

A.J. Solari

# Genética Humana

Fundamentos  
y aplicaciones  
en medicina

2ª edición



EDITORIAL MEDICA  
**panamericana**



# Capítulo

# 1

## INTRODUCCIÓN

***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.<sup>1</sup> 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 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 exis-

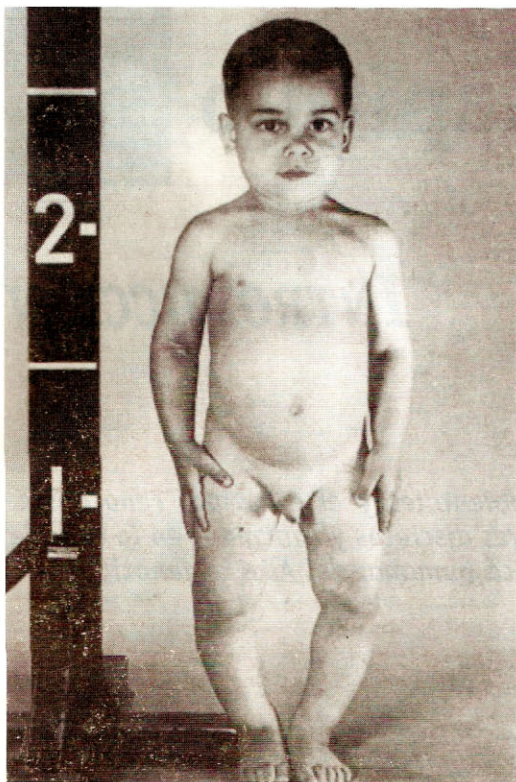
te, en cada organismo, un plan de desarrollo, que es heredable y que se concreta en la medida y forma en que el ambiente lo permite. Estas distinciones, entre los cambios del entorno y el plan heredable del desarrollo, con el aspecto final del organismo, fueron enunciadas por el genetista Johannsen (1911) 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"). 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





**Fig. 1-1.** Niño afectado por raquitismo hipofosfatémico (mutación del gen *HYP* = *PEX*, 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, J. J. Fraser, F. C. y col. *Medical Genetics, Principles and Practice*, Philadelphia: Lea & Febiger, 4<sup>ta</sup> ed., 1993.)

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, muy frecuente en los niños pequeños hace varias décadas pero 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  $\text{Ca}^{++}$  y de fosfato debe pasar un umbral determinado para que se produzca el depósito normal de fosfato cálcico (como hidroxapatita) 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. 1-1).

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 *PEX* (véase panel 1-1), y se lo ha localizado en el brazo corto del cromosoma X, en Xp22 (véase cap. 7).<sup>4</sup>

En el raquitismo hipofosfatémico, el origen de la enfermedad estriba en la insuficiencia de las células de los túbulos renales en reabsorber el ion 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. 8, 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



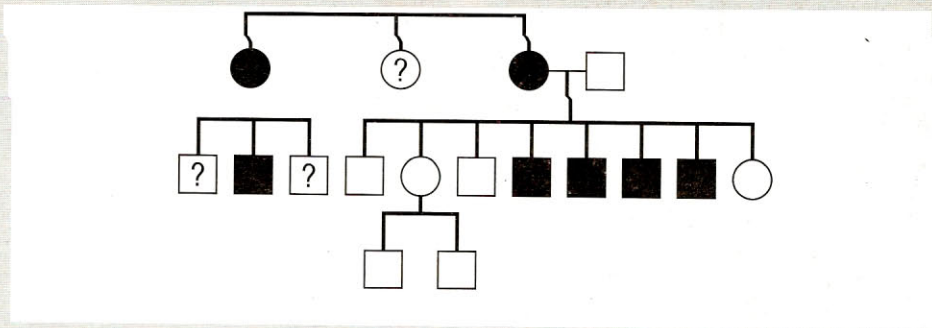


Fig. 1. Genealogía de varios pacientes con raquitismo hipofosfatémico. La mutación es dominante.<sup>3</sup>

**Panel 1-1. Gen PEX (HYP). Responsable del raquitismo hipofosfatémico.** No siempre el avance de la Genética Molecular es lineal. El gen humano responsable de la hipofosfatemia (HYP), durante el proceso de su estudio, mostró imprevistamente que contiene la codificación de una proteína de tipo endopeptidasa neutra.<sup>2</sup> Esta proteína es una metaloproteasa porque se une a átomos de zinc. Por lo tanto, se le dio el nombre de PEX (de Phosphate, Endopeptidase, cromosoma X) o FEX; en castellano. El gen FEX = PEX 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. Su función no es bien conocida, aunque se supone que cataliza la conversión de una proteína transportadora de fosfato y de sodio. Se han encontrado mutaciones puntuales de este gen en pacientes con hipofosfatemia (fig. 1).<sup>3</sup>

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 que no sólo las causas ambientales pueden simular el efecto de una mutación, sino que para un fenotipo 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.

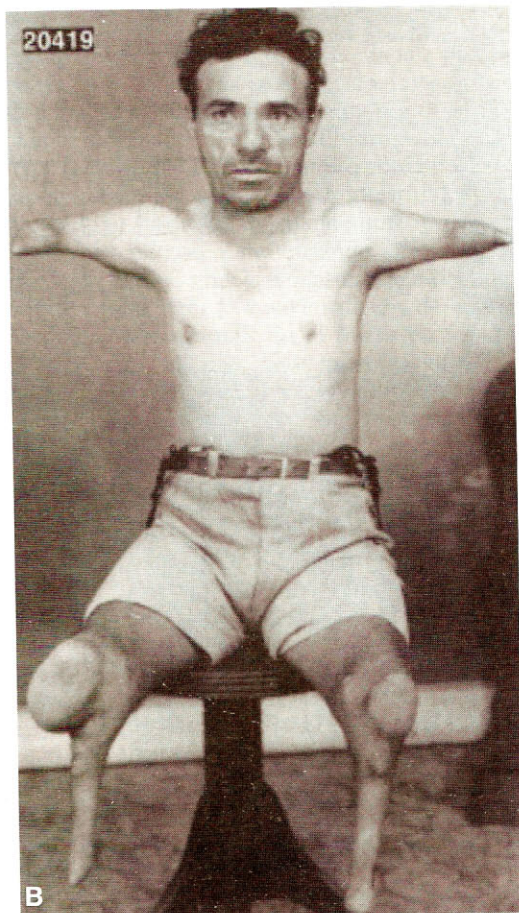
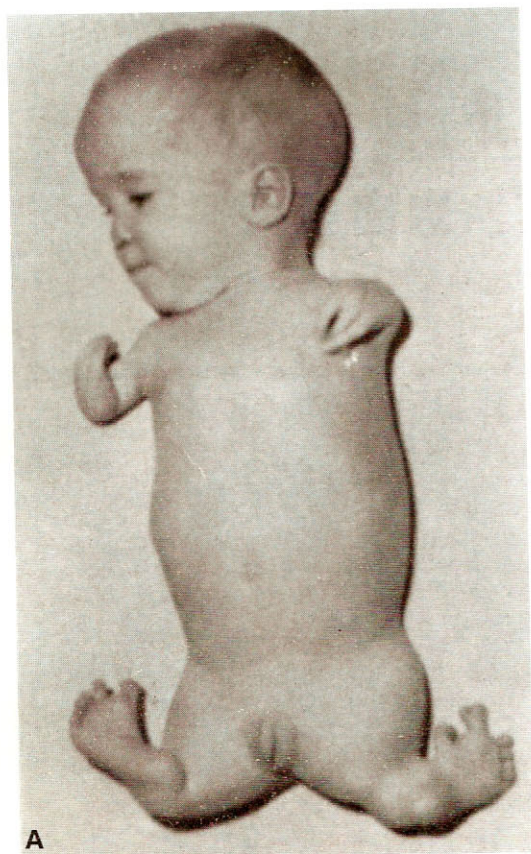
#### Fenocopias en malformaciones: efecto de la talidomida y amelias genéticas

Entre 1958 y 1963, en varios países europeos, y en Canadá y Australia, ocurrió una epidemia de malformaciones graves en recién na-

cidos 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. 1-2 A), 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 aquipodia, detectada y estudiada en Brasil (fig. 1-2 B). La aquipodia 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 (véase cap. 6). 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





**Fig. 1-2. A.** Paciente afectado por el efecto de la talidomida durante la gestación. **B.** Paciente afectado por la mutación determinante de la aquipopodia. (**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).<sup>5</sup>

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. 13), y en otros casos puede ser el resultado de la administración de estreptomycin en dosis altas durante la gestación o formar parte de las altera-

ciones 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 res-



ponsable 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. 3). 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 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 resulta 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 con 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"<sup>6</sup> 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. 8). Este estudio se realiza actualmente mediante la búsqueda de los genes causantes de enfermedades homólogas en animales.<sup>6</sup> Este último enfoque se basa en la mayor facilidad para lograr ubicar genes en animales cuyas cruza 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. 2 y 3), 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. 2).

### 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 ex-



presa 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. 8), 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 cuantitativos 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. 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 conveniente 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 dicigóticos). La varianza (medida estadística) es  $V = \sum d^2/N$ , donde  $N$  es el número de pares 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 varianza genética (considerada  $1/2$  respecto de la población general, ya que comparten el 50% de sus genes). Si se resta la varianza de monocigóticos de la de fraternos, se obtiene:

$$V_f - V_m = 1/2 V_g$$

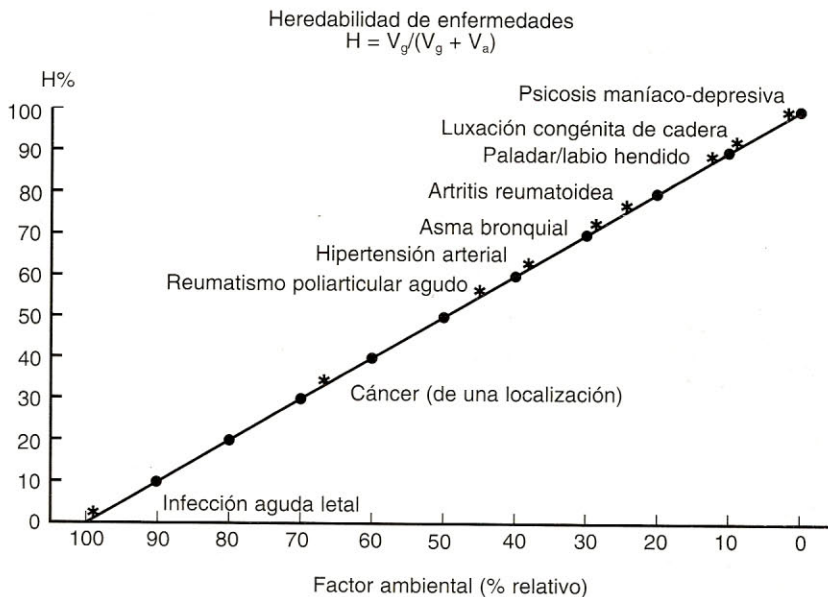
de donde se mide la varianza genética; y si se la compara con la total, se obtiene una medición de "heredabilidad" ( $H$ ) del rasgo:

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

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 baja) 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.<sup>7,8</sup> 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 poligénica o multifactorial ha sido estudiada en gemelos. Para ser relevantes, los datos deben ser corregidos respecto del método de diagnóstico o clasificación de la enfermedad usado en cada caso y, además, se deben cumplir otros requisitos.<sup>7</sup>

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 y el paladar hendido (fig. 1-3).

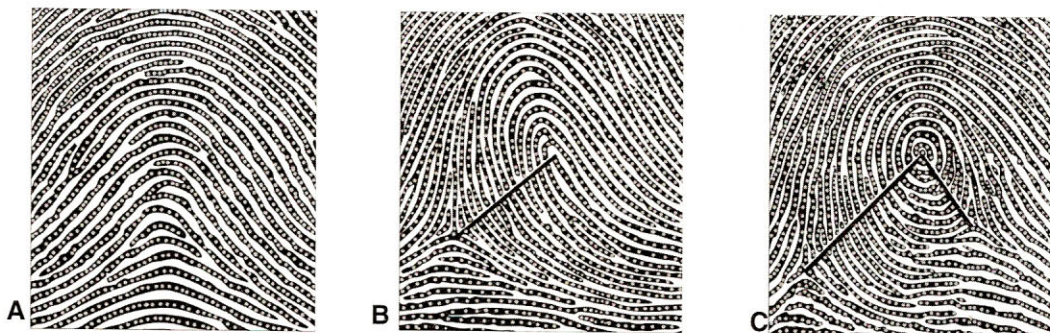


**Fig. 1-3.** Escala de la "heredabilidad" (definida en el texto) de algunas enfermedades. (Datos de Cavalli-Sforza y Bodmer.)<sup>9</sup>

### Herencia de caracteres cuantitativos. Dermatoglifos

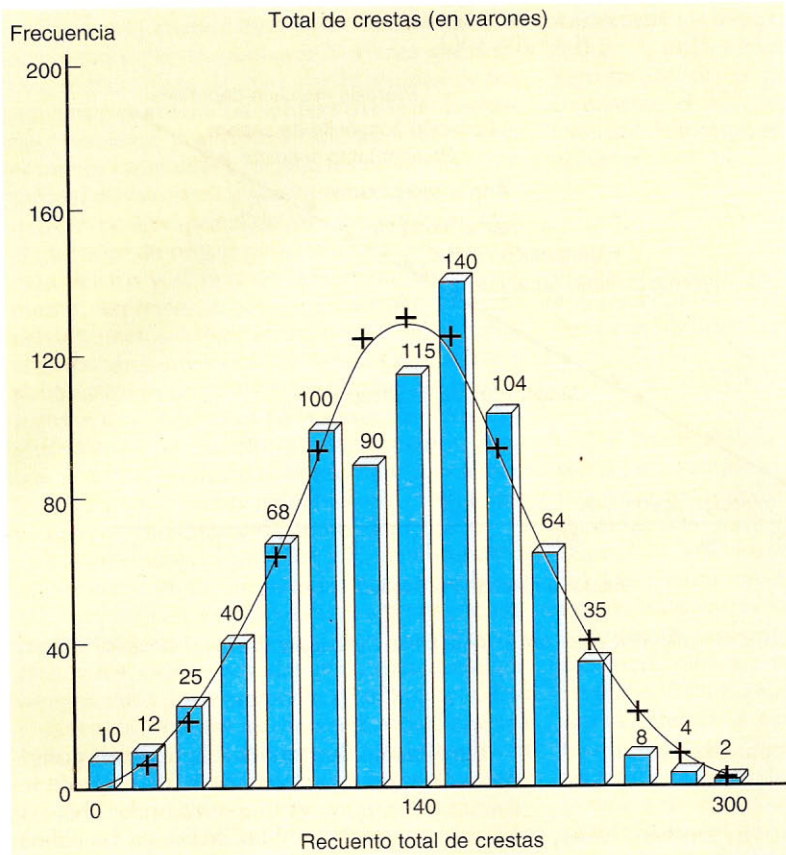
Los caracteres cuantitativos son heredables, de la misma manera que los discretos, puesto que unos y otros están codificados en el ADN del núcleo celular. Sin embargo, la herencia de los caracteres cuantitativos no aparenta regirse por las leyes de Mendel, simplemente porque estas leyes se refieren exclusivamente 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. 1-4). Las crestas



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





**Fig. 1-5.** Distribución casi gaussiana del recuento total de crestas en varones. La curva normal (Gauss) está en punteado. Este tipo de distribución es típico para los caracteres de herencia cuantitativa (datos de S. B. Holt).<sup>10</sup>

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 durante la época embrionaria, es decir, durante la formación de las crestas.<sup>10</sup>

### 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 trirrادیos. Se denomina "trirrادیo" a una bifurcación en forma de horqueta de una cresta; cada trirrادیo separa

tres regiones de crestas y su posición es relativamente constante. Los arcos no tienen trirrادیo, las presillas tienen uno y los verticilos habitualmente tienen dos. La línea extendida entre un trirrادیo 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.<sup>10</sup>

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 su 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. 1-5).

La herencia del recuento total de crestas es típica: de padres a hijos, se transmite una simi-



laridad 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.<sup>10</sup> El coeficiente de correlación entre gemelos monocigóticos es 0,95 y el de dicigóticos coincide con el de hermanos (0,49).

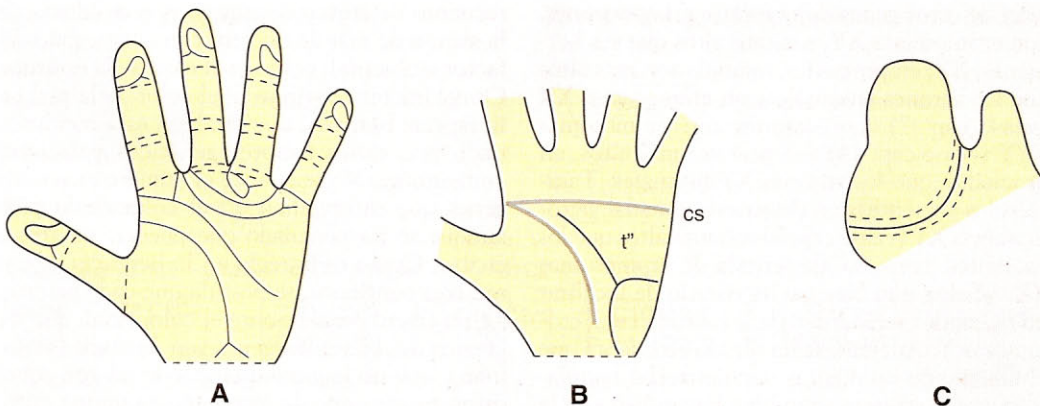
El RTC está alterado en un número de cromosomopatías (véase cap. 14); en especial, es notable su alteración en las polisomías sexuales, en las que, a medida que el número de cromosomas sexuales aumenta, el RTC disminuye, con una tasa de aproximadamente 30 crestas menos por cada cromosoma X o Y excedente.<sup>11</sup>

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. Un posible codificador puede ser una de las familias de genes HOX, que intervienen en el desarrollo de los miembros (véase cap. 13). Estos genes, para determinar 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.

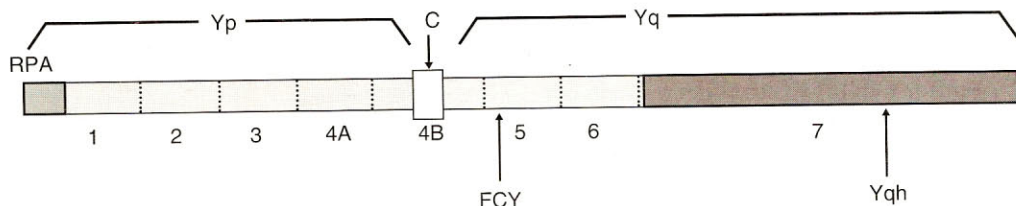
## Alteraciones de los patrones de dibujo en los dermatoglifos

Además del recuento total de crestas, los dibujos de los dermatoglifos tienen valor accesorio para el diagnóstico de cromosomopatías, en especial el síndrome de Down (véase cap. 14), 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 caracteres cualitativos (ausencia o presencia, localización después de un límite) o también en forma numérica, asignando un valor diagnóstico a cada ítem.<sup>12,13</sup> 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. 14).

Los dibujos palmares y plantares son indicadores 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. 1-6) 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 frecuente que los dos transversales estén reemplazados por uno solo, llamado



**Fig. 1-6.** 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.



**Fig. 1-7.** 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), uno de los genes responsables de la estatura. Otro gen importante para el desarrollo de la estatura, el gen *SHOX*, se localiza en la región pseudoautosómica (RPA). Las características del brazo corto (Yp) y del largo (Yq) se explican en el Cap. 7.

“pliegue simiano”, aunque 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 plantas, 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, respecto del normal, es casi 150).

### Otros caracteres cuantitativos.

#### Gen para la estatura en el cromosoma Y

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. Sin embargo, numerosas observaciones apoyan la hipótesis de la localización de un gen para la estatura en el cromosoma Y, que agregaría un efecto significativo a la acción de otros genes de la estatura. Los varones, con cromosomas XY, son más altos que sus hermanas, XX; en promedio, también son más altos que los varones anormales con cromosomas XX (véase cap. 7). Los varones con cromosomas XYY (véase cap. 14) son a su vez más altos, en promedio, que los varones XY normales. También los pacientes con disgenesia gonadal y cromosomas XY (véase cap. 7) son más altos que los pacientes con esa disgenesia y cromosomas XX.<sup>14</sup> Sobre esta base, se ha tratado de localizar un factor de crecimiento de la estatura en el cromosoma Y. Además, se ha tenido en cuenta que el tamaño de los dientes tiene estrecha correlación con la estatura y también hay indicios de la presencia de un gen para el desarrollo dental en este cromosoma Y. Recientemente, se ha localizado esta función en la región proximal del bra-

zo largo del cromosoma Y.<sup>15</sup> En este estudio se observaron 15 pacientes con diferentes (en general) pérdidas de sustancia (deleciones) del cromosoma Y y el lugar de las rupturas y la presencia de “marcadores” o hitos se determinó mediante una técnica molecular (RCP, véase cap. 2). El cromosoma puede subdividirse en segmentos, de los cuales los 1 a 4A corresponden al brazo corto, 4B al centrómero y los siguientes (5 a 7) corresponden al brazo largo (fig. 1-7).

