma(s) *(Cont.)*
robertsonianas, 435
X, 231
trisomía, 450
Y, 231
Cromosomopatías, 423
alteraciones estructurales, 433, 433f
anomalías numéricas, 435
clasificación, 432, 432c
Crossing-over, 258, 297
Cuerpo XY, 232

D

Daltonismos, 273
Dedos de zinc, 402
Defectos del cierre del tubo neural, 334
Defectos congénitos del metabolismo, 5
Degeneración, Véase *Redundancia del código (degeneración)*
Degeneración macular, 326
Deleciones, 432
Derecho, 507
Dermatoglifos, 22
Desarrollo de los miembros, 409
Desequilibrios de ligamiento, 265
Desiertos génicos, 123
Desmosomas, 376
Desoxirribosa, 59
Deuteranómalos, 274
Deuteranopes, 274
Diabetes mellitus, 326
factor génico IDDM2, 327
gen de la glucoquinasa, 328
insulinodependiente, 326
MODY, 326
no insulinodependiente, 326
Diacinesis, 296
Diagnóstico citogenético, aplicaciones, 430p
Diandria, 433
DICER, 144
Diginia, 433
Dihidrotestosterona, 242
Diminutos dobles, 88
Dineína, 79, 403
Diploidía, 2
Diploteno, 296
Disección genética, 322
Disfunción del canal de cloro, 214
Disgenesia ovárica, 444
Disomía uniparental, 316
Disostosis cleidocraneana, 218c
Displasia campomélica, 246p
Displasia ectodérmica anhidrótica, 279
Distrofia(s)
de las cinturas escapulares y pelvianas, 270
de Duchenne-Becker, 266
musculares distales, 270
Distrofina, 267
Disyunción, 311
Dominio(s), 124
del canal de cloro, 209
ligadores de nucleótido, 209
ligadores de oncoproteínas, 487
regulador, 209
transmembranosos, 209
Dosaje rápido de ácidos nucleicos, 60
Dosis génica, 34
Dot blots, 55
Duplicación génica, 76
Duplicaciones, 432
DXPas34, 282

E

EcoRI, 40
Ecotoxicología, 506
Efecto pleiotrópico, 29
Electroforesis en agarosa, 45
Elementos laterales, 297
Elementos de respuesta al receptor, 144
Embrión, determinación de los ejes, 403
Empalme alternativo, 113
Encefalopatía mitocondrial, 342
Endonucleasa(s), 62
apurínica, 164
de restricción, 39, 40
Endopeptidasa neutra, 17
Enfermedad(es)
por acumulación, 358
por alteración del ADN mitocondrial, 342
de Alzheimer, 336
de Charcot-Marie-Tooth, 31
de Fabry, 359
fibroquística, 208, Véase también *Fibrosis quística*
de Gaucher, 361
hereditarias, 29
- de herencia autosómica dominante, 190, 198
de herencia autosómica recesiva, 192, 208
de herencia multifactorial, 187, 321
de Huntington, 198, Véase también *Corea de Huntington*