Las pérdidas de sustancia del Y correlacionadas con disminución de estatura son las que incluyen un segmento cercano al centrómero, en los subintervalos 5A-5E. Este gen entonces estaría localizado en la región Yq11.21.<sup>15</sup> Resulta demostrativo que los ensayos de localización se hagan por este método; los estudios de ligamiento (véase cap. 8) son poco útiles cuando se estudia un carácter cuantitativo.

### Generación de caracteres continuos a través de la 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. No se conoce el número exacto de genes que intervienen en el color de la piel, aunque se ha postulado que pueden ser tres o cuatro. 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 cruas (casamientos)



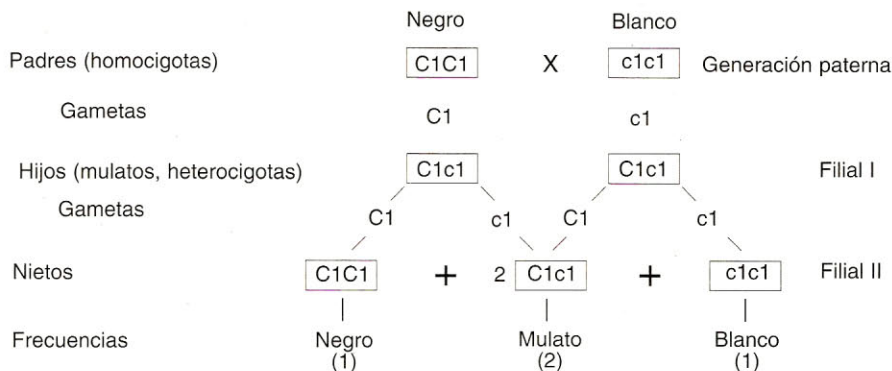


Fig. 1-8. Esquema de herencia basado en un solo gen de color de la piel.

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 1-8.

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 1-9.

Cómo 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 distribu-

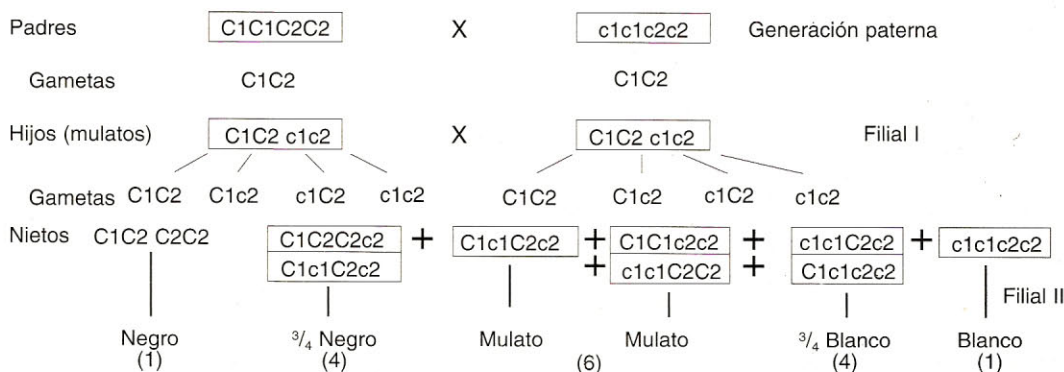


Fig. 1-9. Esquema de herencia basado en dos genes de color de la piel.

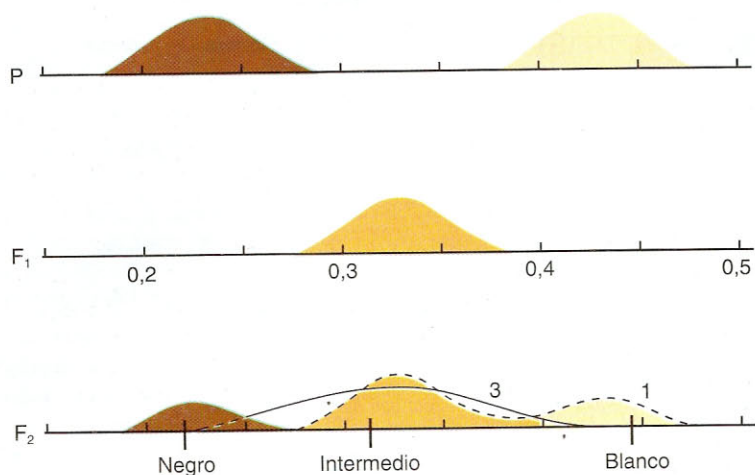


Fig. 1-10. Gráfica de la reflectancia (una medida del color de la piel) en la descendencia a partir de progenitores (P) puros para genes del color de la piel negro y blanco, considerando los esquemas de 1 o 3 genes aditivos para el color de la piel y un efecto ambiental que tiende a borrar diferencias entre clases. F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, primera y segunda generaciones filiales. (Modificado, de W. F. Bodmer y L. L. Cavalli-Sforza, *Genetics, Evolution and Man*, San Francisco, W. H. Freeman, 1976.)

ción parecida a la curva de Gauss (véase antes), que es característica de los rasgos continuos (fig. 1-10). Si a esto se le agrega la variación introducida por el ambiente, se suavizan aun más las diferencias entre clases, y se tiende a una distribución continua.

Como se mencionó antes, la localización de genes de caracteres continuos no es sencilla, y su estimación por métodos estadísticos puede ser ambigua.<sup>16</sup>

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.

### 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 son segmentos de ADN que codifican una proteína (véanse caps. 3 y 4), 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. 6). 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. 4). 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. 12) 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*", 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. 5).

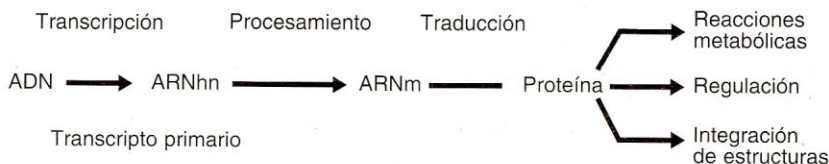
Otro tipo de heterogeneidad es *interalélica*, es decir que varios genes diferentes pueden originar la enfermedad; un caso típico es el de las retinitis pigmentarias, que pueden originarse en alrededor de media docena de genes diferentes (véase cap. 6).

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.

### El enfoque molecular 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, 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. 4). 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 templatado 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. 1-11).

Hasta aquí, la secuencia es muchas veces lineal, es decir que a segmentos del ADN le co-



**Fig. 1-11.** 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.



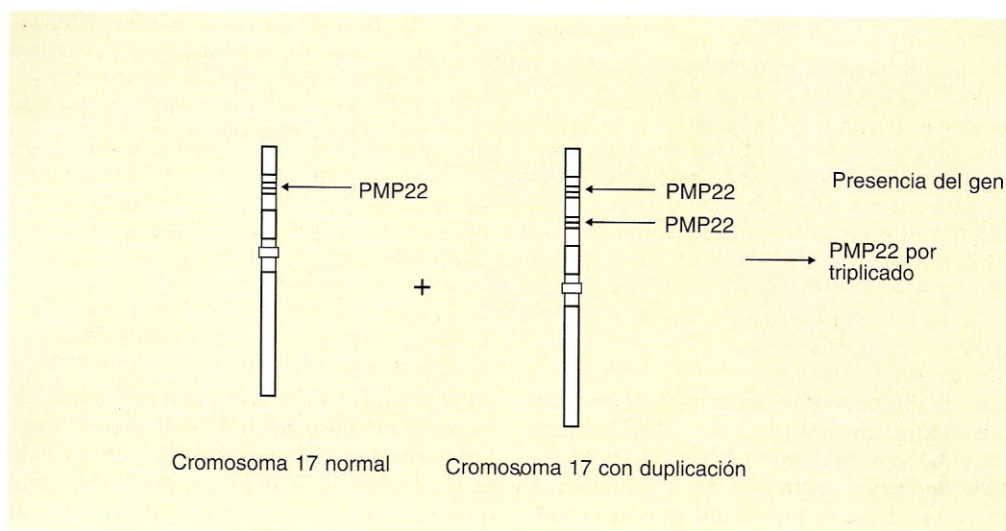
responden secuencias de aminoácidos de una proteína codificada. De aquí en adelante, el flujo de la información es menos lineal; la proteína puede intervenir en diferentes reacciones metabólicas, puede integrar la estructura de algún organoide o puede ingresar en el núcleo para actuar como *regulador* en la decodificación 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 diversificación 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 esta secuencia: 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 transcritos 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

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) o atrofia muscular peronea es una enfermedad hereditaria relativamente frecuente (1 en 2.500 nacimientos). Su forma clínica más común corresponde a una mutación autosómica dominante y consiste en una enfermedad desmielinizante de los nervios periféricos (motores y sensitivos). Hay otras dos formas clínicas menos frecuentes, que corresponden a otros genes diferentes del de la primera forma. Los signos de la enfermedad son: debilidad y atrofia de los músculos peroneos, deformidad de los pies (pie cavo), conducción nerviosa disminuida en el nervio mediano e inci-

dencia familiar, de patrón dominante. Hay dificultades para caminar desde la niñez; las piernas se van atrofiando y dan un aspecto característico. 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. 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 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. 2) y por hibridación in situ y fluorescencia (HISYF, véase cap. 14).<sup>17</sup> La conclusión de estas observaciones es que un segmento del cromosoma 17 estaba por 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 bandeo (véase cap. 14) pero sí es detectable por HISYF (fig. 1-12).

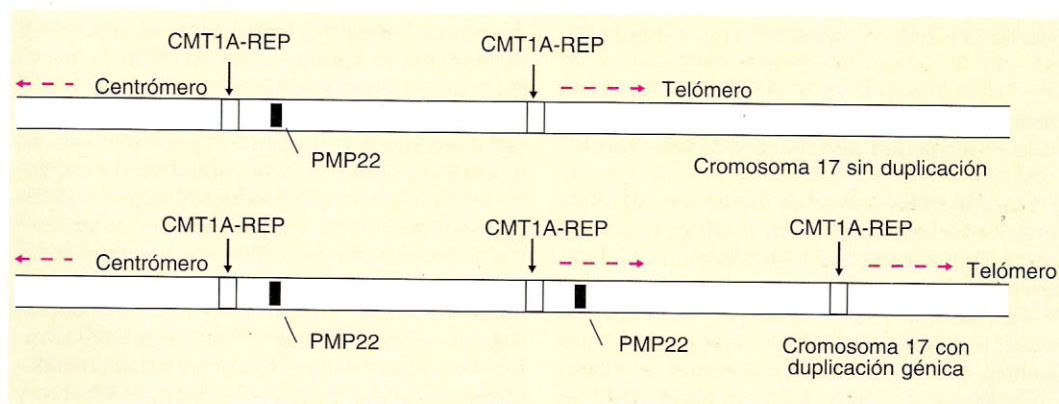
Esta duplicación en el cromosoma 17 fue encontrada en un número considerable de pacientes europeos pertenecientes a familias independientes, lo cual es una evidencia de peso de que se trata del cambio genético relacionado con la enfermedad. Además de transmitirse en familias que ya la poseen, esta duplicación 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. 1-13). Esta repetición, llamada CMT1A-REP está presente como 3 copias en el cromosoma 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. 9). En la región de la duplicación se localiza un gen, el PMP22 (de la Proteína de Mielina Periférica de 22 kDa).



**Fig. 1-12.** 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.

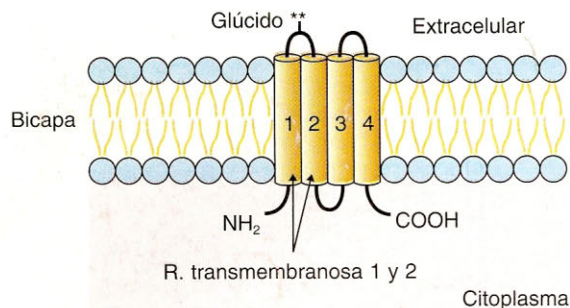
La duplicación citada del cromosoma 17 fue encontrada en estado homocigótico (es decir, en ambos cromosomas) al menos en un paciente con una forma clínica más acentuada de esta enfermedad. Además, se encontraron los síntomas de esta enfermedad en casos de una duplicación *microscópicamente visible*, 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.<sup>17,18</sup> Se encontró además un modelo animal de esta enfermedad: en el ratón, la mutación *trembler* (Tr, Tr<sup>1</sup>) 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. 2 y 4), que a su vez sirvió para identificar el ADNc humano homólogo en genotecas de ADNc de cerebro humano (véase genotecas, cap. 2). 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



**Fig. 1-13.** 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.





**Fig. 1-14.** Esquema de la proteína PMP22 ubicada en la membrana celular. Se señalan las cuatro regiones intramembranas que atraviesan la bicapa; los extremos amino ( $\text{NH}_2$ ) y carboxiterminal ( $\text{COOH}$ ) son citoplasmáticos.

de gen funcionante, véase cap. 4) 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<sup>19</sup> (fig. 1-14).

### 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 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 (véase panel 1-2).

### 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 va-



**Panel 1-2. Mecanismos patogénicos de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth de tipo 1A.** 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.<sup>20</sup> 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.<sup>20</sup>

rianzas 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 ser debido 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  $H = V_g / (V_g + V_a)$ ; 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 gené-

tico, 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 3 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, 4<sup>a</sup> 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. Rasmussen H, Tenenhouse HS. Hypophosphatemias. En: The metabolic basis of inherited disease (Editores: Scriver CL et al.), New York: McGraw-Hill Book Company, 1989.
5. Buyse ML. Encyclopedia of Birth Defects (Editor: Buyse ML). New York, 1990.
6. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265:2037-2048.
7. Smith C. Concordance in twins: methods and interpretations. *Amer J Human Genet* 1974; 26:454-466.
8. Lewontin RC. The analysis of variance and the analysis of causes. *Amer J Human Genet* 1974; 26:400.
9. Cavalli-Sforza LL, Bodmer WF. The genetics of human populations. San Francisco: WH Freeman, 1971.
10. Holt SB. Quantitative genetics of finger-print patterns. *Brit Med Bull* 1961; 17:247-250.
11. Polani PE. Abnormal sex chromosomes and mental disorder. *Nature* 1969; 223:680-686.
12. Preus M, Fraser FC. Dermatoglyphics and syndromes. *Amer J Dis Children* 1972; 124:933-943.
13. Reed T. Review: Dermatoglyphics in Medicine - Problems and use in suspected chromosome abnormalities. *Amer J Med Genetics* 1981; 8:411-429.
14. Ogata T, Matsuo N. Comparison of adult height between patients with XX and XY gonadal dysgenesis: support for a Y specific growth gene. *J Med Genet* 1992; 29:539-541.
15. 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.
16. Byard PJ, Lees FC. Estimating the number of loci determining skin colour in a hybrid population. *Ann Hum Biology* 1981; 8:49-58.
17. Patel PI. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: mutational mechanisms and candidate gene. *Current Opin Genet Develop* 1993; 3:438-444.
18. Lemke G. The molecular genetics of myelination: an update. *Glia* 1993; 7:263-271.
19. Snipes GJ, Suter U. Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system. *J Anat* 1995; 186:483-494.
20. Adlkofer 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.



# Capítulo

# 1

## INTRODUCCIÓN

***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**

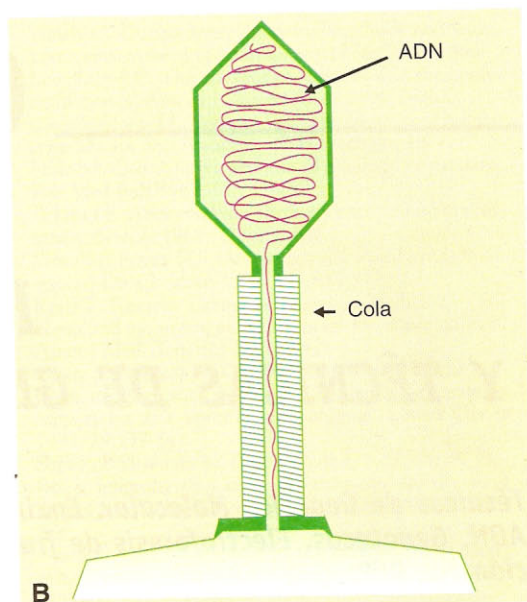
La ciencia de la Genética se ha establecido sobre la base de algunos postulados fundamentales, de los cuales el primero es que la estructura y la función de un organismo dependen de dos tipos de factores: los ambientales y los genéticos.<sup>1</sup> Este postulado está sustentado por la observación de 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 *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 exis-

te, 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"). 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



**Fig. 2-1.** Microfotografía electrónica (izquierda; 210.000X)<sup>1</sup> 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.

cierta manera, puede ser equiparado al de un prototipo de sistema inmunitario. Las enzimas de restricción se denominan así porque restringen 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. 2-1).

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 *EcoRI* es la secuencia de seis pares de bases GAATTC/CTTAAG (véase más adelante). Dado que estas enzimas cortan el ADN cuando encuentran 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 en el ADN 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.<sup>2</sup>

## Nomenclatura

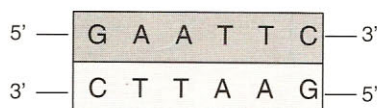
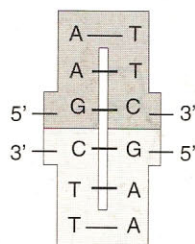
Los nombres de las endonucleasas de restricción se basan en los nombres científicos de la bacteria de la cual se extrajeron. Las primeras tres letras corresponden al nombre de la bacteria, de la siguiente forma: la 1<sup>ra</sup> letra es la inicial del género, la 2<sup>da</sup> y la 3<sup>ra</sup> son letras del nombre de la especie, la 4<sup>a</sup> letra designa la cepa especial y el número (romano) indica el orden histórico de las enzimas descubiertas en esa bacteria. Así, la 1<sup>ra</sup> enzima de restricción descubierta en la cepa RY13 de *Escherichia coli* (bacteria usual en la flora intestinal) se designa *EcoRI*. Algunas otras de las enzimas de restricción más usadas son: *HindIII* (de *Haemophilus influenzae*, cepa Rd, 3<sup>ra</sup> en aislarse), *NotI* (de *Nocardia otitidis*) y *BamHI* (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. 2-2).

Estas secuencias palindrómicas tienen otras propiedades extraordinarias:



Secuencia específica para *EcoRI*

Forma en cruz de la secuencia

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

- 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;
- 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 *EcoRI*, tienen una estructura particular. La *EcoRI* 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. 2-3).

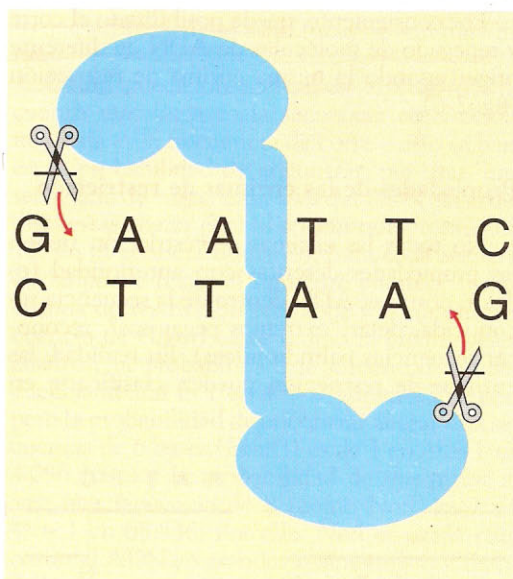
De esta manera, cada subunidad lleva a cabo un corte, es decir, una ruptura de unión fosfodiéster por hidrólisis en una hélice y, en conjunto, se realizan dos cortes, uno a cada cadena; los dos cortes, en *EcoRI* y otras enzimas, se hacen a distinto nivel pero en forma simétrica respecto del centro de la secuencia reconocida, y deja un fosfato sobre un C-5 y un hidroxilo en el sitio 3'. 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 conoci-

miento del genoma (humano y de otros organismos) por dos espectaculares propiedades: 1) son capaces de cortar regular e infaliblemente 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



**Fig. 2-3.** Esquema de la enzima *EcoRI* 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.<sup>3</sup>

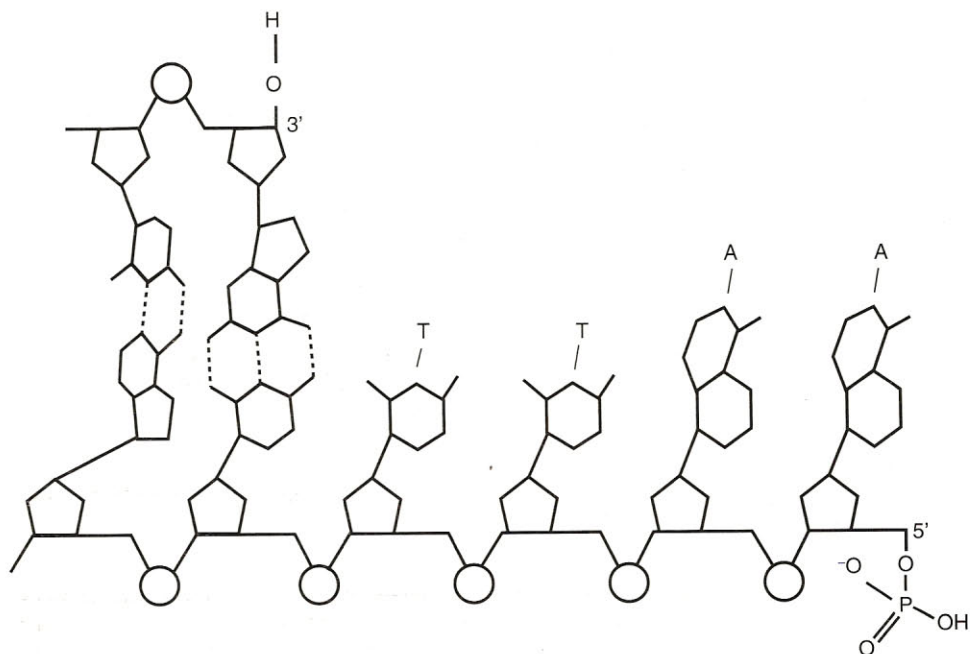


Fig. 2-4. Esquema de un extremo de ADN cortado con la enzima *EcoRI*.

(provisto por ATP) y una enzima *ligasa* de ADN (p. ej., la *ligasa T4*) (fig. 2-5).

Por consiguiente, queda posibilitado el corte y repegado de moléculas de ADN de diferente origen usando la misma enzima de restricción (fig. 2-6).

### 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 enzimas 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.

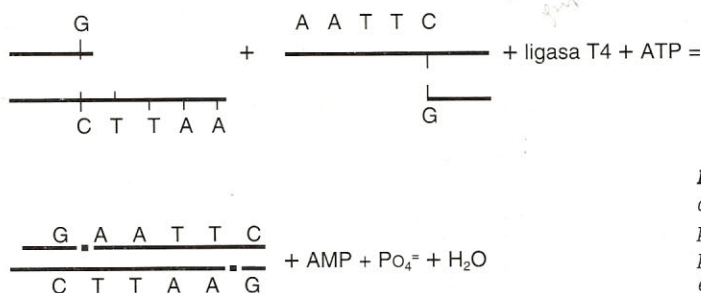
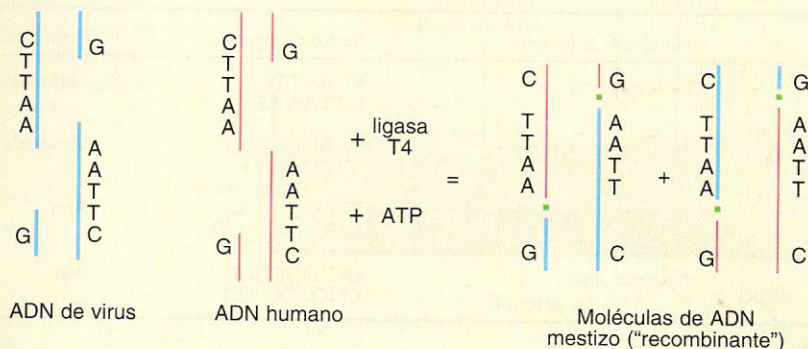


Fig. 2-5. Dos extremos de fragmentos de ADN cortados con *EcoRI*; debido a que poseen sus "extremos colgantes" complementarios, se unen permanentemente en presencia de *ligasa T4* y ATP.





**Fig. 2-6.** Dos moléculas de ADN (una viral, línea gruesa; y una humana, línea fina), cortadas con *EcoRI*, pueden reunirse y formar dos moléculas de ADN mestizo (humano-viral).

bles 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  $-20^{\circ}\text{C}$  y se llevan a temperatura ambiente o a  $37^{\circ}\text{C}$  sólo durante la reacción para cortar ADN. La mayoría de estas enzimas se inactiva totalmente por calentamiento a  $68^{\circ}\text{C}$  durante 10 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  $\mu\text{g}$ ) 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  $\lambda$  ( $\mu\text{L}$ ) o, en la práctica, 1  $\mu\text{L}$  de preparado comercial por reacción de 50  $\mu\text{L}$ . Las enzimas de restricción (grupo II) necesitan  $\text{Mg}^{++}$ , de modo que la mezcla de reacción contiene  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  además de otras sales. Generalmente, se usa un buffer concentrado (10 X) del cual se usan 5  $\mu\text{L}$  por reacción de 50  $\mu\text{L}$ .

### 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 po-

cos 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 *NotI* (de *Neocardia 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 2-1, 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 ( $3 \times 10^9$  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 *HpaII*, 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 (*EcoRI*) es de 1 en  $4^6 = 1$  en 4.096 bases y la probabilidad de encontrar al azar una secuencia de 8 (como *NotI*) es 1 en  $4^8 = 1$  en 65.536. Por ello, *NotI* 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

**Cuadro 2-1. Tipos de enzimas de restricción**

Enzima	Nombre de la bacteria	Secuencia específica	Frecuencia de corte
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	G AATTC CTTAA G	Moderada
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	A AGCTT TTCGA A	Moderada
HaeIII	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C CGG GGC C	Alta
NciI	<i>Nocardia otitidis</i>	GC GGCCGC CGCCGG CG	Baja

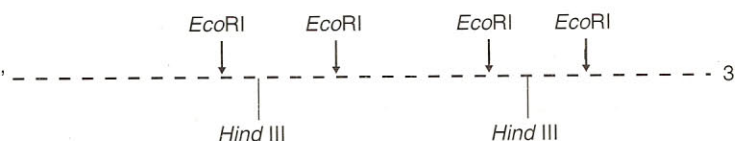
rápida y precisa, por la acción sobre él de una o más enzimas de restricción. Éste es uno de los primeros pasos para identificar y empezar a estudiar un ADN. Si un ADN es sometido a la acción de *EcoRI* y da cinco fragmentos, decimos que ese ADN posee cuatro (los extremos originales no cuentan) secuencias reconocidas por *EcoRI*, o *sitios de restricción de EcoRI*. Para precisar más la constitución de ese ADN, se agrega otra enzima (p. ej., *HindIII*) 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 2-7.

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

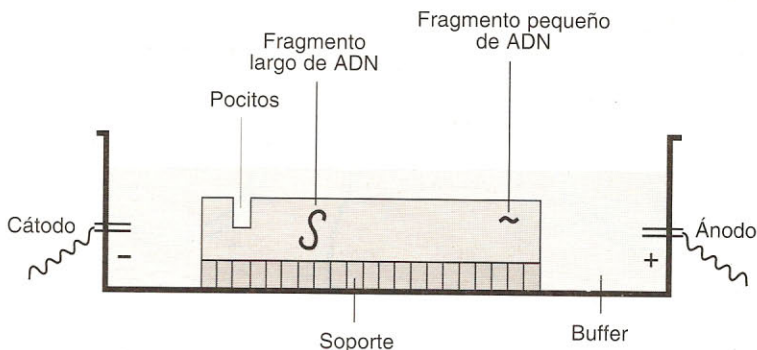
poseen las abundantes cargas negativas de sus fosfatos, los cuales están colocados regularmente a lo largo de la cadena. El gel de agarosa, usado en concentraciones que varían entre 0,2 y 3%, produce mallas de espacios menores cuanto mayor es la concentración. A una concentración dada, los fragmentos 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. 2-8). 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 visible 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, que se introduce entre las dos 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  $\mu\text{g}$  de ADN, lo que re-



**Fig. 2-7.** Esquema de un mapa de restricción simple donde se utilizan dos enzimas de restricción.



**Fig. 2-8.** Esquema de electroforesis en agarosa. Los fragmentos de ADN corren desde los pocitos hacia el ánodo, con velocidad inversamente proporcional a su longitud.



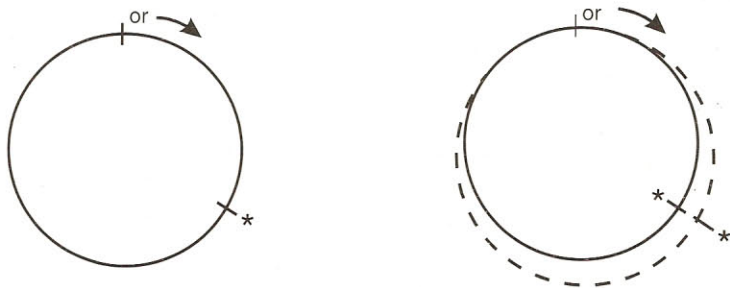
presenta entre 1 y 10 ng (nanogramos). A cada costado corren separadamente marcadores (estándar) de peso molecular conocido (o pares de bases = pb) que sirven para calibrar el tamaño de los fragmentos.

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

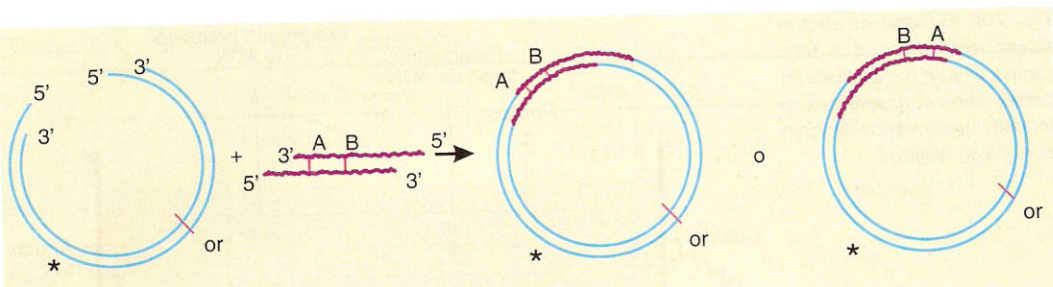
Los fragmentos de ADN cortados a medida con las enzimas de restricción y repegados con fragmentos de otros ADN no son demasiado útiles cuando están aislados; es preciso poder multiplicar muchas veces cada fragmento para obtener su secuencia y, adicionalmente, es importante poder hacer funcionar ese fragmento en un organismo, es decir, ver su replicación 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 encuentran normalmente en algunos microorganismos, a los cua-

les favorecen en alguna función. Algunos plásmidos son muy notorios, porque confieren resistencia a un antibiótico a las bacterias. De esa manera, un plásmido que confiere 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. 2-9).

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



**Fig. 2-9.** 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.



**Fig. 2-10.** Apertura de un plásmido con *EcoRI* e injerto de un fragmento de ADN cortado en sus dos extremos con *EcoRI*. El fragmento (líneas gruesas), que lleva los marcadores A y B, puede insertarse de dos maneras: directo (AB) o invertido (BA).

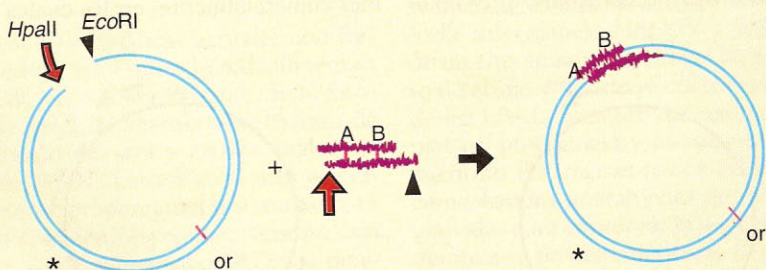
injerto de trozos de dos o más plásmidos es posible tener los sitios de restricción requeridos. El principio para injertar un fragmento de ADN ("inserto") en un plásmido es sencillo: un fragmento de ADN conseguido con una enzima de restricción (p. ej., *EcoRI*) que deja sus dos extremos "pegajosos" es 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 presencia de la ligasa T4 de *E. coli*, se hace la reacción (fig. 2-10).

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. 2-11).

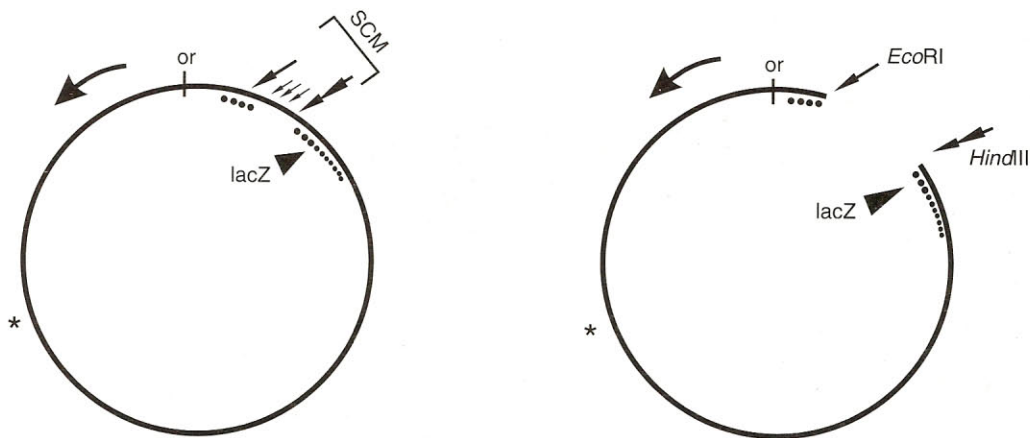
### Plásmidos comerciales: pUC19 y vectores de expresión

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



**Fig. 2-11.** 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.





**Fig. 2-12.** Esquema simplificado del plásmido pUC19. A la izquierda, el pUC19 intacto; a la derecha, abierto por acción de *EcoRI* y *HindIII*, para recibir un inserto direccionado. SCM: Sitio de Clonación Múltiple; lacZ: péptido de  $\beta$ -galactosidasa, que queda interrumpido cuando se inserta un fragmento de ADN en el SCM. Asterisco: sitio para resistencia a ampicilina.

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 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 (pBR322 y fago M13 mp19). Contiene el gen de resistencia a la ampicilina y el principio del gen de la  $\beta$ -galactosidasa y un promotor (fig. 2-12).

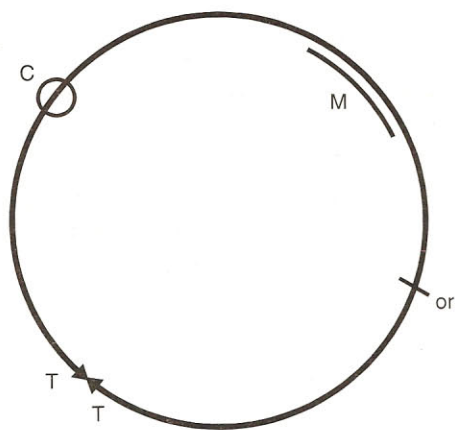
Dado que el plásmido pUC19 posee la parte inicial del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, las bacterias que lo reciben forman colonias azules en un medio que contiene reactivo de la  $\beta$ -galactosidasa. Pero si el plásmido lleva un fragmento de ADN foráneo en su sitio de ligamiento (clonación) múltiple, se interrumpe la formación parcial de  $\beta$ -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 ( $\beta$ -galactosi-

dasa). En ciertas condiciones, el promotor promueve la transcripción del inserto foráneo más el principio de la  $\beta$ -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 a 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 2-2). El límite superior de ADN foráneo 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 acomodarse hasta 40 kb de ADN foráneo.



**Fig. 2-13.** "CAL" circular pequeño, que funciona como plásmido bacteriano. C, centrómero; T,T, telómeros fusionados; M, gen marcador; or, origen de replicación.

### Cromosomas artificiales de levadura (CAL = YAC en inglés, Yeast Artificial Chromosome)

Un notable adelanto de la década de 1980 fue el descubrimiento de los tres elementos esenciales para la organización de los cromosomas en levaduras,<sup>4</sup> 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. 3). 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 co-

**Cuadro 2-2.** Tipos de inserto en genotecas

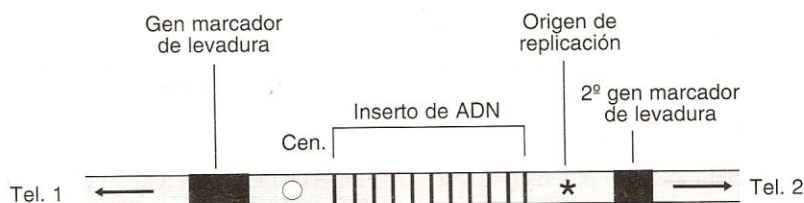
Vector	Tamaño promedio de inserto de ADN
Plásmido	4 kb
Fago lambda	20 kb
Cósmido	40 kb
CAL	hasta 1 Mb

mún. 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 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. 2-13 y 2-14).

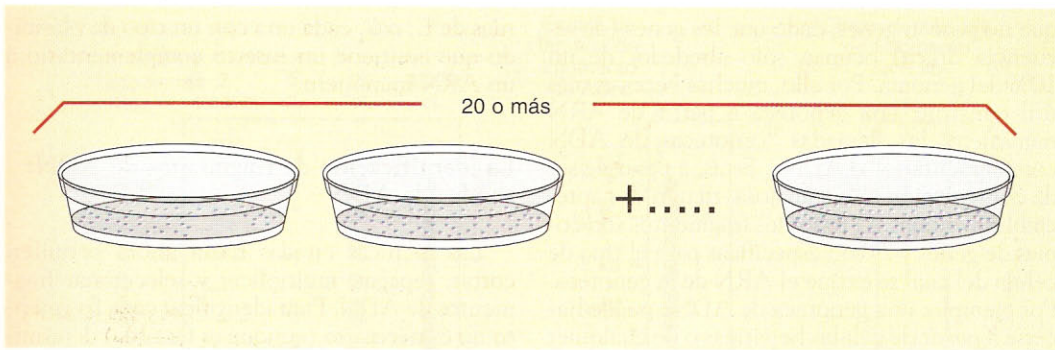
### Clonación o multiplicación de fragmentos de ADN

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 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



**Fig. 2-14.** "CAL" lineal con inserto de ADN de gran tamaño (hasta 1 Mb) y funcional como cromosoma artificial en células de levadura.





**Fig. 2-15.** Esquema de una genoteca genómica en cápsulas de Petri.

vuelve “competentes” para captar al vector.<sup>5</sup> Este proceso requiere que las bacterias se repliquen activamente (que estén en la fase logarítmica de crecimiento), un tratamiento con sales de  $\text{Ca}^{++}$  u otros cationes en frío y un breve pulso de calentamiento a  $42^{\circ}\text{C}$ . 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 (cuadro 2-2). Materialmente, esta genoteca es un conjunto de cápsulas de Petri (20 o más) con cultivos, donde cada colonia contiene un fragmento de ADN (fig. 2-15). La genoteca también puede estar representada por *improntas* de cada cápsula, hechas en una membrana, o por un único cultivo donde están mezcladas 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 (cuadro 2-2). Se considera que con  $1/10$  de mg de ADN (100  $\mu\text{g}$ ) 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 genes (de secuencia única) ocupan sólo alrededor de un 10% 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 incuban 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 plásmido 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 colo-

nias 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. 3).

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. 2-16).

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 lavada y secada se adhiere a una película sensible para radiografía, que luego se revela fotográfi-

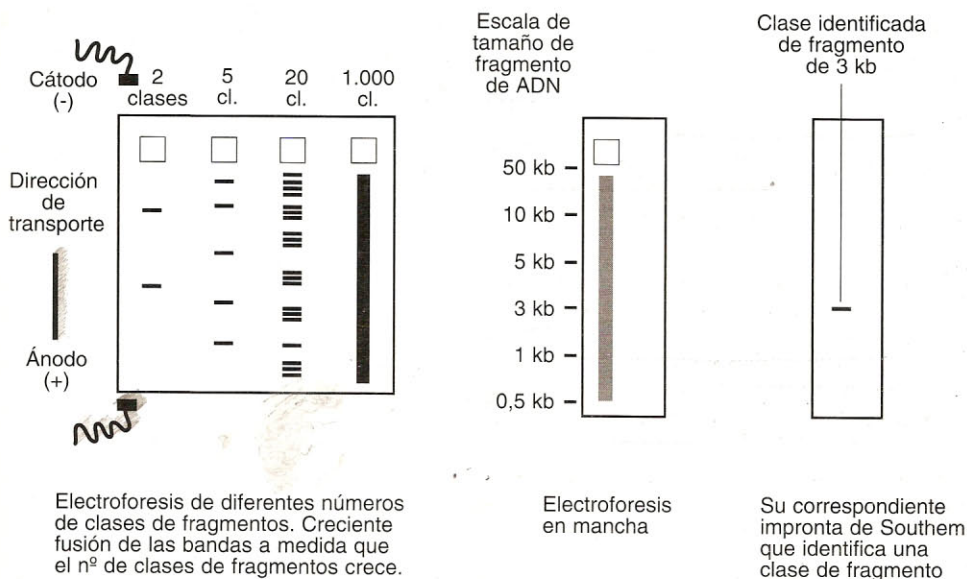


Fig. 2-16. Electroforesis en geles de agarosa y su correspondiente impronta de Southern.

camente, 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 se intercambian "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 dideoxinucleótidos. Varios centenares de bases se pueden secuenciar manualmente en dos días. Las secuencias se envían 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 computadoras conectadas a Internet, para todos los profesionales e investigadores.