lisosómicas, 358
marcadores, 504
mendelianas o monogénicas, 4, 187
de Niemann-Pick, 359
de origen cromosómico o cromosomopatías, 187
de Pompe, 359
pulmonar obstructiva crónica, 209
de Sandhoff, 360
de Tay-Sachs, 359
de von Recklinghausen, 205
Entrecruzamiento, 258, 297
Entrez, 120
Envejecimiento, 81
celular, 83, 338p
prematuro, 83
hereditario, 171
replicativo, 85
Enzima(s)
ATPasas, 165
dioxigenasa, 5
del ácido homogentísico, 348
EcoRI, 40
fenilalanina-hidroxilasa, 354
G6PD, 272
galactoquinasa, 351
galactosa-1-fosfato, 351
galactosa-uridil-transferasa, 349
hexosaminidasa A, 359
HGO, 348
hipoxantina fosforribosil transferasa, 275
ligasa de ADN, 42
de restricción, 39, 40, 43
de alta y baja frecuencia de corte, 44
mecanismo de acción, 41
propiedades, 43
tipos, 44c
sulfatasa esteroidal, 249, 377
tirosinasa, 215, 216, 349, 368c
uridindifosfogalactosa-4-epimerasa, 352
Epidermis, 216, 375, 375f, 376, 377, 378
Epidermólisis ampollar(es), 191, 373, 380c
atrófica generalizada benigna, 55p
distrófica, 378, 378c
generalizada, atrófica y benigna, 55
simple, 378, 378c
de la unión, 378c
Epilepsia mioclónica y fibras musculares deshilachadas, 342
Epiloia, 218c, 480
Epistasis, 219
Equivalencias del alfabeto griego, 540
Errores congénitos del metabolismo, 347
Esclerodermia, 78
Esclerosis tuberosa, 156c, 218c, 480
Especies reactivas de oxígeno, 478
Estigmas de Turner, 248
Estrictez, 69
Estudios poblacionales, 506
Ética en la investigación en genética, 506
Eugenesia, 499
Eumelaninas, 215, 216
Exones, 104
número, 122
Expansión de repeticiones de trinucleótidos, 200, 201f
Extremos colgantes, 42
Extremos pegajosos, 42

F

Factor VIII, 271
Factor IX, 271
Factor conmutador del sexo (SRY), 227
Factor esteroideogénico 1, 145, 243
Factor(es) de azoospermia, 314
Factor(es) de crecimiento fibroblástico, 414
Factores ambientales, 20
Factores modeladores de transcripición, 109
Factores remodeladores de la cromatina, 138
Fago(s), 46
lambda, 48
Familia Alu, 73
Familia(s) génica(s), 23, 76, 172, 325, 378
de actinas, 76
α, 390
β, 390
de las globinas, 76, 390
de histonas, 76
de queratinas, 395
de ubicuitina, 76
Fases de ligamiento, 264
acoplamiento, 264
repulsión, 264
Favismo, 272
Fenilcetonuria, 354
Fenocopias, 16
en las malformaciones, 18
Fenotipo, 15
de Down, 437
sexual, 223
del síndrome del X frágil, 468
de Turner, 445
Feomelaninas, 215

Fibrosis quística, 208
aplasia del conducto deferente, 212
dominios del canal de cloro, 209
heterogeneidad genética, 213
mecanismo de la recesividad, 213
mutación delta-F-508, 209
patogenia, 212
regulador transmembranoso de la conductancia, 209
terapia génica, 213
Filamentos intermedios, 373
Filamentos transversales, 297
Filiación de personas, 507
FISH, 31, 426, 428p
Flujo de la información genética, 8
Fotorreceptor(es), 274, 415, 419
Fracción de recombinación, 259
Fragmentos de restricción, 40
Franklin, Rosalind, 6
FRAXA, 468
FRAXE, 468
FRAXF, 468

G

Galactosemia, 349
Gamma-H2A-X, 148
Ganancia de función, 204
Gangliosidosis generalizada, 358
Gargolismo, 362
Garrod, Archibald, 4
Gemelos monocigóticos, 20
Gen(es)
de la 21-hidroxilasa, 363
de la 5-α-reductasa, 242
de la α-galactosidasa, 48
de la α-glucosidasa (GBA), 361
del angiotensinógeno, 331
APOE4, 339
Arca de Noé, 174
bases de datos, 122
BetaENaC, 331
blanco, 400
BRCA1, 181, 492
BRCA2, 181
C7orf2, 18
CFTR, 180
COL, 379
del colágeno, 379
del colágeno II, 379p
del colágeno VII, 375f, 378
conceptos, 101
conmutador(es), 400
del sexo, 223
CSA, 169
CSB, 169
CYP21B, 366
definición en las bases de datos, 121
denominación, 122
determinantes del sexo SRY, 119
de la distrofina, 119, 266
DSS, 249
EH, 200
ERCC1, 169
erizo sónico, 403, 410, 411, 415
espectro de mutaciones, 29
para la estatura, 25
expresividad variable, 29
del factor VIII de la coagulación, 271
FAH, 355
FCC, 492
FCF-4, 414
de la fibrilina, 383
FMR-1, 467, 471
franja radical, 411
G6PD, 272
de la GALT, 352
de la glucoquinasa, 328c, 329, 329f, 343p
de la HAM, 240
HD, 200
HEXB, 360
de la hexosaminidasa A (HEXA), 360
HGO, 348
homeóticos, 399
de la hormona antimülleriana, 238
HOX, 404
HOX D13, 414
HPRT, 179c, 266f, 275, 277f
humanos, nomenclatura internacional, 537
de la huntingtina, 202
HYP, 17
de la IDS, 362
del interferón β, 140
interruptores, 400
ligados al sexo, 265
ligamiento, 255
de mantenimiento, 103
MECP2, 142
de la neurofibromina, 206
nomenclatura internacional, 537
número en el genoma humano, 103
ontología, 126
ortólogos, 125
parálogos, 125

PAX, 406
PAX3, 407, 407f, 408, 408f
PCR, 273
PCV, 273
PHEX, 17
para pigmentos retinianos, 273
PMP22, 32
PPA, 339
de la presenilina 1, 338
de la presinilina 2, 338
de la proteína P, 401f
PS1, 338
PS2, 338
de las queratinas, 378
R3FCF, 196, 196f
de receptores, 198
de andrógenos, 241
reguladores, 400
represores de tumores, 478, 492
de la rodopsina, 217
sensible a dosis génica, 249
SHOX, 26, 232
símbolos o abreviaturas, 538
sinténicos, 256
SOX9, 238, 239p, 243, 244, 244f, 246p
SRY, 119, 121f, 179c, 223, 224, 225, 225c, 226f, 227, 230, 231, 234, 235, 235f, 237, 237f, 239p, 240, 241, 244, 245, 246p, 247, 247f, 248, 249p, 250, 400, 445, 504
STS, 236c, 249, 266f
supresores de tumores, 484
de la tirosinasa, 215
TP53, 489
TSC1, 481
TSC2, 481
WNR, 171
XIST, 224, 278
XPA, 169
XPB, 169
XPC, 169
XPD, 169
XPE, 169
XPF, 169
XPG, 169
Gene cards, 122, 536
Genealogías, 190
Genética
cuantitativa, 20
forense, 508
de los tumores, 477
Genitales externos, desarrollo, 230
Genoma humano, 9, 103
Genómica personal, 504
Genómica poblacional y étnica, 506
Genotecas, 57
de ADN complementario, 51
genómicas, 50
lambda, 51
Genotipo, 15
Ginogénesis, 280
Glucoproteína asociada con la distrofina, 268
Gónada indiferenciada, 229
Gónada primitiva, 225
Gonocitos, 227
Gráfico de Cot, 70
Gráfico de reflectancia, 28
Grupo de alta movilidad, 237
Guanina, 59

H

Haploide, 2
Haplotipo, 264
Helicasa(s), 164, 165
RecQ, 171
SW1/SNF, 140
Hélice(s)
antiparalelas, 62
derecha, 61
grado de torsión, 63
modelo de la doble hélice, 6
ranura, 62
de sentido, 62
Hemicigótico, 265
Hemidesmosoma, 375f
Hemofilia, 271
Hemoglobina(s), 387
de la anemia falciforme, 392
Barts, 394
estructura, 388
familias génicas, 390
fetal, persistencia hereditaria, 394
humanas normales, 389
S, 392
Heredabilidad, 21
Herencia, 1, 5, 8, 9
autosómica dominante, 190
autosómica recesiva, 192
de caracteres cuantitativos, 22
correlación entre parientes, 322
intermedia, 189
mendeliana, 188
mitocondrial, 340
multifactorial, 20, 187, 321