### Termocicladores 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 facilitado 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 amplificar ADN prehistóricos y hacer estudios que previamente eran considerados imposibles, tales como identificar a una persona con unas pocas células.<sup>6</sup> 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).<sup>7</sup>

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 concentración, en presencia de un buffer a pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> y los cuatro desoxinucleótidos que se in-

corporan 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 primeros, uno en una cadena y el restante en la otra, y que por crecer en sentidos opuestos se denominan primero delantero y primero 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, a 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. 2-17):

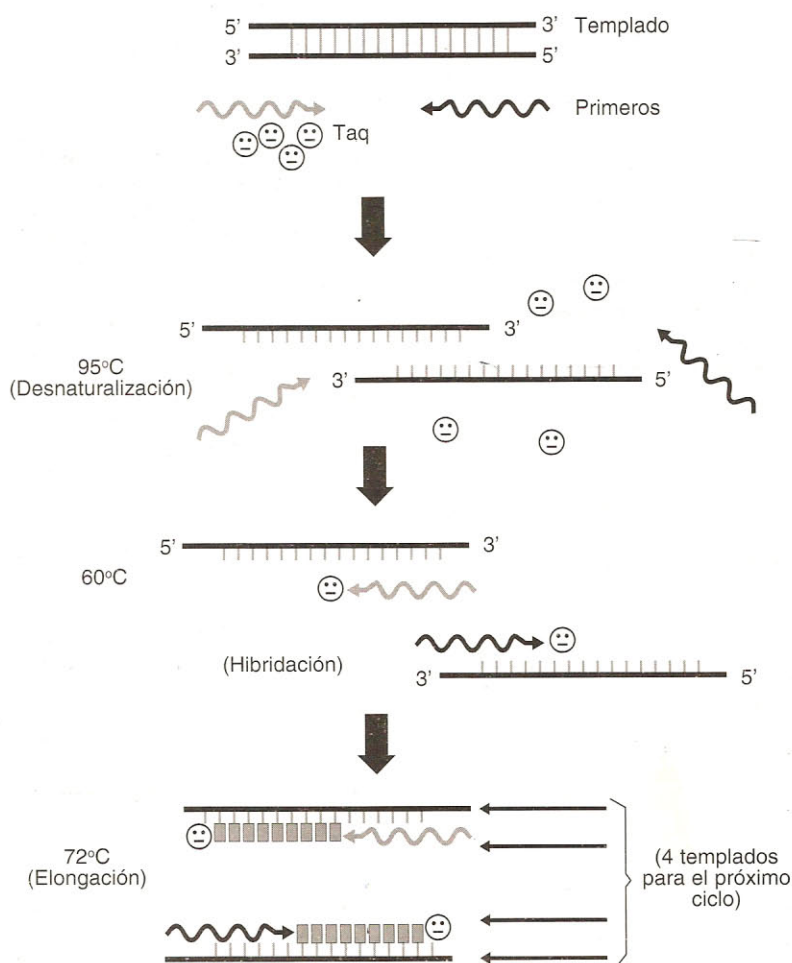
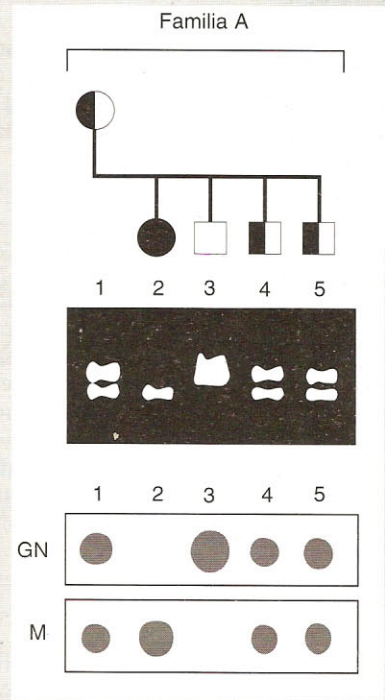


Fig. 2-17. Esquema del primer ciclo en la reacción en cadena de la polimerasa.



**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 detectado con sondas (oligómeros) específicas para el gen normal ("GN") y el mutante ("M"). El paciente (2) y el hermano sano, no portador (3) tienen una sola marca; los demás son heterocigotas y tienen las dos marcas.<sup>9</sup>



### Panel 2-1. 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 poliadenilada" (véase cap. 4) que tiene gran afinidad por resinas ligadas a polilitimina. 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 copias 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).<sup>9</sup>

- 1) Al calentar a 95°C, se separan las dos cadenas del ADN templado.
- 2) Al enfriar a 60°C, cada cadena puede hibridarse, en su secuencia específica, con el primer delantero o trasero.
- 3) Al calentar a 72°C, la Taq (polimerasa) empieza a extender, desde el extremo de un pri-

mero, una nueva cadena unida al primero; 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 primeros li-

bres. De esa manera, con cada ciclo, prácticamente se duplica la cantidad de ADN y en 30 ciclos es posible, en teoría, realizar  $2^{29}$  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 que tienen hasta 35 kb (véase panel 2-1).<sup>8</sup>

## RESUMEN

Se conoce con el nombre de "técnicas de ADN recombinante" a 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").

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 Via MI, Solari AJ. Isolation of *Streptococcus lactis* bacteriophages and their interaction with the host cell. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47:1352-1354.
2. Kessler C, Neumaier PS, Wolf W. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases -a review. *Gene* 1985; 33:1-102.
3. Heitman J. How the *EcoRI* 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, Ryyanen M, McGrath JA, Vitto J. Cloning of the human 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

- Micklos DA, Freyer GA. *DNA Science. A first course in recombinant DNA technology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Vols. I, II y III. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.



# Capítulo

# 3

## ***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**

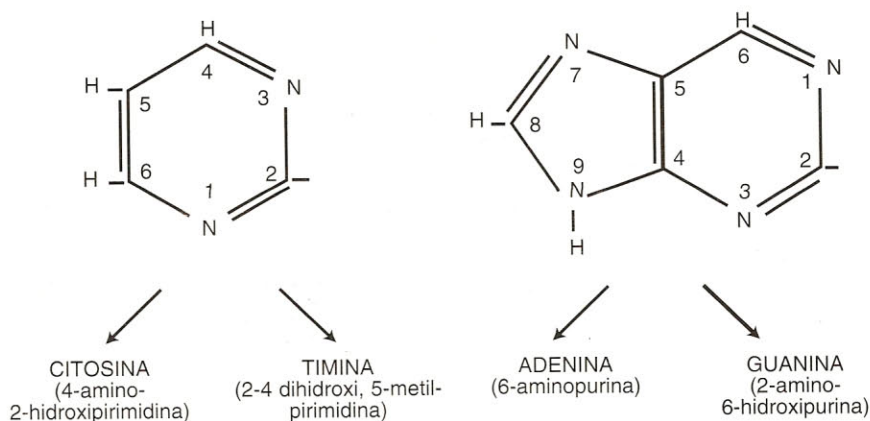
El ADN está compuesto por unidades (o monómeros) que se repiten muchos miles de veces a lo largo de la molécula: estas unidades se llaman *nucleótidos* y, por consiguiente, el ADN es

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. 3-1).

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 que se encuentran estas bases. Esto es importante porque la absorción en 259 nm, además de constituir un medio para el *dosaje rápido de áci-*

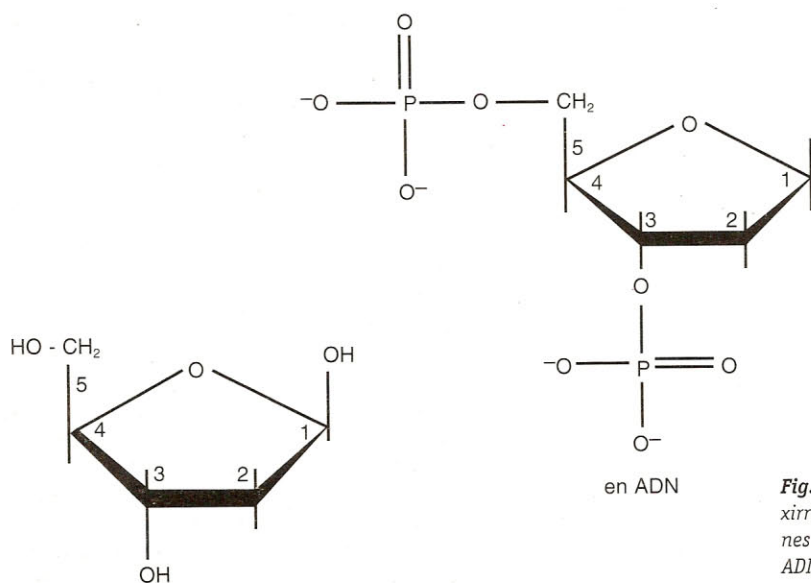


**Fig. 3-1.** Estructura básica y numeración de los átomos de los anillos de las pirimidinas (izquierda) y de las purinas (derecha).

dos 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”.

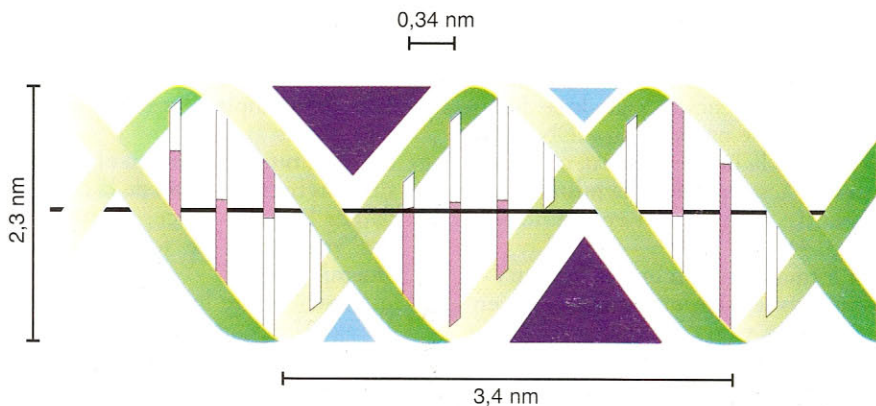
Las bases nitrogenadas intervienen en otros importantes componentes del metabolismo y son sintetizadas por el organismo. Estas bases nitrogenadas pueden formar “uniones de hidrógeno” (uniones relativamente lábiles) en algunos de sus átomos, al encontrarse en la inmediata cercanía de otro compuesto similar, y este 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. 3-2), 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



**Fig. 3-2.** Estructura de la desoxirribosa (izquierda) y sus uniones con ácido fosfórico en el ADN (derecha).





**Fig. 3-3.** 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.

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 ion 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, atrae cargas positivas, que pueden ser las de cationes, como los comunes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (monovalentes) y mucho más los divalentes como  $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$  (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. 3-3). 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, la enorme mayoría del ADN, en condiciones fisiológicas, se encuentra en la forma clásica, derecha (forma B) de hélice.

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: positiva (+, la que se lee en la transcripción) y negativa (que usualmente no se lee); a la hélice

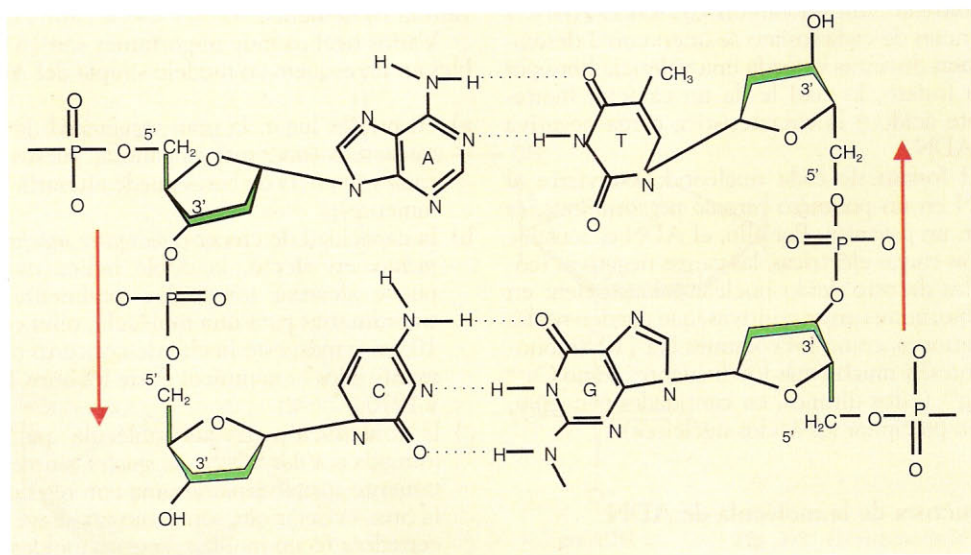
positiva también se la llama hélice molde o templado y, como es complementaria con el ARN mensajero, también se la llama de antisentido. Por convención, cuando se describe la secuencia de bases de un ADN, se escribe sólo la de la hélice *negativa*, o “de sentido”, ya que su secuencia es la misma que la del ARNm (con timina en vez de uracilo) (véase cap. 4);

- 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. 3-4);
- 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. 2);

- 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 grande (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,



**Fig. 3-4.** 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.



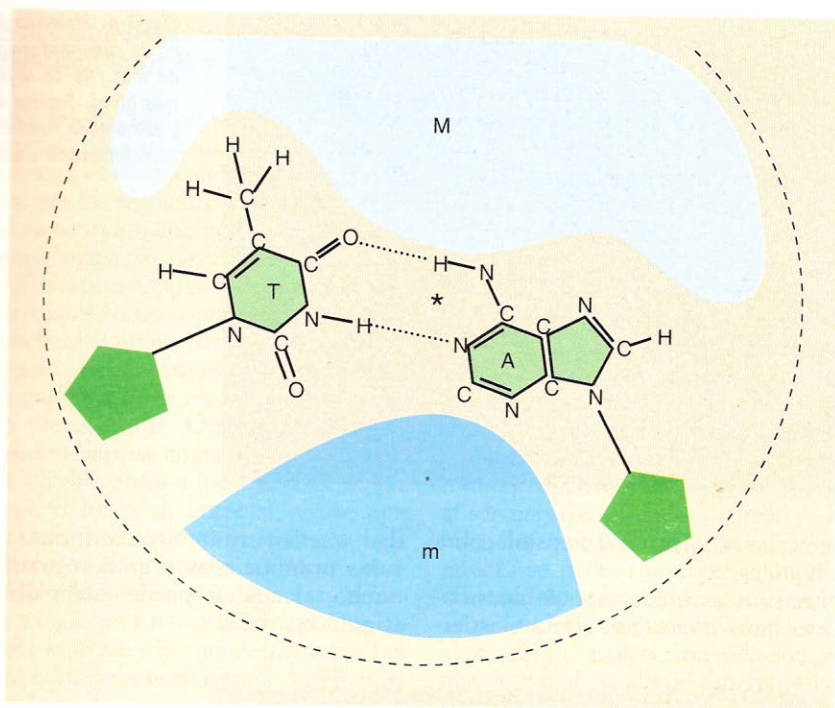


Fig. 3-5. Esquema de una de las dos parejas de bases, vistas desde arriba de la doble hélice (corte perpendicular de ésta). El eje longitudinal del ADN está señalado por un asterisco y pasaría perpendicular a esta hoja. La ranura mayor (M) y la ranura menor (m) están señaladas en sombreado.

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. 3-5).

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.

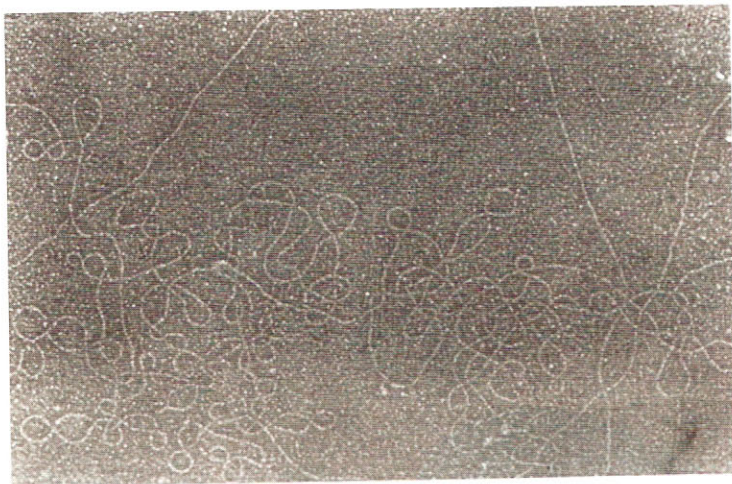
Finalmente, se debe considerar la conclusión de que el grado de torsión de la hélice no es absolutamente fijo, sino que varía con la secuencia de bases que están en cada segmento y tiene una medida media para todo un ADN (que es de casi  $36^\circ$  para la forma B, es decir,  $360^\circ$  por vuelta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

## MORFOLOGÍA DEL ADN

### Morfología con microscopía electrónica

El ADN sólo es visible con microscopía electrónica. Esto es a causa de su ancho, de 2,3 nm, que está muy por debajo del límite de resolución del microscopio de luz. Pero además se trata de moléculas enormemente largas (centrímetros), 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 es-



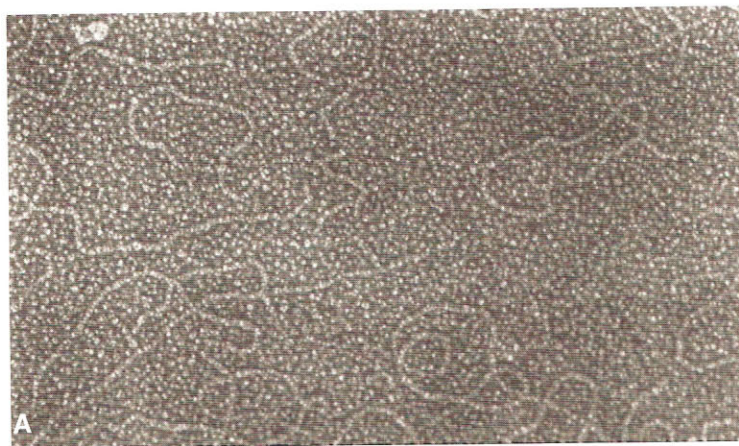


**Fig. 3-6.** Molécula de ADN nativo de espermatozoides de erizo de mar. No se observan extremos libres. Técnica de esparcido y sombreado metálico rotatorio. Microfotografía electrónica.<sup>2</sup>

peciales, 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. 3-6 y 3-7).



**Fig. 3-7. 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) con la de los filamentos de ADN.<sup>2</sup>



## 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 ADNs 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 ADNs diferentes, porque son complementarias, y regiones sin asociación, porque no está presente la secuencia complementaria. Las regiones no complementarias de 2 ADNs pueden formar lazos de cadena simple, similares a los de desnaturalización, llamados "laços-D" (de desoxirribonucleico). Por otra parte, un ARNm se asocia (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 "laços-R" (de ribonucleico) y son útiles para estudiar estos intrones.<sup>3</sup>

## 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 "laços" de ADN son uno de los órdenes fundamentales de empaquetamiento del ADN en el cromosoma (véase más adelante).

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 supe-

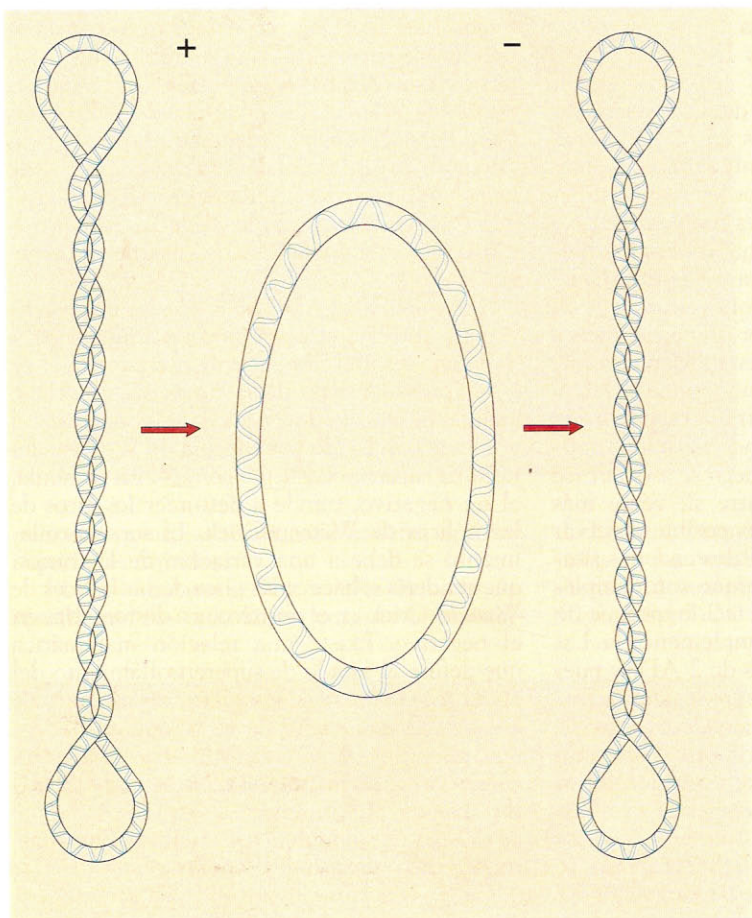
respiral) en el ADN, por el cual la molécula se tuerce y se entrecruza consigo misma (fig. 3-8). Es necesario distinguir la doble hélice básica del ADN (de Watson-Crick, abreviado W-C; también llamada hélice "secundaria" por corresponder a la estructura secundaria o espacial de la cadena) del superenrollamiento (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 de la "apertura" de la doble hélice).<sup>4,5</sup>

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 superenrollamiento (o una disminución en una vuelta de un superenrollamiento negativo). El ADN en la cro-



**Fig. 3-8.** Forma relajada del ADN circular (centro) y las superenrolladas positiva (izquierda) y negativa (derecha).

matina 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 entre 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 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 destuerzan 10 giros de W-C, y por eso se inducen 10 giros de superenrollamiento positivo:

$$100 = L = (100 - 10) + 10$$

### ADN cruciforme, ADN de lazos deslizantes y ADN de retorcido irregular

La presencia de regiones del ADN con secuencias palindrómicas de bases, es decir, secuencias repetidas e invertidas, no es infrecuente.<sup>6</sup> Las secuencias pueden ser cortas (como las reconocidas por enzimas de restricción; véase cap. 2) 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. 3-9). 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 hibridarse con la opuesta en la región de la próxima



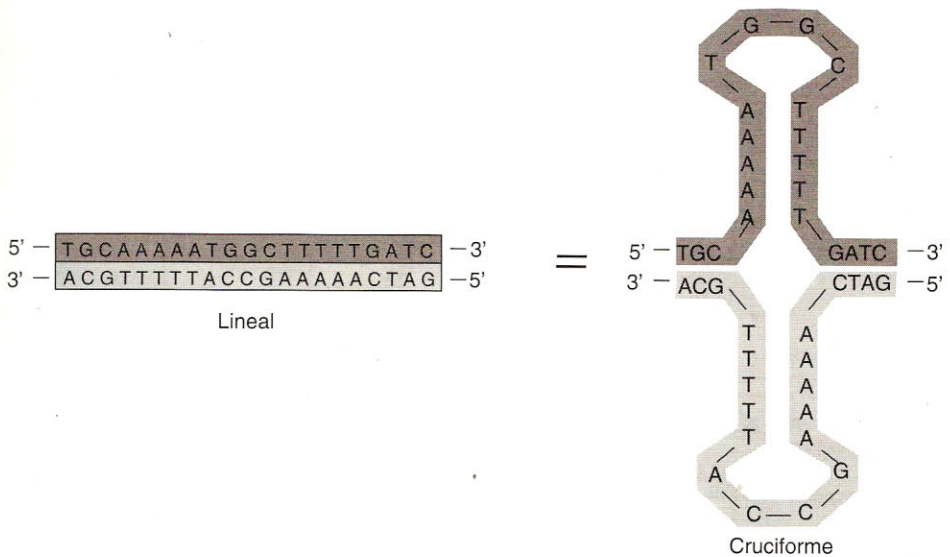


Fig. 3-9. Interconversión de las formas lineales y cruciformes en palíndromos.