Herencia *(Cont.)*
enfermedades, 334
hipótesis, 323
patrones, 187
poligénica, 20
riesgo en familiares, 324
Hermafroditas verdaderos, 248
Heterocigótico, 4
Heterocigoto, 189
Heterogametismo masculino, 230
Heterogeneidad genética, 29
interalélica, 30
intraalélica, 30
Heteromorfismo cromosómico, 231
Heteroplasmia, 340
Hexanucleótido TTAGGG, 81
Hibridación, 69
in situ y fluorescencia (FISH = HISYF), 31, 426
in situ, aplicaciones, 427p
pasos, 70
HindIII, 41
Hipercolesterolemia familiar, 387
Hipercromicidad, 60
Hiperplasia suprarrenal congénita, 250
Hiperqueratosis epidermolítica, 378c
Hipertensión esencial, 330
Hipótesis de Lyon, 279
Histonas, 137
código, 140
estructura espacial de H2A, 148
metilación, 140
HISYF, 31, 426, 427p
HMTasas, 140
Holliday, Robin, 306
Holoenzima, 110
Holoprosencefalia, 414
Homeobox, 404
Homeocaja, 404
Homeodominios, 402
Homocigótico, 2
Homocigoto, 189
Hormona(s)
antimülleriana, 229, 238
Huntingtina, 198
HUPO; 127, Véase también *Organización Proteoma Humano*

I

Ictiosis ampollar de Siemens, 378
Ictiosis ligada al X, 236c, 266f
Identificación de personas, 9
Idiocia amaurótica, 358
Impronta(s), 50
génica, 224, 280, 314
de Northern, 53
puntuales, 55
de Southern, 53
Western, 53
Inestabilidad cromosómica, 180
Inestabilidad de las secuencias de microsatélites, 167
Infertilidad genética humana, 315p
Infertilidad humana masculina, 314
Información genética, 91
código genético, 94
concepto general, 93
contenido informativo, 93
Inserto, 46
Insuficiencia funcional del producto haploide, 208
Integrinas
α6β4
β1, 376
Intensificadores, 104
Interacción alélica, 219
Intercambio entre cromátidas hermanas, 256
Internet, 535
Intrones, 104
Inversiones, 432
paracéntricas, 435
pericéntricas, 435
Islas CpG, 103
Isocromosoma(s), 432
Xp, 444

K

Kinesina, 79

L

Labio leporino, 335
Laminina, 270
Lapso de vida celular, 85
Lazo(s)
D, 64, 341
deslizantes, 67
de fibras de cromatina, 76
R, 64
t, 86
Leptina, 419
Leptoteno, 296

Ligamiento, 255
desequilibrios, 265
fases, 264
grado, 256
grupos, 260
lods, 264
mapa, 259
marcadores, 260
Límite de Hayflick, 85p
Línea de Sydney, 25
Lionización, 279
Locus, 102, 263
Lods, 264
Longitud total del mapa de ligamiento, 259
Lyon Mary F., 278

M

Macro H2A1, 148, 282
Malformaciónes congénitas, como enfermedades multifactoriales, 334
Manchas café con leche, 205
Mapa(s)
de desnaturalización, 64
físicos, 106
de fragmentos superponibles o contiguos, 106
de genes, 5
de ligamiento, 5
sitios de restricción, 106
sitios rotulados, 106
visor, 120
Marcador(es), 53, 104, 109, 124, 134, 171, 232, 260, 262f
de cáncer, 479
de enfermedades, 504
moleculares, 262, 263, 264, 285
Marco de lectura, 97
abierto, 121
determinación, 98
triplete de iniciación, 98
Meiosis, 289
complejos sinaptonémicos, 297
fases, 296
femenina, 289
masculina y reordenamientos, 464
no disyunción, 312
proteínas especiales del par XY, 299
quiasmas, 301
recombinación meiótica, 304
segregación de homólogos, 311
testicular, 290
Melanina, 215
Melanocitos, 215
Melanosomas, 215, 216
Mellizos, 20
Mendel, Juan Gregorio, 1
Metáfisis, 446p
Método de los didesoxinucleótidos (ddNTP), 106
Método de Maxam y Gilbert, 106
Método de Sanger, 106
Microarreglo(s), 129, 129f, 130, 131, 131f, 459, 479
de ADN, 129
de ADNc, 131, 146
de oligonucleótidos sintéticos, 131
de proteínas, 132
tipos, 131
Microdeleciones, 187, 188, 434, 458, 459, 460, 462f, 464
Miescher, Friedrich, 59
Minisatélites, 261
Miosina, 298
Modificaciones epigenéticas, 137
Mola hidatidiforme, 316
Monosomía, 432
Morgan, Thomas H., 5
Mosaicismo, 433
Motivo(s), 18p, 73
cremallera de leucinas, 402
dedos de zinc, 402
hélice-vuelta-hélice, 402
Mujeres XY, 245
Mundo del ARN, 93
Mutación(es), 153
ADN polimerasa, 160
agentes mutagénicos, 175
de cambio de encuadre, 155
de cambio de sentido, 155
cromosómicas, 153
dirigida por ingeniería genética, 178
de elementos de control, 155
espectro(s), 179
mutacional, 180
espontáneas, 156
de expansión de repetición de tripletes, 155
por expansión de tripletes repetidos, 155
de extensión variable, 155
hereditarias, comunicación de riesgos, 504
humana, nomenclatura, 549
inducción, 175
inducidas, 156
mecanismos, 159

Mutación(es) *(Cont.)*
nomenclatura, 539
puntuales, 153
replicación del ADN, 160
silenciosas, 155
somáticas, 155
tasas, 156
medición molecular, 159
métodos para la determinación, 158
tipos, 153

N

Negentropía, 94
Neurofibromatosis, 205
Neurofibromina, 206
Neuropatía óptica hereditaria de Leber, 342
No disyunción, 312
Nocardia otitidis, 41
Nódulos pigmentados (de Lisch), 205
Nódulos de recombinación tardíos, 301, 310, 311
Nomenclatura internacional de los genes humanos, 537
Nomenclatura, reglas, 537
Noqueado génico, 143
NotI, 41
Nucleosoma, 138
Nucleótidos, 59
Número de cromosomas, 3, 289
alteraciones, 432
humanos, 423
sexuales, 23
X, 235, 447, 450, 451
Número de enlace, 66
Número de exones, 122
Número de genes en el genoma humano, 103

O

Obesidad, 326
en la diabetes tipo 2, 329
en el síndrome de Bardet-Biedl, 217
en el síndrome de Prader-Willi, 316, 316c
Ocronosis, 348
OMIM, 122, 535
Oncogén(es), 403, 480
celular, 481
viral, 481
Opsinas, 274
Organismos "modelo" 117
Organización para el Genoma Humano, 122
Organización Proteoma Humano, 127
Osteoblastos, 17p
Osteogénesis imperfecta, 29, 380c, 381
Osteosarcoma, 485
Ovillo(s) neurofibrilar(es), 336, 337, 338p, 339, 440
Ovocitos deslionizados, 281

P

Paladar hendido, 335
Paludismo, 272
Paquioniquia congénita, 378, 378c
Paquiteno, 296
Penetrancia, 29, 190
Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal, 394
Pesquisa y pruebas genéticas, 503c
Piebaldismo, 406
Piel, color, 19, 26, 27, 27f
genes, 28f
Piel, pigmentación anormal, 88p, 215
Pigmentos retinianos, 274
Pintado cromosómico, 426, 427p, 428p, 429p
Pirimidinas, 59
Placas neuríticas, 336
Plásmido(s), 46
artificial, 48
comerciales, 47
de expresión, 51
Pleiotropía, 29, 382
PLFR, 261
Pliegue histónico, 148
Polaridad de cada cadena de ADN, 60
Polianión, 60
Poliglutamina, 198
Polimorfismos de longitudes de fragmentos de restricción, 262
Polimorfismos de un solo nucleótido, 123
Polinucleótido, 59
Poliploidía, 432
Poliquistosis renales, 418
Poslionización, 280
Prelionización, 280
Premutación, 471
PRINS, 430
Privacidad, 503, 507
Procesos epigenéticos, 147
Producto SRY, 227, 239p, 243
Programa ELSI, 118
Promotor, 102