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 temperatura, el 100% de las uniones están rotas; es la llamada “temperatura de separación de cadenas” ( $T_{ss}$ ) (fig. 3-10). 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.

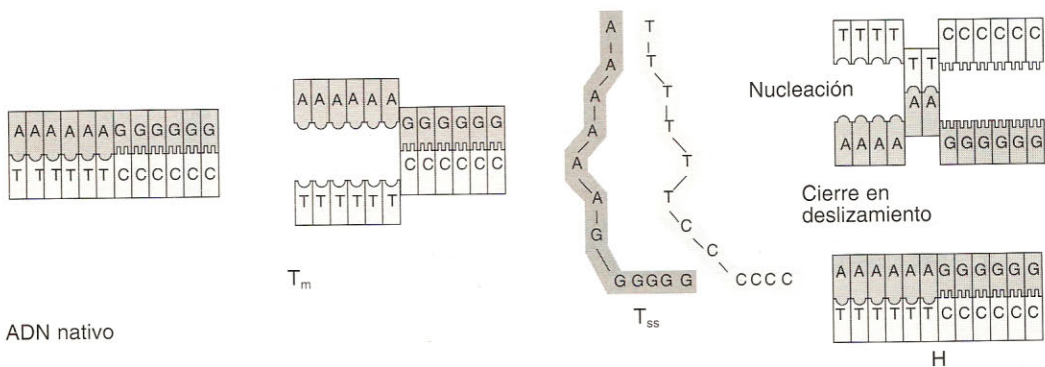


Fig. 3-10. ADN nativo, desnaturalización y reasociación o hibridación (H).

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  $0,41^\circ\text{C}$  por cada aumento de la concentración de pares G-C en un 1% y decrece con la disminución de longitud del segmento. Por otra parte, si existen bases mal apareadas, cada 1% de incremento en fallas de apareamiento disminuye  $0,72^\circ\text{C}$  la  $T_m$ . Las condiciones del medio también son importantes para la desnaturalización, aparte de la temperatura, en especial la concentración de cationes ( $\text{Na}^+$  y divalentes) que saturan 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. 2), y que no necesariamente tienen complementariedad perfecta (fig. 3-10).

En técnicas diagnósticas de hibridación, se denomina *estrictex* (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 estrictex* (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 de ADN diferentes, se usan condiciones de hibridación "relajadas".

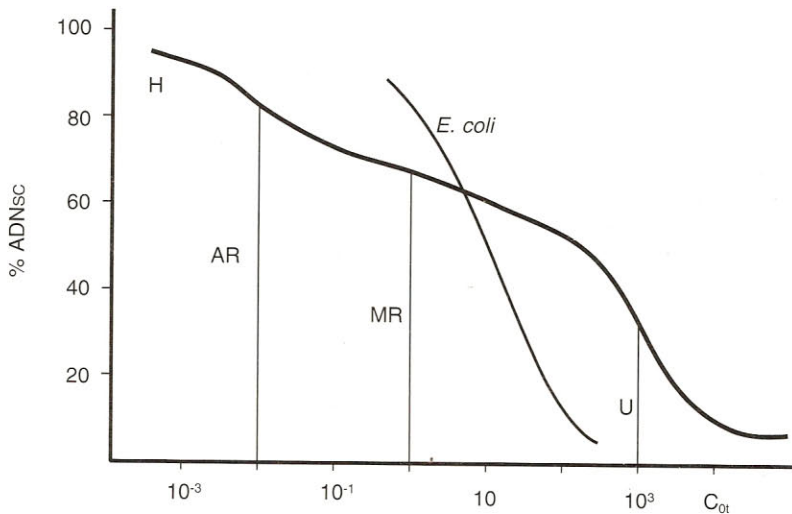
### Pasos de la hibridación

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*,<sup>7</sup> y su cinética es de segundo orden; 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 de ADN luego de su desnaturalización ha permitido determinar la existencia de *secuencias reiteradas* (





**Fig. 3-11.** Curvas  $C_{ot}$  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).

repetidas) en el ADN y establecer aproximadamente su grado de repetición. Estos análisis generalmente se representan en gráficos “Cot” (derivado de  $C_{ot}$ , que es el producto de la concentración inicial multiplicada por el tiempo) (fig. 3-11). Ésta es una forma de graficar la velocidad con la que los segmentos de cadena única se van hibridando a medida que varía la concentración de ADN o el tiempo de contacto; las curvas miden el porcentaje de ADN remanente de cadena simple, por cada variación del producto  $C_{ot}$  (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.

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 ítem previo) 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 3-1).

### 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

## CLASIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL ADN HUMANO

El genoma humano, constituido por 3.000 megabases ( $3 \times 10^9$  bases), posee una estructura

**Cuadro 3-1.** Tipos de secuencias del genoma humano de acuerdo con su grado de repetición

Tipo	Denominación	Características
De alta repetición	ADN satélites	10 <sup>6</sup> 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 <sup>4</sup> copias o más
	Transposones	Transposón THE humano; 10-10 <sup>2</sup> copias
	Familias génicas	ARN <sub>r18s</sub> , ARN <sub>r28s</sub> , ARN <sub>t</sub> , etc.; 10 <sup>2</sup> copias
	ADN telomérico	(TTAGGG) <sub>n</sub> , 10 <sup>4</sup> copias
	ADN minisatélite	Muy polimórfico; 10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> copias
	ADN microsatélite	(CA) <sub>n</sub> ; (TG) <sub>n</sub> ; 10 <sup>5</sup> 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.

modo, las secuencias no codificantes pueden ser *estructurales*, *regulatorias* o *de función desconocida* (cuadro 3-2).

La presencia de una vasta cantidad de secuencias de ADN que no codifican proteínas o ARNs 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; 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 transcrito (como las seña-

les de poliadenilación), además de secuencias que son reconocidas por otras proteínas intranucleares. Sin embargo, queda una gran cantidad de ADN que, o codifica para los ARNs o proteínas extrañas al organismo, o no se transcribe y se desconoce su función. Para este caso, se ha pensado 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. Es posible, sin embargo, que este “ADN egoísta” provea alguna ventaja evolutiva a la especie.

**ADN de funciones estructurales:  
ADN satélites y teloméricos**

Estas secuencias de ADN tienen localizaciones definidas: se encuentran en los centrómeros (cuadro 3-3) (ADN satélites) y en los telóme-

**Cuadro 3-2.** Clasificación funcional de las secuencias del ADN humano

Codificantes	De elementos propios	ARN <sub>r</sub> , ARN <sub>t</sub> , ARN <sub>5s</sub> Proteínas
	De elementos accesorios	Retroposones Transposones
No codificantes	De función estructural	ADN satélites y telomérico
	De función regulatoria	Promotores, estimuladores, etc.
	De función desconocida	ADN intergénico (mayoría)



**Cuadro 3-3. Tipos de ADN de las regiones centroméricas humanas<sup>8</sup>**

Tipo	Unidad (pb)	Localización cromosómica
Alfoide	171	Todos los cromosomas
$\beta$	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

ros (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 (cuadro 3-3) pero el principal es el ADN  $\alpha$  o "alfoides", 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 ADN; en esta técnica, el ADN se separa 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 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 mamíferos y está relacionado con el patrón de bandeo G de los cromosomas. Su nombre proviene del inglés ("Short Interspersed repeated sequences") 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 *AluI* (extraída de *Arthrobacter luteus*, sitio 5'-AGCT-3').



Fig. 3-12. Esquema de una secuencia humana *Alu*.

*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 bandeo G de los cromosomas humanos, 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 150 megabases, es decir, el 5% 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. 3-12).

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, le dan importancia para la evolución humana.

### Secuencias repetidas largas y dispersas: LINEs

Estas secuencias LINEs (Long Interspersed repeated sequences) están representadas en el genoma humano por las secuencias llamadas "LIHs" (de Largas, tipo 1, de *Homo sapiens*) 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 retrotransposones, 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 LIHs, 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. 4) 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 hace poco, 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.<sup>9</sup>

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 retroposición, 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 transcritos son lábiles y no abandonan el núcleo. En términos generales, podría considerarse a las secuencias LIHs como "restos fósiles" de retrovirus insertados en el genoma humano.

### Pseudogenes y pseudogenes procesados

Los "pseudogenes" son genes incompletos o no funcionales, originados por una duplicación de un gen, cuya copia se torna no funcional por delecciones 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); por consiguiente, queda sujeta a la presión de mutación que más o menos rápidamente empieza a introducir cambios en su secuencia, algunos de los cuales la tornan no funcional. pseudogenes típicos se encuentran en las familias  $\alpha$  y  $\beta$  de las globinas humanas.

Existe otro tipo diferente de los pseudogenes propiamente dichos, que son los "pseudogenes procesados" y que se hallan con mucha 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 me-



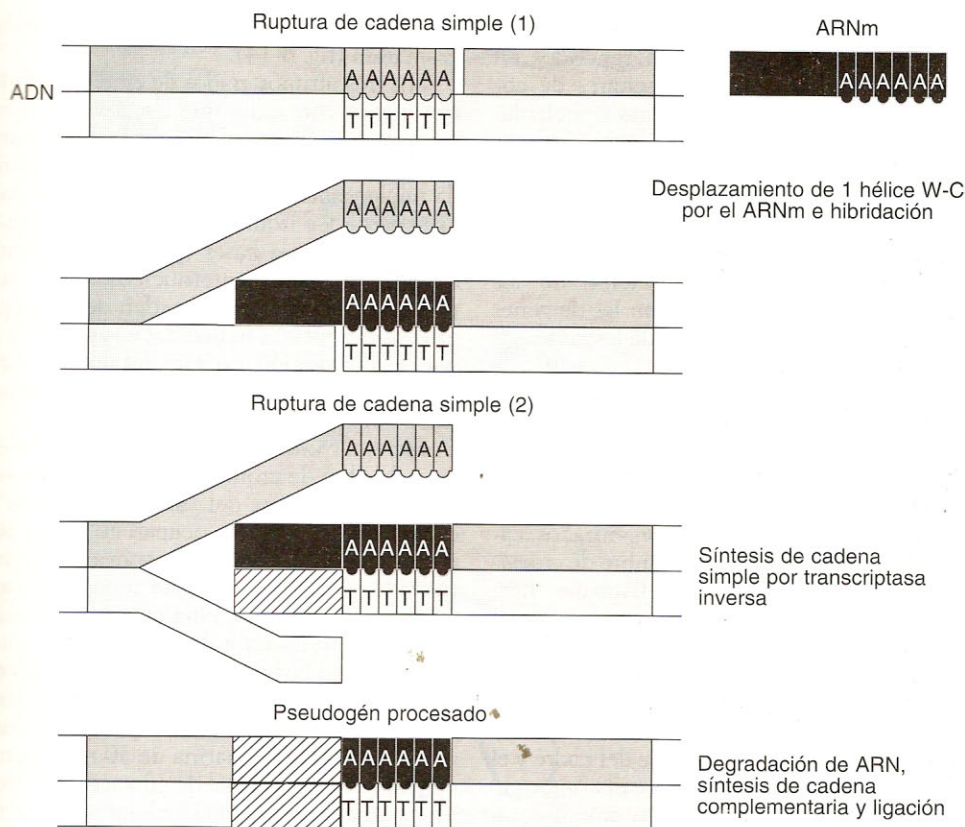


Fig. 3-13. Esquema de la formación de un pseudogén procesado.

canismo 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 (LIHs), que también presentan con frecuencia el corte de sus secuencias iniciales. Hay numerosos pseudogenes procesados, entre otros, de  $\beta$ -tubulina e inmunoglobulinas.

El mecanismo de transposición de los pseudogenes procesados requiere actividad de transcriptasa inversa (fig. 3-13).

## Duplicación génica y familias génicas

La presencia de pseudogenes implica la duplicación de genes; esta última se ha constatado como una importante herramienta evolutiva en los eucariontes superiores, en especial en los vertebrados.<sup>10</sup> 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,  $\alpha$  y  $\beta$ , 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  $\alpha$  y  $\beta$ ). 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

fueron los genes para ARN ribosómico. Los citrones de ARNr se encuentran repetidos en tándem, y totalizan varios centenares de copias, localizadas 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  $\beta$  y  $\gamma$ , y la de la ubiquitina.

## 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 metafásico, 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 cromosoma puede ser distinguido por su tamaño, sus características de forma y su patrón de bandas luego de un procedimiento de coloración para "bandedo". 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  $\mu\text{m}$  de longitud posee en cada cromátida un filamento de ADN de 50.000  $\mu\text{m}$  = 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 (solenoides) de 30 nm c) el de los lazos de fibra de cromatina d) el de agru-

pamiento de lazos y e) el de espiralización de cromátida (fig. 3-14).

Los tres últimos grados de empaquetamiento son menos conocidos que los dos primeros. En estos dos primeros órdenes de empaquetamiento, el ADN se empaqueta espiralizándose: sobre cada nucleosoma, el ADN forma casi dos vueltas de superhélice izquierda (1,8 vueltas) que ocupan 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,<sup>11</sup> es el que forma la fibra de cromatina usualmente vista con microscopía 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 alrededor 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. 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

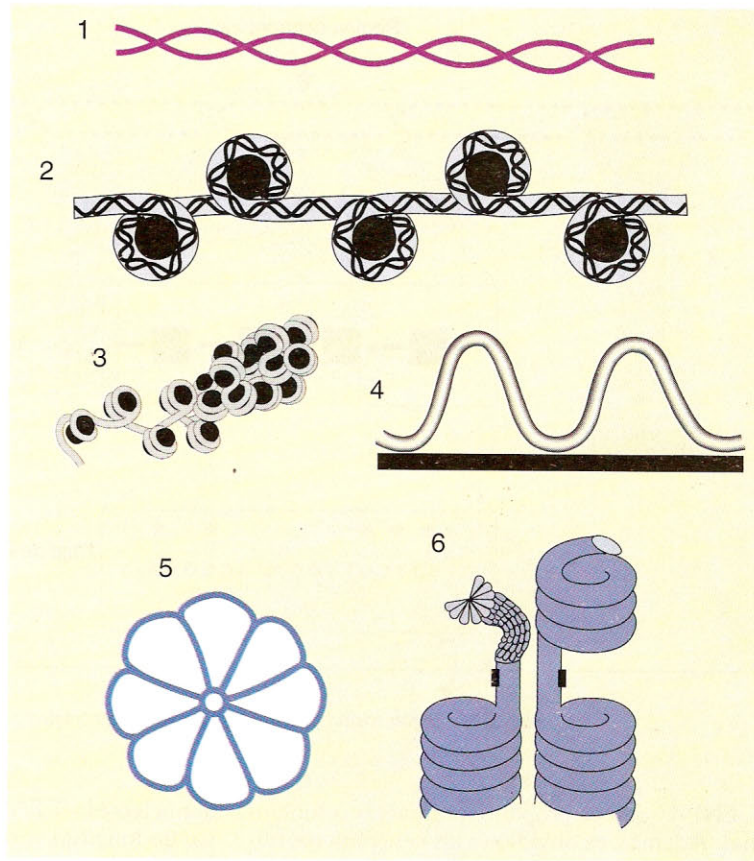
En la década de 1980, se descubrió en la levadura común (eucarionte primitivo) que ciertas secuencias de ADN son fundamentales para la organización de cualquier cromosoma: son las secuencias centroméricas, las teloméricas y las que forman los orígenes de replicación del ADN. Esta organización fundamental 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 fue mencionado 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 nu-



Fig. 3-14. 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 cromatinicas; 5: agrupación de lazos; 6: enrollamiento de cromátidas y zona centromérica.



meras variantes). El componente mejor definido en cada unidad es la secuencia de 17 nucleótidos llamada "caja de CENP-B", que se une específicamente a la proteína centromérica CENP-B (fig. 3-15).

### Proteínas centroméricas

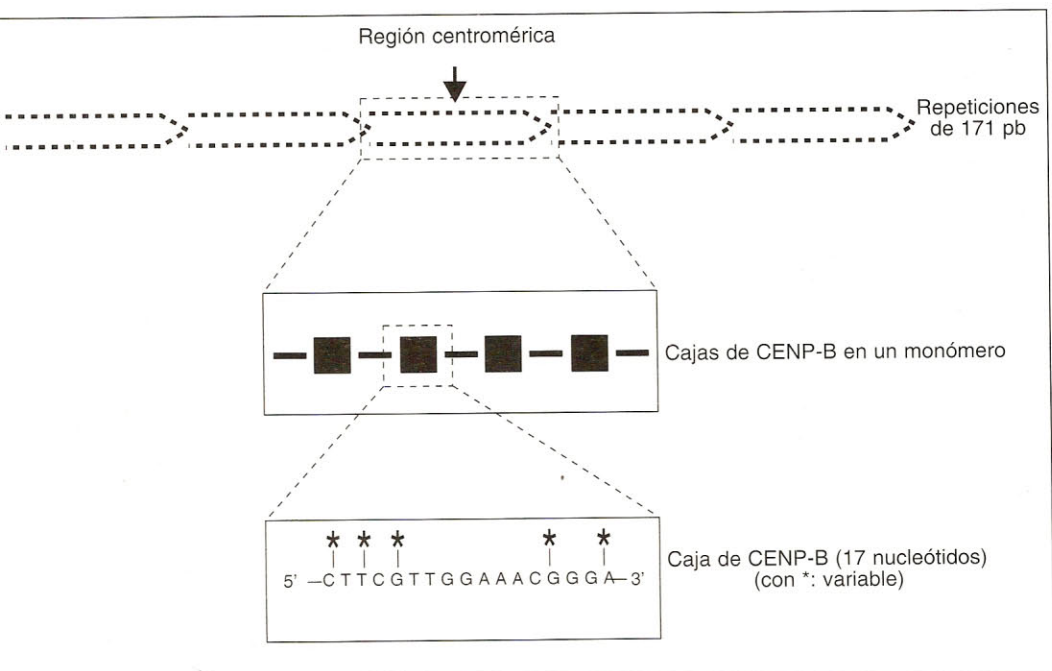
El ADN en la región centromérica está asociado con proteínas específicas. Estas proteínas han podido estudiarse gracias al descubrimiento de anticuerpos contra ellas en enfermos que padecen la forma "CREST" (de calcinosis, fenómeno de Raynaud, disfgia esofágica, esclerodactilia y telangiectasia) de esclerodermia. 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"<sup>12</sup> (cuadro 3-4).

La región centromérica, en general, comprende el centrómero propiamente dicho, o constricción primaria, que es una región estre-

chada 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. 3-16). 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



**Fig. 3-15.** Organización del ADN alfoide en los centrómeros humanos.

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.