cerebral, 268
muscular, 268
Propósito, 190
Protanómalos, 274
Protanopes, 274
Proteína(s), 9, 10, 11
activadoras de la GTPasa, 206
BRCA1, 180
BRCA2, 180
BRG1, 140
centroméricas, 78
colágenos, 373
Corl 1, 298
distrofina, 267
DMC1, 306
GLI, 413
hMSH2, 165
interruptora del ciclo celular, 489
ligadora de ADN, 401
ligadora de TATA, 110, 239
ligante de metilcitosinas, 151
MAP, 337
de membrana parcheado, 413
morfogenéticas del hueso, 413
p21, 490
p53, 484, 488, 489, 489f, 490, 491f
PAG, 206
PMP22, 33
PPA, 336
pRB, 484
precursora de amiloide, 336
R1FCF, 198, 411
R2FCF, 411
R3FCF, 196, 196f, 197, 198
Rad51, 310
Ras, 207
REC8, 303
RecA, 306
reguladora SRY, 121f
del retinoblastoma, 484
SCP1, 304
SCP3, 305f
SMC, 291
SOX9, 240p
Spo11, 306
SRY, 237f, 238, 238f, 239p, 240
Syn1, 298
tau, 337
TRF2, 86p
Xmr, 300
XY40, 300
Proteoma humano, 11, 126, 127
Protooncogenes, 481
Proyecto Genoma Humano, 1, 9, 105
Prueba(s)
de Ames, 178
diagnósticas de ADN, 11
Pseudogenes, 74
PUBMED, 536
Purinas, 59

Q

Queratina(s), 373
función normal, 376
mutaciones, 378
Q1, 275f, 378c
Q10, 275f, 376, 378c
Q16, 378c
Q17, 378c
tricocíticas, 376
Queratinocito(s), 128, 130, 216, 375, 376, 378, 478
Queratodermia palmoplantar con queratólisis, 378
Quiasma, 257, 301
Quinasa(s), 127, 169
ATM, 149, 180
de ciclinas, 490
proteinquinasa, 196
de tirosinas, 197

R

Raquitismo clásico, 16
Raquitismo hipofosfatémico, 16
Rasgo(s)
de células falciformes, 394
complejos, 20
discontinuos o cualitativos, 20
concordancia, 21
discordancia, 21
métricos, 20
monogénicos, 19
RCP, 53
Reacción en cadena de las polimerasas, 53
aplicación, 430
Receptor(es)
de activadores de proliferación de peroxisomas, 330
de andrógenos, 146
de lipoproteínas de baja densidad, 383
nucleares, 144
clasificación, 145

Recombinación, 5
meiótica, 256, 304
modelo molecular, 307
nódulos de recombinación tardíos, 310
papel de las recombinasas, 309
Recombinasas, 307, 309
Redundancia del código (degeneración), 99
Reflectancia, gráfico, 28
Región controladora de locus, 392
Región(es) seudoautosómica(s), 26, 26f, 232, 233p, 234f, 235f, 237, 245, 247f, 265, 266f, 283, 283p, 312, 363, 443, 444, 447, 449, 451
Regiones de tinción homogénea, 88
Reglas del balanceo, 99
Reglas de nomenclatura para las mutaciones humanas, 538
Regulación acoplada a la transcripción, 169
Renaturalización, 69
Reordenamientos complejos, 465
Reordenamientos y meiosis masculina, 464
Reparación del ADN, 161
por escisión de bases (REBA), 162, 164
por escisión nucleotídica (REN), 163, 167
de mal apareamiento de bases (REMA), 162, 164
de rupturas de doble cadena, 163
Repeticiones de dinucleótidos, 261
Repeticiones en tándem de número variable, 261
Replicones, 83
Reproducción sexual, 289
Resolvasas, 309
Restricción
enzimas, 40
mapas, 44
sitios, 44
Retinitis pigmentaria(s), 30, 213, 217, 415, 419
Retinoblastoma, 483, 484, 486
Retroposones, 73
RFLP, 261
RTNV, 261
Rupturas del ADNdc, 180
RuvA, 309
RuvB, 309
RuvC, 309