### 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 he-

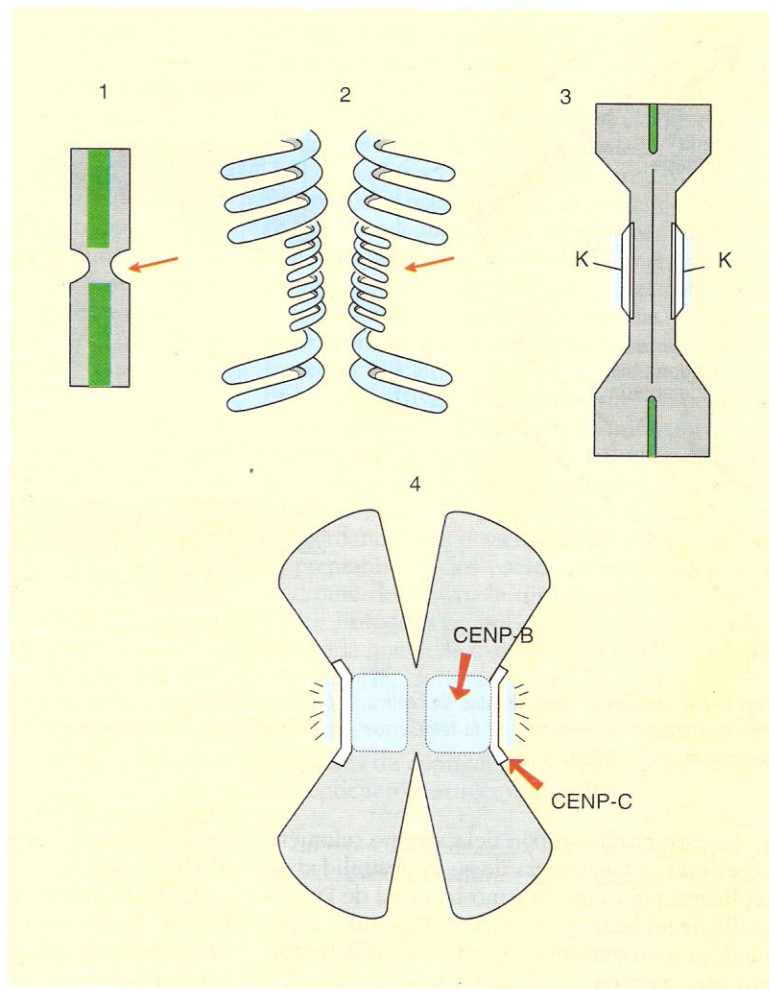
xanucleótido TTAGGG, hasta formar conjuntos de longitud variable, de un promedio de 10 kb (1.600 monómeros),<sup>14</sup> aunque en células de placenta puede ser de 20 kb. La longitud de las repeticiones teloméricas ha cobrado reciente interés por su relación con el envejecimiento y el daño celular (véase 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. 3-17).

### Cuadro 3-4. Proteínas centroméricas

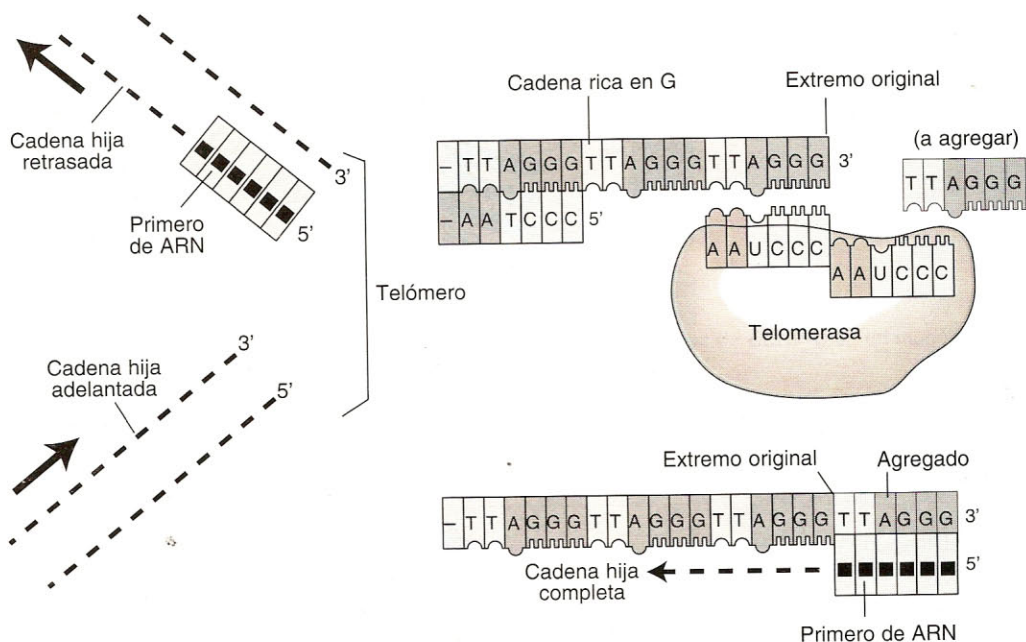
Nombre	Peso molecular (10 <sup>3</sup> Da)	Localización	Características
CENP-A	17	Centrómero, general	Variante de histona H3
CENP-B	80	Región central	Se asocia al ADN alfoide por la "caja" de 17 pb
CENP-C	107	Placa interna del cinetocoro <sup>13</sup>	Presente sólo en cinetocoros activos
CENP-D	47	Cinetocoro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



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



**Fig. 3-17.** 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 (o cuádruple) hélice.



**Fig. 3-18.** 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.

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 primer de ARN necesario para sintetizar los últimos nucleótidos de la cadena hija que termina en 5' y que debe avanzar en sentido 5' a 3' en esta cadena (la retrasada) (fig. 3-18).

La replicación del extremo telomérico del ADN se hace por un mecanismo especial que involucra una enzima denominada "telomerasa". Aunque esta enzima no está aislada y purificada, 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 primer para elongar esa cadena rica en G. Esa elongación permite colocar un primer de ARN

para sintetizar la cadena hija que termina en 5' (fig. 3-18).

El ADN telomérico está asociado con proteínas que lo reconocen en forma específica. Se piensa que estas proteínas protegen el sobrepunto de la cadena rica en G de un posible ataque de nucleasas y modificadores químicos.<sup>14</sup> Por otra parte, hay evidencia de que los telómeros se asocian a la lámina nuclear interna.<sup>15</sup>

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,<sup>16</sup> 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 transpone cerca del gen pero fuera de un extremo cromosómico.<sup>14</sup>



## Telómeros y envejecimiento celular

Datos recientes han acumulado evidencias en organismos inferiores y en células humanas, acerca de una relación entre la magnitud de los segmentos teloméricos y la presencia de signos de envejecimiento celular o senilidad celular.<sup>17</sup>

La longitud de las secuencias teloméricas está regulada por genes en la levadura y posiblemente en los demás eucariontes ocurra 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 disminución 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 poseerían una actividad permanente de la telomerasa. Recientemente, 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  $41 \pm 7,7$  pb por año.<sup>18</sup> Además, y en concordancia con el ya conocido envejecimiento prematuro de los pacientes afectados por el síndrome de Down, la disminución telomérica en los linfocitos de estos pacientes es más pronunciada que la de los controles ( $133 \pm 15$  pb por año) (fig. 3-19) (véase panel 3-1).

### Orígenes de replicación y secuencias de replicación autónoma (SRA)

La replicación del ADN en las células humanas y de otros organismos está controlada por me-

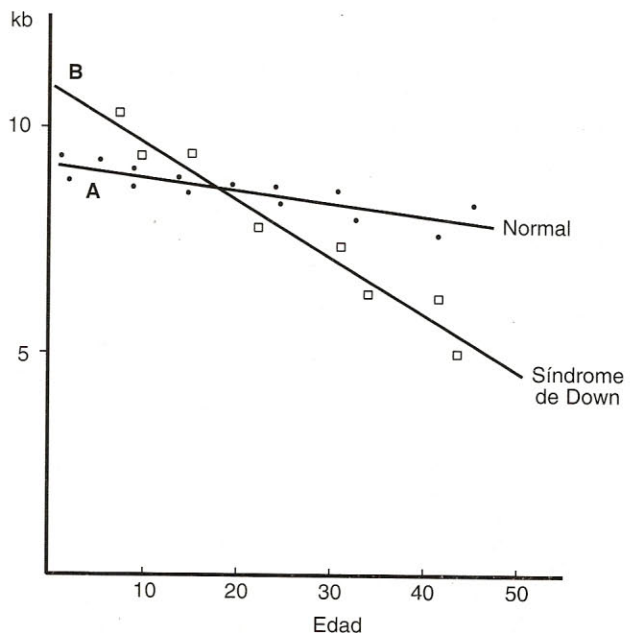
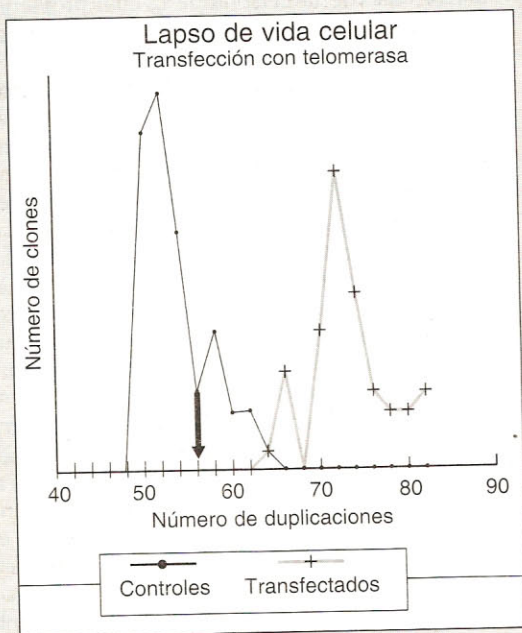


Fig. 3-19. Longitud decreciente de los telómeros de linfocitos de personas normales de edad creciente (A) y mayor tasa de disminución en linfocitos de pacientes con el síndrome de Down (B). Datos de Vaziri y col., 1993.





**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 3-1. 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*.<sup>19</sup> 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 alrededor de 560 nucleótidos.<sup>20</sup> 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.<sup>20</sup> 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*.<sup>20</sup> Recientemente, 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.<sup>21</sup> 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 recientemente.<sup>22</sup> 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). Recientemente<sup>22</sup> 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. Se hizo entonces la comparación entre las células que no recibieron la telomerasa (controles) y aquellas que sí la recibieron (transfectadas) y que expresaban (producían la proteína) la telomerasa (Figura de Panel). 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 actualmente dividiéndose y llegan a 100 divisiones, y parecen poseer un potencial de división indefinido). Más aun, 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.<sup>22</sup>



canismos muy precisos. Cada cromosoma humano posee muchos puntos que pueden iniciar 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. 2); 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 han analizado más en la levadura, donde se han realizado importantes descubrimientos.<sup>23</sup> 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 in 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 proteínicos del tipo de los COR, que en ciertas circunstancias patológicas pueden alterar su funcionamiento. Así, se conocen con el nombre de "*diminutos dobles*" a 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 replications, 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. 4).

## 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 cromáti-



das hermanas de un cromosoma metafásico. La información genética se halla en las secuencias de sus bases a lo largo de las dos hélices derechas que forman esta molécula. 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 halla principalmente el ADN alfoide y las proteínas centroméricas (CENP). En los telómeros se hallan las repeticiones del hexanucleótido TTAGGG (que disminuyen 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

- Dickerson RE. The DNA helix and how it is read. *Sci American* 1983; 249:86-102.
- Solari AJ. Electron microscopy of DNA in sea urchin cells. *J Ultrastructure Res* 1967; 17:421-438.
- Coggins LW. Denaturation and hybridization of nucleic acids. En: "Electron Microscopy in Molecular Biology", Oxford: Ed. J. Somerville and U. Scheer, IRL Press, 1987, pp. 31-60.
- Bauer WR, Crick FH, White JH. ADN superenrollado. *Investigación y Ciencia* 1980; N° 48:78-89.
- Bauer WR. Structure and reactions of closed duplex DNA. *Ann Rev Biophys Bioengineer* 1978; 7:287-313.
- Van Holde K, Zlatanova J. Unusual DNA structures, chromatin and transcription. *BioEssays* 1994; 16: 59-68.
- Wetmur JG, Davidson N. Kinetics of renaturation of DNA. *J Mol Biol* 1968; 31:349-370.
- Tyler-Smith C, Willard HF. Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genetics & Develop* 1993; 3:390-397.
- Dombrowski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, Scott AF, Kazanian HH. Isolation of an active human transposable element. *Science* 1991; 254:1805-1808.
- 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.
- 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.
- Willard HF. Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends in Genet* 1990; 6:410-416.
- Saitoh H, Tomkiel J, Cooke CA, Rattie H, Maurer M, Rothfield NF, Earnshaw WC. CENPC, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell* 1992; 70:115-125.
- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350:569-573.
- de Lange T. Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J* 1992; 11:717-724.
- Brown WR, Dobson MJ, MacKinnon P. Telomere cloning and mammalian chromosome analysis. *J Cell Sci* 1990; 95:521-526.
- Broccoli D, Cooke H. Aging, healing and the metabolism of telomeres. *Am J Hum Genet* 1993; 52:657-660.
- 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.
- Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214:99-106.
- Morin GB. The structure and properties of mammalian telomerase and their potential impact on human disease. *Sem Cell & Devel Biology* 1996; 7:5-13.
- Marcand S, Gilson E, Shore D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 1997; 275:986-990.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichstein S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279:349-352.
- 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*. Oxford University Press, UK, 1994.
- Micklos DA, Freyer GA. *DNA Science. A first course in recombinant DNA technology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.



## INFORMACIÓN GENÉTICA

**Información. Códigos. Codones. Definiciones de gen. Estructura del gen. Secuenciación del ADN. Mapas genéticos. Transcripción de la información.**

### 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 23 Angstrom de espesor (2,3 nm), 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 transcripible 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. 4-1).

Esta información genética transcripible se define como la información que codifica cuáles proteínas (dentro de muchísimas posibles) ha de 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

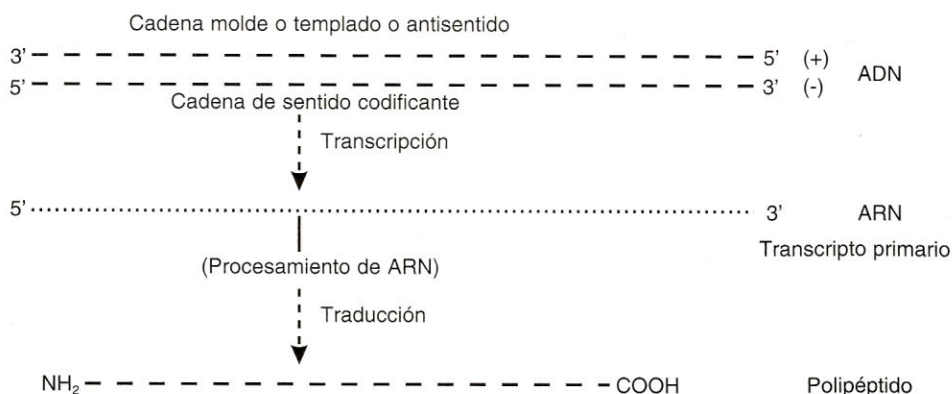
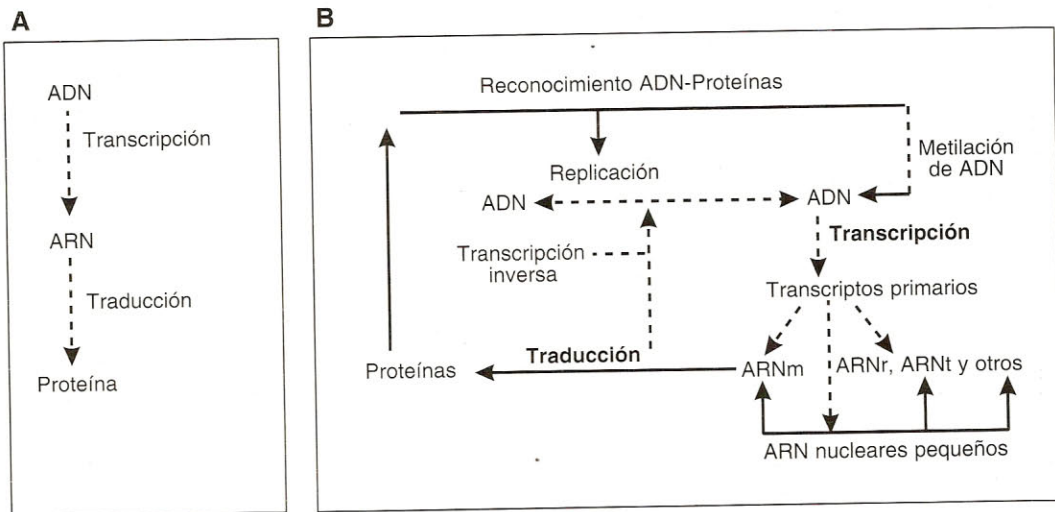


Fig. 4-1. Esquema de la transferencia usual de información génica.



**Fig. 4-2.** Circuitos de información genética en la célula. A la izquierda, versión simplificada 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.

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 genéticas: por ejemplo, la estructura molecular de las membranas o la posición espacial de las cisternas de RE o de la membrana citoplasmática u otros compartimientos, 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 transcribible usualmente 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 indican secuencias en proteínas sino que tienen funciones por sí mismos, y que constituyen una parte *no traducible* de la información genética transcripcional (fig. 4-2).

El concepto de información genética está vinculado, por un lado, al tema de la evolución de los seres vivos,<sup>1</sup> 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.<sup>1</sup> De esa manera se ha eliminado una clásica paradoja: si el ADN es el poseedor original de la información genética, ¿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),<sup>2</sup> 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 ARNs 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 biológicos más primitivos que contuvieron información genética, al comienzo de la evolución biológica sobre la Tierra, en el denominado "mundo del ARN".<sup>1</sup>

## 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 matemáticas, 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 matemáticas, la probabilidad *compuesta* de que ocurran dos sucesos que son independientes entre sí es igual al producto de las dos probabilidades (aisladas). Así, la probabilidad de que al tirar dos dados salga un 1 y un 4 (en

ese orden) es de  $1/6 \cdot 1/6 = 1/36$ . Para que la equivalencia entre probabilidades (inversas) e información sea coherente, las unidades de medida de la información deben respetar esta propiedad de las probabilidades; pero al mismo tiempo, debe satisfacer 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. Dado que la función logarítmica permite transformar los productos en sumas, se ha tomado a los logaritmos de las probabilidades inversas como unidad de información. De manera correspondiente a las probabilidades compuestas, que en matemáticas son el producto de las probabilidades simples para sucesos independientes, la información compuesta de varios mensajes es la *suma* de las informaciones simples:  $I = \sum I_i$  y, por consiguiente, la escala de informaciones es logarítmica respecto de la escala de probabilidades; dicho de otra manera, si se quiere medir la información en términos de probabilidades, se usa el logaritmo de la inversa de la probabilidad:

Contenido informativo total:

$$H = k \sum P_i \ln 1/P_i$$

Esta fórmula se simplifica a:

$$I = k \ln 1/P_i$$

cuando todos los componentes  $i$  son iguales y  $\sum_i 1 = 1$  (certeza).

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.<sup>3</sup>

Para medir contenidos de información es común usar *bits* o unidades de códigos binarios. Dado que los números binarios se pueden representar por potencias de 2, la fórmula de contenido informativo se transforma en  $I = K \log_2 n$ , donde  $n$  es el número de señales diferentes posibles (para una correcta). De esa manera se ha estimado que una célula germinal contiene una información genética de

$10^{12}$  bits (Holzmüller, 1984).<sup>3</sup> 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, mostrando que los aminoácidos están representados por tripletes de bases.<sup>4</sup> 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. 4-3).

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, cuádrupletes 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

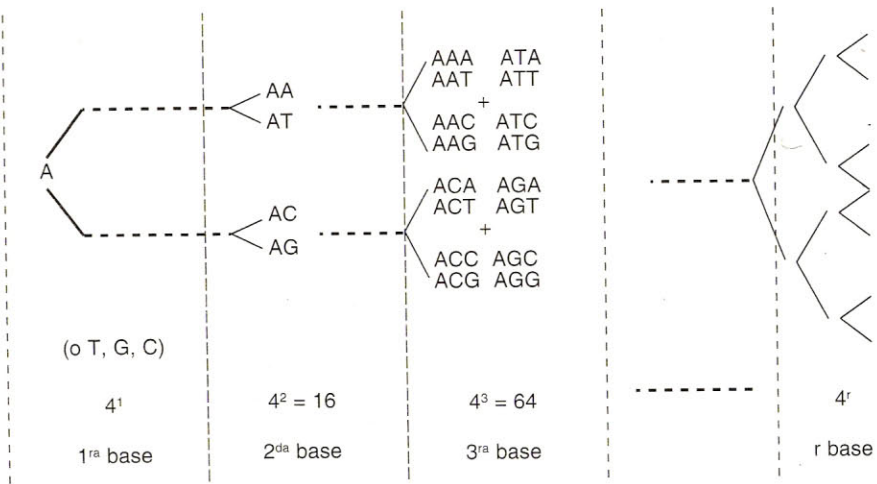


Fig. 4-3. Esquema de tipo "árbol" para las permutaciones posibles de bases.



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

Fig. 4-4. Código genético. Las posiciones señaladas con asterisco son diferentes en el código mitocondrial.<sup>4</sup>

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<sup>50</sup> 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 invalida todo el grupo de 50; en cambio, si son grupos de cinco letras —cada uno con significado— se pueden codificar 24<sup>5</sup>, 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 inevitable de error.

## 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. 4-4). Un codón es reconocido por un *anticodón*, secuen-

cia de tres bases del ARNt, que por un extremo se une específicamente al aminoácido codificado por el codón. Obsérvese que, en el ADN, hay secuencias que son complementarias al codón (que son las transcriptas y pertenecen a una de las dos cadenas, la positiva) y secuencias idénticas (salvo U - T), que no son transcriptas, en la cadena negativa. La transferencia de información se hace del modo que muestra la figura 4-5.

Hay un paso, poco 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. 4-6).

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, véase más adelante). Por otra parte, los códigos imbricados determinan ciertas limitaciones a las

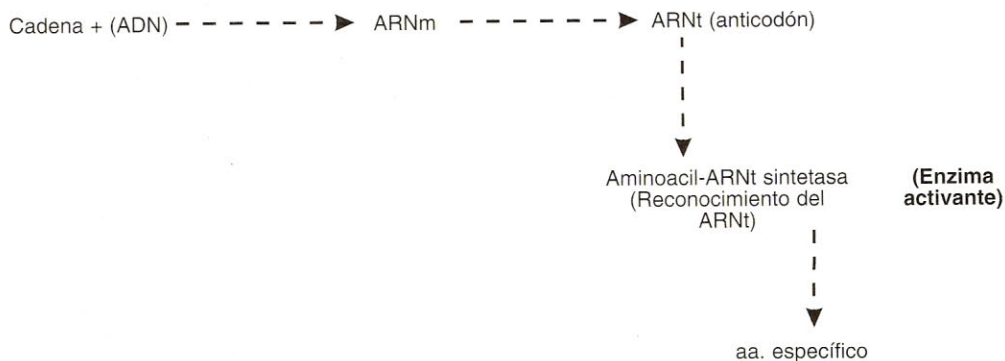


Fig. 4-5. Transferencia de información.

posibles secuencias de aminoácidos: a un aminoácido codificado por AAA en el caso 3) de la figura 4-6, 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 es debido 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*.

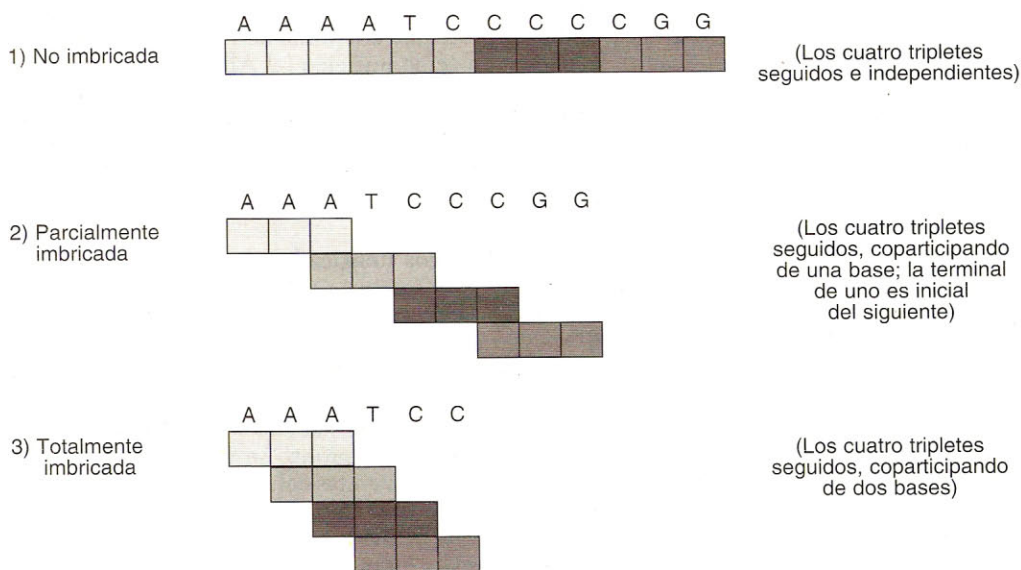


Fig. 4-6. Esquema de las tres disposiciones de secuencias de tripletes.



## Marco de lectura

Una secuencia de 12 bases: ATCATCATCATC 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. 4-7), 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 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 ("Ahora Úsese Gen"), que también es el

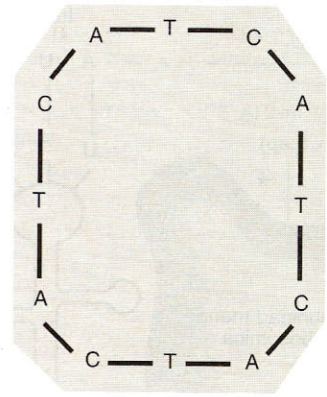


Fig. 4-7. Secuencia circular de bases de ADN.

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 al 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": 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 dife-

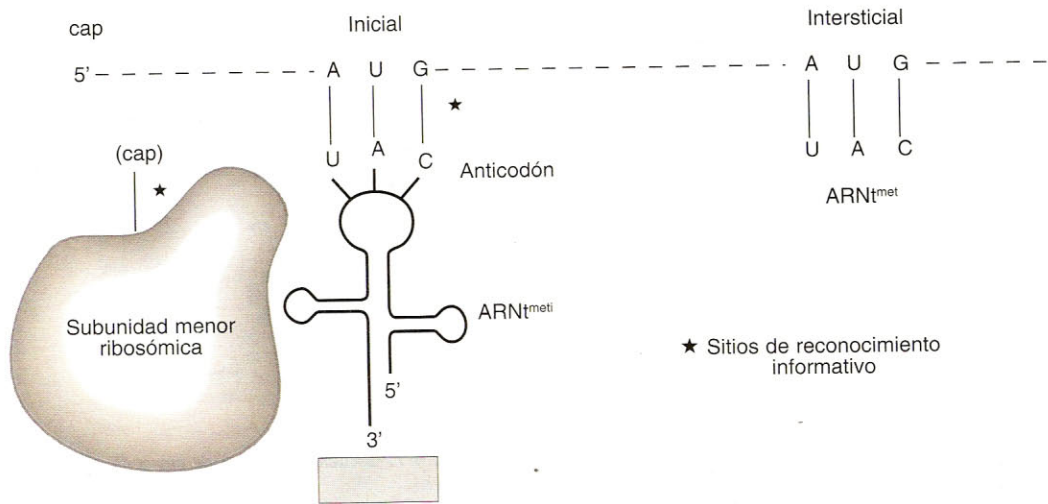


Fig. 4-8. Esquema del reconocimiento del marco de lectura en el ARNm de eucariontes.

rente del ARNt que carga a la metionina interstial:  $\text{ARNt}^{\text{meti}}$  y  $\text{ARNt}^{\text{met}}$  (fig. 4-8).

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, de proteína):

UAA ("ocre") ("Útese A Acabar")  
 UAG ("ámbar") ("Útese Acabar Gen")  
 UGA ("ópalo") ("Útese Gen Acabar")

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

Los codones de terminación son reconocidos por proteínas ( $R_1$ ,  $R_2$ , factores de liberación) que interrumpen la síntesis de proteína.

#### EJEMPLO FORMAL:

wxyzcsctacclcsecrcsucltcmascacracct-civcaccuacndcoscepcnceactecnciocnecinc-trecsmnop

El mensaje se decodifica eliminando las "señales" de iniciación (wxyz) y terminación (mnop) y una de cada tres letras, empezando por la primera (c) después de la señal de iniciación y hasta la de terminación. El ejemplo —no muy equivalente al biológico— agrega "cifrado".

### 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 usan 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 ("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 la 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 trifóforo tienen un solo codón.

Pero estos "sinónimos" no son aleatorios, verdaderamente son del todo equivalentes. Los sinónimos están contruidos 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.



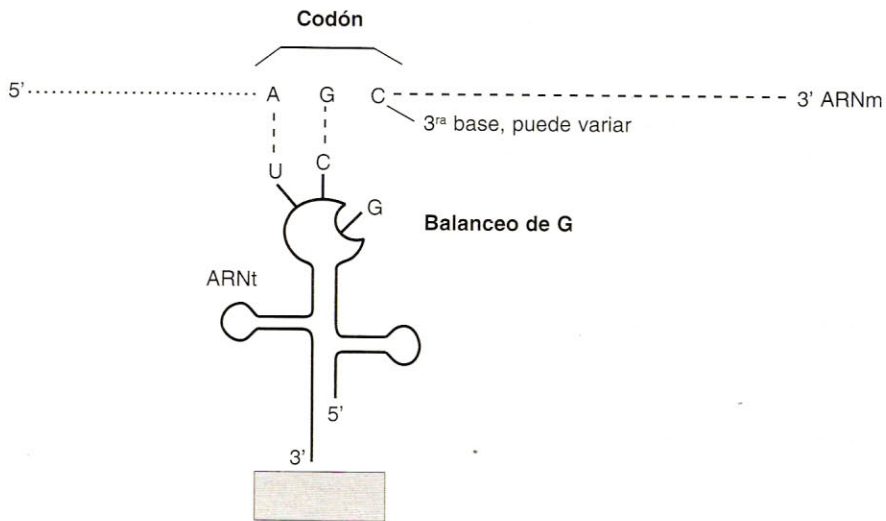


Fig. 4-9. Esquema del "balanceo" de la primera base del anticodón.

## 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 al 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 muchos otros organismos hay más de los 31 que teóricamente son suficientes para acoplarse a todos los codones.

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. 4-9).

Así se puede conformar un cuadro de reglas de asociación (cuadro 4-1).

La redundancia de los codones no altera la especificidad, ya que todos los ARNt que reconocen varios codones, reconocen *sinónimos*. Fi-

nalmente, la especificidad para el aminoácido (aa.) depende de la enzima activante.

## 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 proteína 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

**Cuadro 4-1.** 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

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 recién comienza (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". Por consiguiente, al tener una secuencia de bases de un segmento de ADN es probable que se "lea basura", 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 gran importancia porque son fácilmente adaptables a un programa de computación; de esa manera, teniendo una secuencia, la computadora puede buscar las "palabras" y aun traducirlas, de acuerdo con las reglas del lenguaje.<sup>5</sup>

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.<sup>6</sup>

Se necesitan varios de estos programas o autómatas: uno, primero, para detectar la señal que indica la iniciación de un gen (en procariotes 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 códon 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 negativa es ATG (en la + es TAC, pero por convención siempre se representa la cadena negativa únicamente). La presencia de cualquiera de los tres tripletes de terminación (en el ADN, cadena -: TAA o TAA o TGA "cierra" la lectura); para que un segmento de ADN sea considerado codificante debe tener el marco "abierto" de lectura (MAR = ORF en inglés) por una distancia significativa, como para codificar un cierto número de aminoácidos.

## 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. 8), 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 estas unidades codifiquen proteínas, aunque muy frecuentemente sea así, porque un número de unidades de transcripción codifican ARNs que no traducen en proteína sino que son "estructurales" o "reguladores": los ARN ribosómicos y los de transferencia son un ejemplo; los ARN "nucleares pequeños" (ARNnp = snRN) que intervienen en el procesamiento del ARN transcrito original, llamados U<sub>1</sub>-U<sub>6</sub> son otro ejemplo; el producto del gen XI<sup>h</sup> (véase cap. 8) es otro más. Por otra parte, hay una relación clara y única entre la definición tradicional y la definición molecular. Así, varias mutaciones de un "gen" (definido como segmento de ADN) pueden determinar cambios fenotípicos diferentes, tales como variantes graves y leves de una enfermedad (véase cap. 5), o aun enfermedades diferentes (como las diversas mutaciones del RA: receptor de andrógenos, que pro-



can feminización testicular o atrofia muscular espinobulbar).

Tampoco la definición molecular está libre de imprecisiones.<sup>7</sup> La presencia de unidades de transcripción, insertadas dentro de intrones en algunos casos, parece indicar la presencia de genes anidados uno dentro de otro.<sup>8</sup> Por otra parte, el procesamiento (empalme) alternativo de ARNs 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: gen sería aquel segmento de ADN que contiene una unidad de transcripción que puede ser traducida en una o varias secuencias polipeptídicas.<sup>7</sup> 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.

### Número de genes en el genoma humano

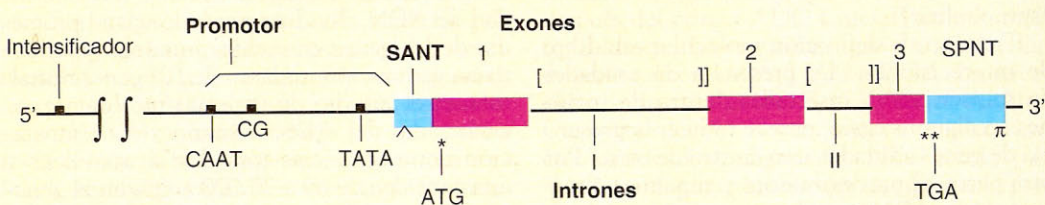
El número de genes del genoma humano no es conocido con precisión.<sup>7,9</sup> Sin embargo, se han realizado estimaciones basadas en diversas hipótesis, que dan resultados en parte coincidentes: el número de genes del genoma humano fluctuaría entre 40.000 y 100.000,<sup>9</sup> siendo la cifra más probable la de 70.000 genes (definidos como en el párrafo anterior). Un tipo antiguo de estimaciones del número de genes se basa en el concepto de carga mutacional (véase también cap. 5). Las mutaciones que no son estrictamente neutras (polimorfismos) y que producen algún deterioro o desajuste, se suman para constituir la *carga mutacional* total promedio en la especie humana. Si se acepta que la tasa promedio de incidencia de nuevas mutaciones por generación y por "locus" (gen) oscila alrededor de  $10^{(-5)}$  (cap. 5), 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 tipo 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 llega a

un porcentaje del 5% del ADN.<sup>9</sup> Esta cantidad de ADN, dividida por la longitud promedio de los genes conocidos, también conduce a una estimación máxima de  $10^5$  genes. Finalmente, el estudio de regiones totalmente secuenciadas del ADN humano y su comparación con secuencias tomadas al azar lleva a una cantidad de 60 a 70.000 genes en el genoma humano.<sup>7</sup> Esta cantidad significa que hay en promedio un gen cada 40-50 kb de ADN humano. Un indicador útil para la detección de muchos de los genes es la presencia de las *islas CpG* (Citosina-fosfato-Guanina),<sup>10</sup> también llamadas HTF (por *HpaII* tiny fragments, por ser cortadas en segmentos pequeños por la citada enzima de restricción), que son secuencias con cantidades esperables en la frecuencia del dinucleótido CG (el resto del genoma está empobrecido de este dinucleótido), con la citosina libre de metilación, y de alrededor de 1-2 kb de extensión, que se encuentran generalmente previas a la región inicial (5') de un gen (no todos los genes tienen "islas CpG" asociadas; son más frecuentes en los genes de "mantenimiento" o de función continuada). Una estimación del número de islas en el genoma humano es de 45.000; y, estimando que  $\frac{2}{3}$  de los genes humanos tienen islas asociadas, se llega a una cifra total de genes parecida a la citada anteriormente.

### Esquema general de un gen humano

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. 4-10).





**Fig. 4-10.** 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 ( $\pi$ ), 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 transcrito) y uno de los de terminación (TGA = UGA en transcrito) 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 transcrito) se señala con un acento circunflejo (^). Por convención, siempre se representa la cadena negativa o "de sentido" del ADN.

## 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 identificar y localizar todos los genes situados en ese cromosoma, conocer su estructura y hasta predecir qué polipéptido codifica cada gen. Se identifica un gen 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 al 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. 8), es decir, se lo sitúa en un "mapa físico" o mapa de secuencias de bases; se conoce su 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; y finalmente, de las secuencias de los exones se deduce, hasta cierto punto, qué polipéptidos codifi-

ca 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 transcripción 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. 3), 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 es el principal objetivo del "Proyecto del Genoma Humano", iniciado en 1988 en los Estados Unidos. Desde el año 1995 se encuentra en una etapa intermedia, existiendo ya un número considerable de regiones (cada una de ellas pequeña) totalmente secuenciadas en muchos cromosomas humanos, por lo que se considera que en un plazo de dos a cinco años se poseerá 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 Y<sup>11</sup> (véase panel 4-1).



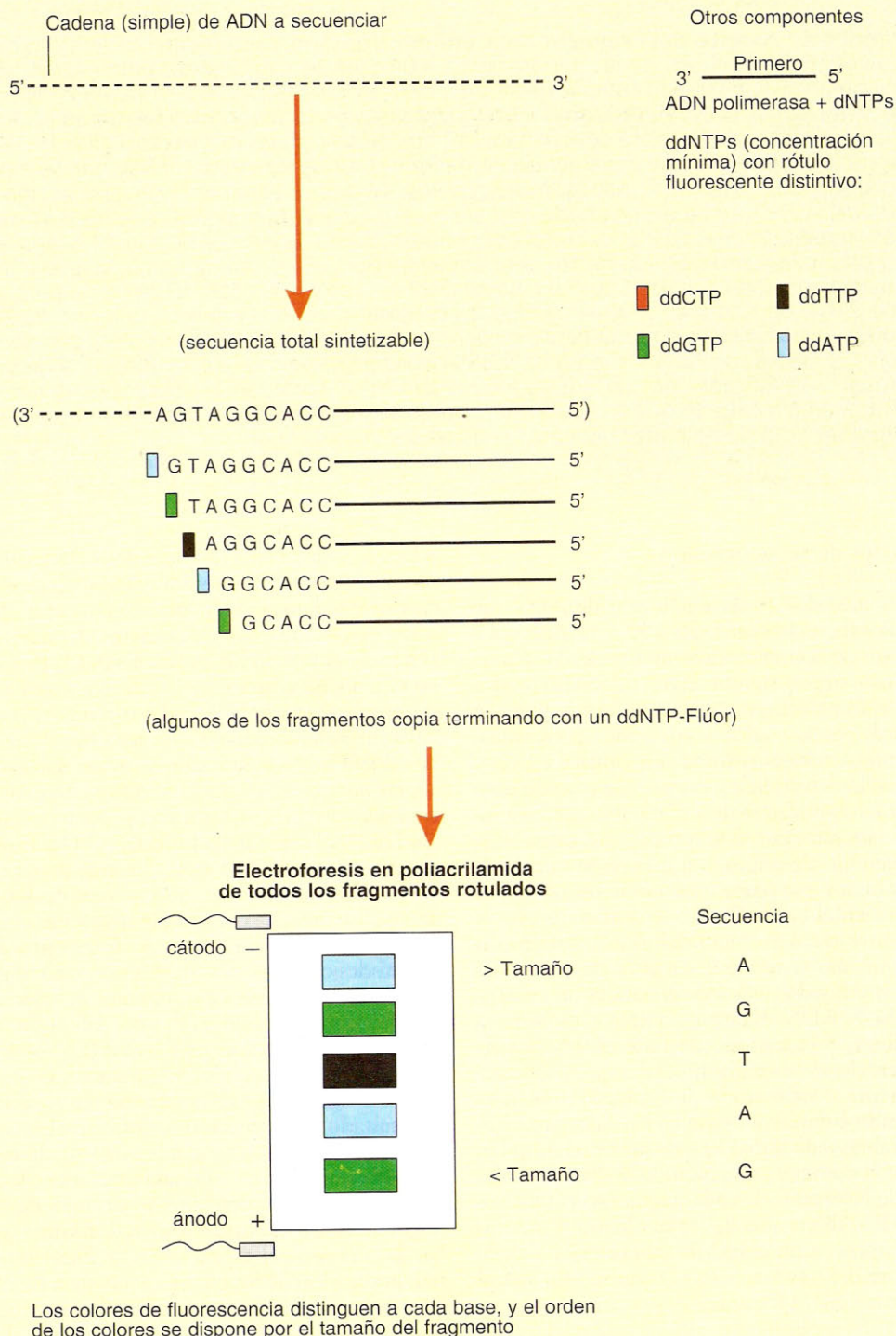
**Panel 4-1. Avance del Proyecto del Genoma Humano.** Recientemente se ha volcado el énfasis en el uso de las genotecas de ADNc (véase cap. 2) para el mapeado del genoma. Se han elegido fragmentos cortos del ADNc de genes, en especial de las secuencias posteriores no traducidas (SPNT, véase el párrafo 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 han identificado 16.354 genes —alrededor de un 20% del total del genoma— hasta 1996.<sup>12</sup> Si bien el ADN humano totalmente secuenciado hasta 1996 era alrededor del 1% del genoma, se proyecta que estarán secuenciadas 500 megabases (Mb) en 1999, y el total del genoma para el año 2005. En tanto, es de gran utilidad la comparación con el primer organismo eucariote cuyo ADN ha sido totalmente secuenciado, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, 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.<sup>13</sup>

## Métodos de secuenciación

Los métodos de secuenciación de ADN son costosos (actualmente U\$S 0,30 por base)<sup>11</sup> y los aparatos de secuenciación automatizada requieren inversiones significativas (U\$S 100.000 o más) y también mucho tiempo de dedicación técnica, por lo cual la secuenciación en cantidad importante es realizada en centros especializados; la determinación de secuencias de unas pocas kilobases se realiza 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, 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, siendo este último el que prevalece actualmente.<sup>14</sup> 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. 2), 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 a 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 primer complementario a una corta secuencia del ADN a 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. 4-11); 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 parcialmente, de tal modo que se ha llegado a secuenciar 10.000 bases por día, mientras manualmente sólo se secuencian un par de centenares de bases por día.



**Fig. 4-11.** Esquema del fundamento del método de Sanger para secuenciación de ADN. Los colores de fluorescencia son detectados por aparatos automatizados conectados a una computadora, en la cual un programa determina la identidad de cada uno y escribe la secuencia.



## Mapas "físicos" de un segmento cromosómico

Hay dos tipos principales de mapeado del genoma humano: los mapas de ligamiento o genéticos (véase cap. 8), contruidos sobre la base de las frecuencias de recombinación entre genes, y cuyas unidades son centimorgans (cM); y mapas "físicos", contruidos 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 actuales 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. 4-12).