S

Salteamiento de exones, 114
Salud pública y genética humana, 505
Screening, Véase *Pesquisa y pruebas genéticas*
Secuencia(s)
(GT)n, 263
de acuerdo con el grado de repetición, 71
de alta repetición, 71
anterior no traducida (SANT), 104
en borrador, 10
clasificación, 71
codificantes, 72
conservadas de ADN, 172
según su función, 71
invasoras, 73
de moderada repetición, 71
no codificantes, 72
palindrómicas, 41
polimórfica, 263
posterior no traducida (SPNT), 104
repetidas cortas y dispersas (SINEs), 73
repetidas largas y dispersas (LINEs), 74
de replicación autónoma, 83
de respuesta al ácido retinoico, 404
de respuesta al retinoide X, 404
de Shine-Delgarno, 98
únicas, 71
Segregación, 3
en la anafase meiótica, 465f
de homólogos, 311
Segunda ley de Mendel, 256
Señales de terminación, 98
Senilidad celular, 83
SET, 142
Seudohermafroditismos, 250, 363
Sexo
alteraciones genéticas de la determinación, 245
criterios de asignación, 224
gen conmutador, 223
gonadal, 224
psicológico, 224
Silenciadores, 104
Silenciamiento génico, 138
Símbolos o abreviaturas de los genes humanos, 538
Simpolidactilia, 414
Sinapsis cromosómica, 258
Síndrome
adrenogenital, 365
de Angelman, 12c, 147, 316
de ataxia-telangiectasia, 12c
de Bardet-Biedl, 418
de Bloom, 171
de Bonnevie-Ulrich, 444
cariotipos, 444

de Cockayne, 111, 165, 169
de Down, 24, 435
fenotipo, 438
patogenia, 441
por translocación, 435
de Edwards, 441
de Ehler-Danlos, 379
de femenización testicular, 242
de genes contiguos, 461
heterogeneidad mutacional, 277
de Hunter, 278
de inestabilidad de los cromosomas, 182
de insensibilidad completa a los andrógenos, 146
de Kartagener, 416
de Kearns-Sayre, 342
de Klinefelter, 446
de Lesch-Nyhan, 275
de Li-Fraumeni, 489
de Liddle, 330
de Marfan, 383
del maullido de gato, 458
de Patau, 442
de Prader-Willi, 12c, 147, 316
de Rett, 140
de Swyer, 248
del testículo feminizante, 146
de Turner, 442, 444
de Usher, 217
de Waardenburg, 406, 406f
WAGR, 408
de Werner, 171
del X frágil, 469, 472
efectos en el gen FMR-1, 471
expansión de tripletes CGG, 469
fenotipo, 469
FMR-1, 472
transmisión de la premutación, 471
Sintrofinas, 270
Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana, 430
Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana, 430
Sitio(s)
aconsejados en la red para genética médica, 535
alternativos o crípticos, 112
de clonación múltiple, 47
frágiles, 469
de restricción, 44
rotulados por secuencias conocidas, 108
Sondas de ADN, 52, 426
Sordera sindrómica hereditaria, 406
Subprograma ELSI, 13
Suicidio proteínico, 381
Sulfatasa de esteroides, 122
Superenrollamiento, 66
Sustancias intercalantes, 63
SWISS-PROT, 536

T

T-cadherinas, 334
Talasemias, 394
Talidomida, 18
Técnica FISH, 428p
Técnica SISP, 430
Técnicas de ADN recombinante, 39
Técnicas de replicación, corte y repegado de ADN, 39
Tejido adiposo, 242
Telomerasa, 83
Telómeros, 49, 72, 77, 83
Temperatura, 44
de fusión, 68
de separación de cadenas, 69
Teoría cromosómica de la herencia, 5
Teoría neutralista de la evolución, 171
Terminación, señales, 98
Termocicladores, 53
Tesaurosis, 358
Testículo, gen determinante, 234
Testosterona, 241
THE-1, 73
Timina, 59
Tirosinasa IA, 215
Titina, 123
Topoisomerasa, 306
Traducción, 91
Transcripción, 91
Transcriptasa inversa, 55, 92
Transcripto(s), 123, 158, 200, 205
de antisentido, 282
primario, 30
Transfección, 85
Translocación(es), 435
balanceada, 437
cromosómicas, 462
estado balanceado y no balanceado, 463
recíprocas, 435
robertsonianas, 435
Transposones, 73
Trirradio, 23

Trisomía, 432
  13, 442
  18, 441
  21, 435
Trozador, 144
TSIX, 282
Tumores, 12, 83, 84p, 167p
  benignos, 480
  BRCA1, 492
  estudios, 480
  FCC, 492
  genes mutantes, 483p
  genes supresores de tumores, 482p, 484
  genética, 477
  hereditarios, 480, 492p, 493c
  inestabilidad de microsatélites, 162
  malignos, 478, 481
  múltiples, 486
  mutación del gen *TP53*, 489
  oncogenes, 481
  origen o causas, 478
  propiedades, 480
  protooncogenes, 481
  SSH, 490
  susceptibilidades, 504
Turner
  estigmas, 248
  fenotipo, 445

U

Unidades Gli-X-Y, 381
Unión de Hoogsteen, 68
Uniones de hidrógeno, 60
Utrofina, 269

V

Varianza, 21
  ambiental, 20
  partición, 21
Varones XX, 245
Vectores, 46
  de expresión, 47

W

Watson, James D., 7

X

X (cromosoma), 231
X frágil, transmisión, 471, Véase también
    Síndrome, del X frágil
Xeroderma pigmentoso, 168

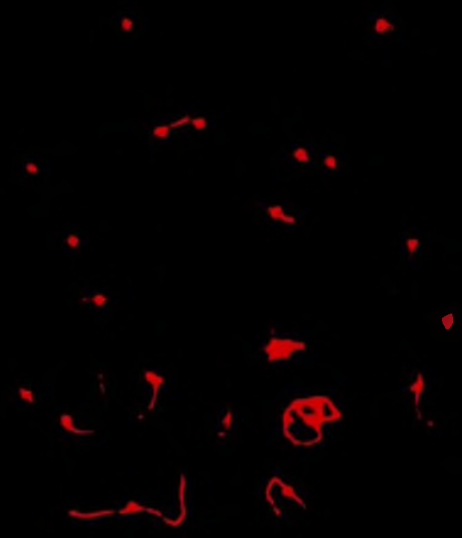
Y

Y (cromosoma), 231

Z

Zona de actividad polarizante, 411

Solari



Genética Humana

Fundamentos y aplicaciones en Medicina

4ª EDICIÓN

Con el pasar de los años, la importancia de conocer el genoma humano se ha vuelto incuestionable, tanto en la carrera de Medicina como en la práctica médica. Todas las especialidades de la medicina son hoy deudoras de los conocimientos de la Genética, y la enseñanza de las materias básicas está cada día más fundamentada en conceptos de esta disciplina.

Esta nueva edición de *Genética Humana* da cuenta de los cambios producidos desde su última publicación y abarca los adelantos en las técnicas moleculares, la nueva apreciación de los ARN no codificantes, los estudios de asociación de enfermedades con marcadores y los desarrollos en la comprensión de la patogenia de muchas afecciones.

Entre sus características sobresalientes se destacan:

- Una revisión y actualización de los contenidos junto con la inclusión de los últimos avances en estudios genéticos.
- Nuevos capítulos sobre "Genética del desarrollo embrionario y ciliopatías" "Aberraciones cromosómicas estructurales y síndrome del X frágil" y "Aspectos éticos, sociales y legales en genética humana"
- Paneles con datos importantes que complementan la información de los capítulos.
- Un glosario con los términos esenciales y apéndices con advertencias para adquirir información adicional a través de Internet, la nomenclatura internacional de los genes humanos, y las reglas de nomenclatura para las mutaciones y la citogenética humanas.

Con quince años de trayectoria en el mercado, esta cuarta edición constituye un texto ágil y práctico que brindará al estudiante y al profesional los conceptos básicos fundamentales de la Genética Humana actual.

ISBN: 978- 950-06-0269-3

9 789500 602693

EDITORIAL MEDICA panamericana