Los mapas físicos se realizan con fragmentos de ADN clonados en un vector (véase cap. 2). 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 restricción 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. 2). 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. 2) con la secuenciación. Los SRSC son segmentos cortos (de centenares de pb) de secuencias únicas de ADN genómico que han sido secuenciadas to-

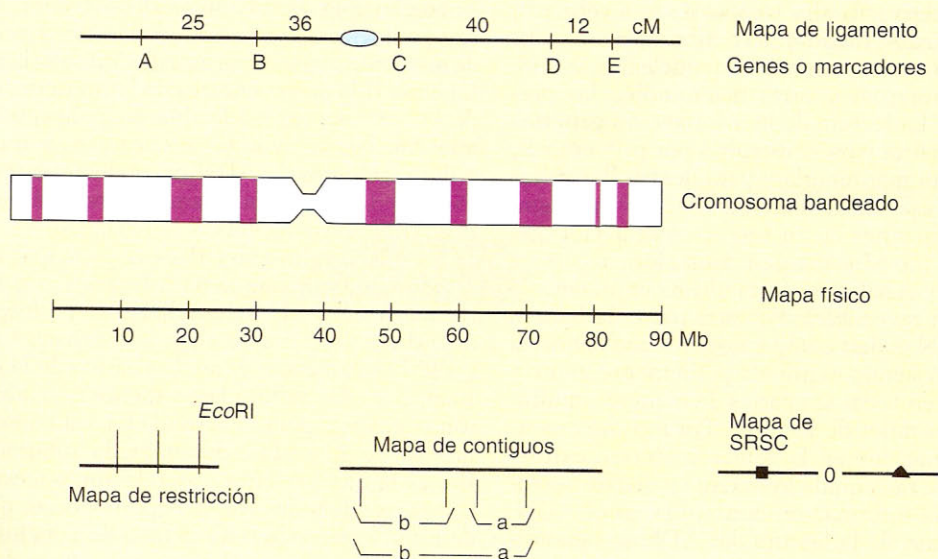


Fig. 4-12. Esquema de los tipos de mapeo del genoma humano.

talmente y que contienen algunas secuencias de 15-20 pb que pueden servir de primeros para la RCP, usando el ADN humano total como template, 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 una computadora, leyendo la información genética en el ADN de acuerdo con instrucciones simples (en una computadora, 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*,<sup>15</sup> y es extraordinariamente sofisticado, abarcando como mínimo dos docenas de proteínas (incluida la ARN polimerasa), y en su forma funcional,

abarca unas cincuenta proteínas (véase más adelante).

Por otra parte, el propio material genético puede estar en diferentes estados de legibilidad, dados por los factores "*arquitectónicos*" de *transcripción*.<sup>16</sup> 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, compartimientos separados por la carioteca y con funciones muy diferentes. En el compartimiento 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 4-2). La ARN pol II también transcribe varios ARN no traducibles (U1-U5).

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.<sup>17</sup>



# Cuadro 4-2. ARN polimerasas y sus productos

Tipo	Tamaño (kDa)	Localización	Sensibilidad (a $\alpha$ -amanitina)	Producto
I	~ 500.000	Nucléolo	No	ARN 45S (Pre-ribosómico)
II	> 500.000	Nucleoplasma	+++	ARNhn, $5 \times 10^4$ tipos
III	~ 500.000	Nucleoplasma	+	ARNnp, $10^3$ tipos

ARNhn: ARN heterogéneo, nuclear.

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

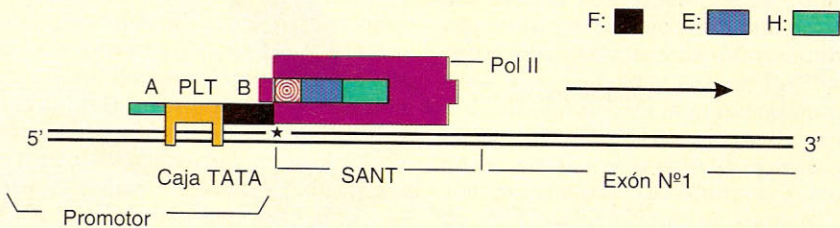
## Estructura del complejo de transcripción: complejos de transcripción basal y funcional

Para leer la información genética de los genes humanos es necesaria la organización de un complejo que comprende unas 50 proteínas diferentes,<sup>18</sup> 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”.<sup>19</sup> Aparte de la formación de asociaciones proteínicas u holoenzimas, la vía más general utilizada en las células humanas para construir el aparato transcripcional es la existencia de dos nive-

les 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”.<sup>18</sup>

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. 4-13).



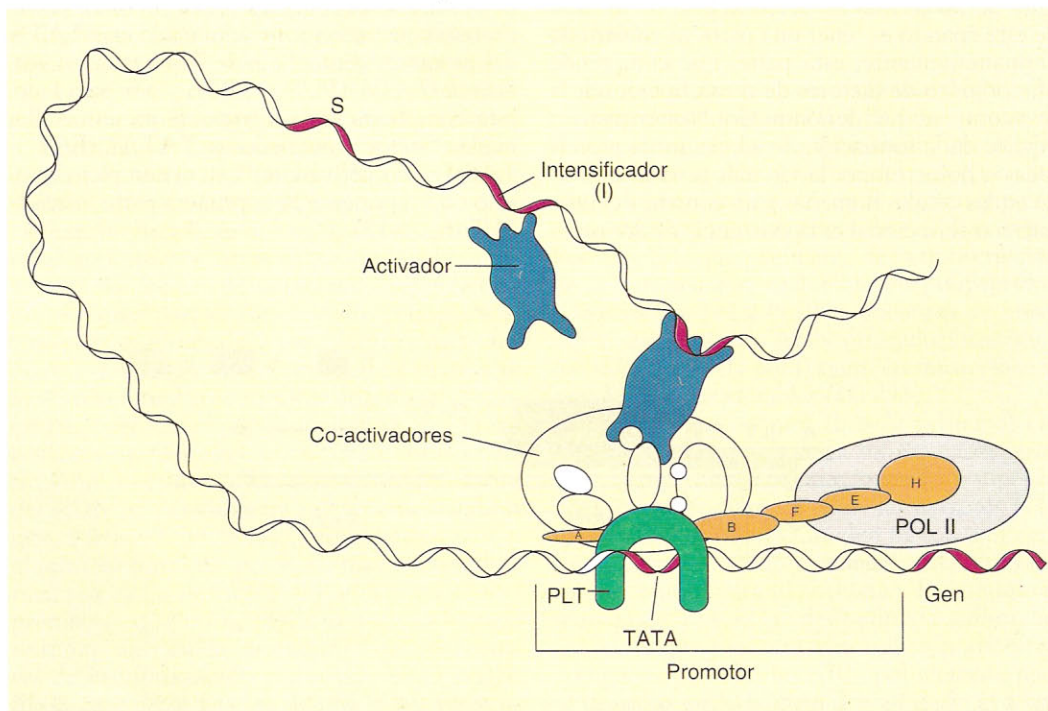
**Fig. 4-13.** Esquema de la máquina lectora mínima de información del ADN: el complejo de transcripción basal. El sitio de comienzo del transcripto (sitio de la caperuza o nucleótido +1) está señalado por un asterisco. Los factores de transcripción están señalados por su letra (FTIIA; FTIIB; FTIIE; FTIIF; 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.

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 fac-

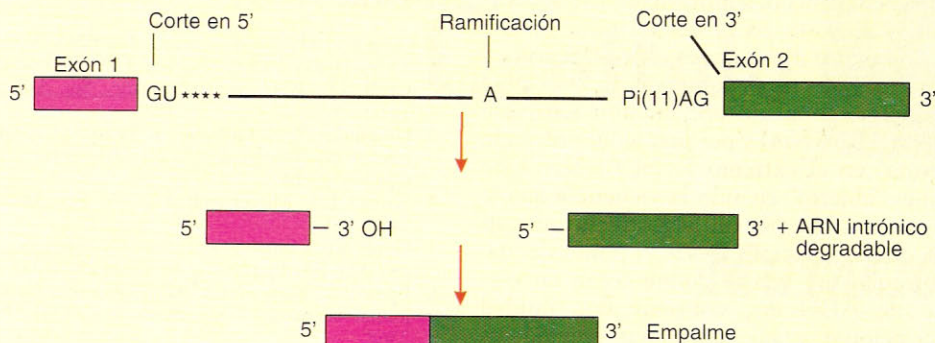
tor F consta de dos subunidades, de las cuales la menor tiene elevada afinidad y se une a la Pol II. El factor E es un tetramero de 2 polipéptidos, que se une al factor H. Este último tiene actividad fosforilante y además, por su actividad de helicasa, interviene en la actividad reparadora de ADN asociada con la transcripción;<sup>20</sup> como tal tiene relación con el síndrome de Cockayne y el xeroderma pigmentoso (véase cap. 5).

El complejo de transcripción funcional es el que se presume presente *in vivo* (fig. 4-14). En este complejo, la maquinaria de lectura está 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 (fig. 4-14). Este mecanismo está, además, de acuerdo con los datos que indican que la for-



**Fig. 4-14.** 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.<sup>18</sup>





**Fig. 4-15.** 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 AAGT, reconocible por el empalmosoma, que si es mutada afecta el procesamiento.

ma 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 transcrito 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. 4-15).

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.

### 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 transcribible (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 antio-

dón, 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 y sus secuencias reguladoras próximas. En la especie humana se calcula que hay 70.000 genes. 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 1988, 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 50 proteínas, incluyendo 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. Gesteland RF, Atkins JF (eds.). The RNA World. Cold Spring Harbor Laboratory Press, C. S. Harbor, 1993.
2. Cech TR. RNA as an enzyme. *Sci Amer* 1986; 253:51-59.
3. Holzmüller W. Information in biological systems: the role of macromolecules. Cambridge University Press, Cambridge, 1984.
4. Grivell LA. Mitochondrial DNA. *Sci Amer* 1986; 254:60-73.
5. Goad WB. Computational analysis of genetic sequences. *Ann Rev Biophys Chem* 1986; 15:79-95.
6. Brendel V, Busse HG. Genome structure described by formal languages. *Nucl Acids Res*, 1984; 12:2561-2568.
7. Fields C, Adams MD, White O, Craig Venter J. How many genes in the human genome? *Nature Genetics* 1994; 7:345-346.
8. Levinson B, Kenwick S, Lakich D, Hamonds G Jr, Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 1990; 7:1-11.
9. Craig IW. Organization of the human genome. *J Inher Metab Dis* 1994; 17:391-402.
10. Bird AP. CpG island as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends in Genetics* 1987; 3:342-347.
11. Marshall E. Human Genome project: Emphasis turns from mapping to large-scale sequencing. *Science* 1990; 268:1270-1271.
12. Schuler GD et al. A gene map of the human genome. *Science* 1996; 274:540-546.
13. Goffeau A et al. Life with 6.000 genes. *Science* 1996; 274:546-567.
14. Smith LM. Automated DNA sequencing and the analysis of the human genome. *Genome* 1989; 31:921-937.
15. Buratowski S. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 1994; 77:1-3.
16. Wolffe AP. Architectural transcription factors. *Science* 1994; 264:1100-1101.
17. Corden JL. RNA polymerase II transcription cycle. *Current Opinion in Genetics and Development* 1994; 3:213-218.
18. Tjian R. Molecular machines that control genes. *Science* 1995; 272:38-45.
19. Carey M. Transcription: simplifying the complex. *Nature* 1994; 368:402-403.
20. Buratowski S. DNA repair and transcription: the helix case connection. *Science* 1993; 260:37-38.



## 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.***

### 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 primers específicos.

Los cambios *cromosómicos*, que a veces han sido denominados “mutaciones cromosómicas”, tienen nombres específicos: cambios numéricos (aneuploidias) y reordenamientos o rearrreglos 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 tales como las microdeleciones<sup>1</sup> y las translocaciones crípticas<sup>2</sup> 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).

### Tipos de mutaciones

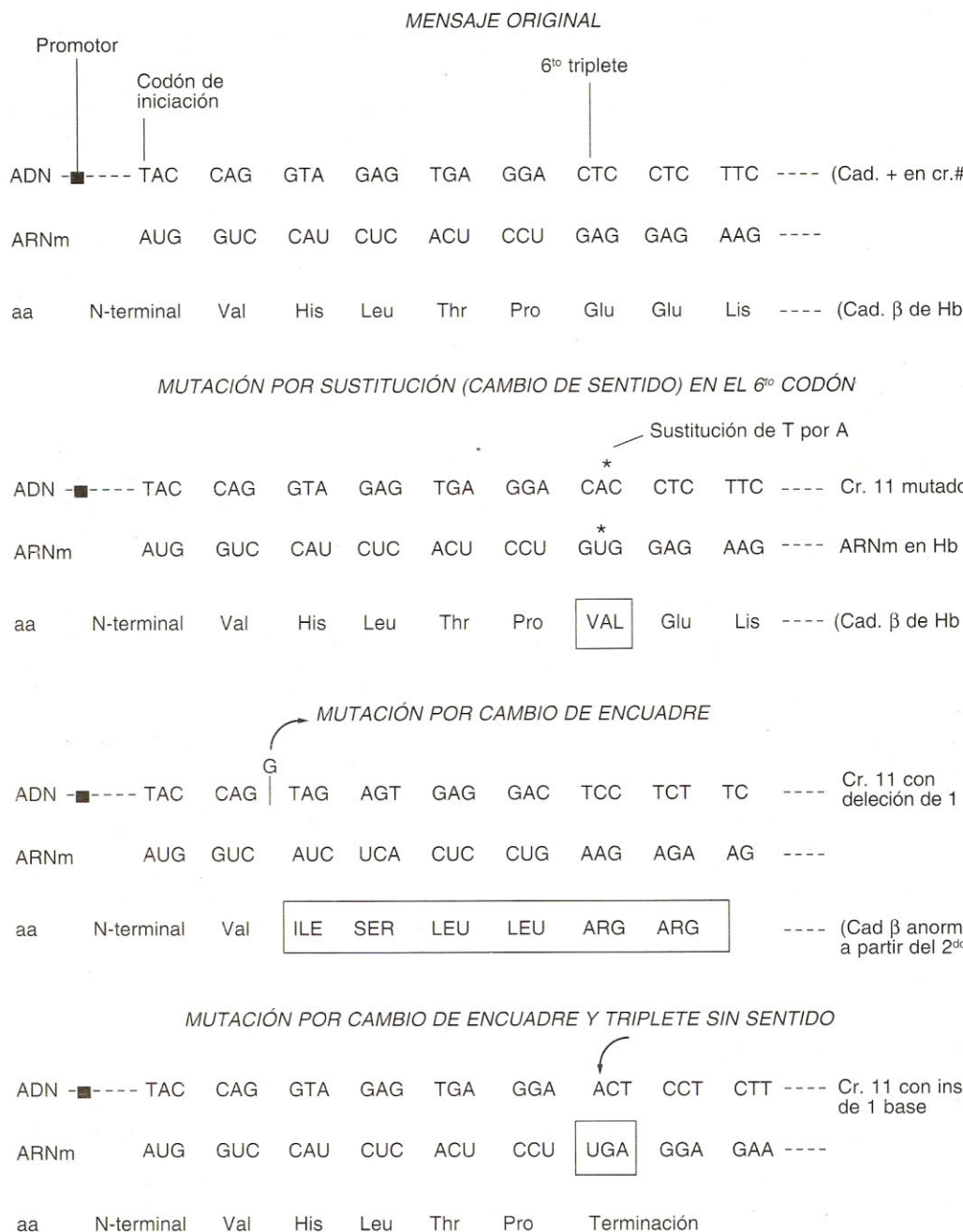
Las mutaciones pueden clasificarse de acuerdo con un criterio *morfológico* o de acuerdo con un criterio *funcional* (fig. 5-1).

De acuerdo con su *morfología*, las mutaciones pueden ser:

- 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 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.
- De extensión variable* (cuando pueden afectar más de una base). Pueden ser: *deleciones*, *inserciones*, o *expansiones de repeticiones de triplete* (véase más adelante).

Desde el punto de vista *funcional*, las mutaciones pueden ser:

- Silenciosas*. En este caso no se observa ningún efecto en el fenotipo y no parecen ser



**Fig. 5-1.** Varios tipos de mutación ejemplificados por las secuencias para la cadena β de la hemoglobina humana (cuyo ADN se encuentra en el cromosoma 11). La Hb S es una hemoglobina anormal (de la anemia falciforme). Los aminoácidos erróneos en la proteína final y el codón UGA de terminación.

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, etc.

b) *De cambio de encuadre* (por delección o inserción). En este caso se produce un cambio en el “marco” de lectura de los tripletes, por



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 delección de una base puede ser compensado por la inserción de otra (y viceversa), existen mutaciones "compensadoras" que revierten parcialmente 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 cesación 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 recientemente 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 originó, la cual podría morir sin consecuencias mayores para un organismo multicelular. Por otra parte, al hablar de mutaciones se sobreentiende que la mutación afecta la línea germinal, para ser transmitida a la próxima generación, y 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" a 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 pa-

cientes 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.<sup>3</sup> Además, se verificó 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 ha identificado en seis enfermedades humanas.<sup>4</sup>

### Mutaciones espontáneas y mutaciones inducidas

Se denominan mutaciones espontáneas a aquellas que ocurren en organismos en condiciones ambientales normales o en microorganismos en condiciones normales de cultivo.<sup>5</sup> 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 inducción 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 deducen 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  $1 \times 10^{-5}$  y  $10 \times 10^{-5}$ . Las tasas de mutación mencionadas se expresan siempre para un *gen determinado* y por genera-

**Cuadro 5-1.** Tasa de mutación espontánea para algunos genes humanos determinantes de enfermedades

Gen	Tasa de mutación (método directo)
Corea de Huntington	$1 \times 10^{-5}$
Neurofibromatosis (NF-1)	$16 \times 10^{-5}$
Acondroplasia	$10 \times 10^{-5}$
Retinoblastoma	$2,5 \times 10^{-5}$
Osteogénesis imperfecta	$1,8 \times 10^{-5}$
Esclerosis tuberosa	$1,2 \times 10^{-5}$

ción (del organismo humano, alrededor de 20 años). Las tasas de mutación espontánea humanas miden especialmente la probabilidad de que se originen errores graves que inactiven un gen, es decir, que determinan una variante génica incapaz de funcionar, llamado *alelo nulo*. Las tasas humanas (cuadro 5-1) muestran que este tipo de fenómeno es relativamente raro.

### 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 proteína que no afecta su función normal. Éstos son ejemplos de mutaciones "silenciosas" y que pueden crear "polimorfismos" (véase más adelante).

El significado de las tasas de mutación no es el de expresar *todos* los cambios en el ADN y tampoco el de un promedio, porque en realidad suceden muchos más cambios a nivel del ADN. Si se considera una población de 100.000 habitantes y el 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, 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.

### Factores implicados en la probabilidad de mutación de un gen

Como se verá más adelante, 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 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 tendrá 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) 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  $\mu$  es:

$$\mu = n / 2 N$$



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, previa estimación de la fertilidad relativa de un enfermo (1-f):

$$\mu = (1 - f) X$$

siendo X la incidencia 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 error 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

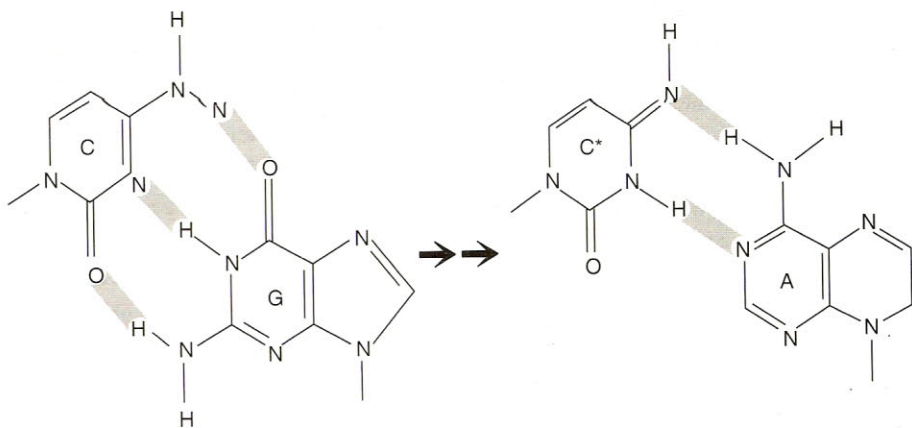
Las mutaciones espontáneas ocurren principalmente por errores espontáneos en la replicación del ADN y, en menor medida, por una tasa basal o "normal" de agentes mutagénicos en el ambiente, como radiación basal del suelo, radiación cósmica, niveles usuales de sustancias, tales como peróxidos, ácido nitroso 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.<sup>6</sup> Sin embargo, los factores de mayor gravitación son errores en la replicación del ADN.

### Formas tautoméricas de bases y depurinación del ADN

La base normal citosina puede, con baja frecuencia, presentar en forma transitoria una forma *imina*, con el N<sub>3</sub> hidrogenado; en esta condición, la citosina, en vez de aparearse con guanina, puede hacerlo con adenina (fig. 5-2).

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 tauto-



**Fig. 5-2.** Forma usual (izquierda) y tautomérica (imina, C\*, a la derecha) de la citosina, y su consecuente mal apareamiento con adenina en vez de guanina.

méricas 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 normal 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 influenciado 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 ocurre durante la replicación, se introducirán mutaciones por delección (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 un monitoreo constante del ADN para evitar (y una vez producidos, reparar) los errores en la codificación del ADN. Efectivamente, todos los organismos eucariontes poseen refinados sistemas de *reparación del ADN*.

### Errores introducidos durante la 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 de-

ben replicar en cada división el genoma humano de  $3 \times 10^9$  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 es *absolutamente inviable*; se considera 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.

### Errores introducidos por las ADN polimerasas *in vitro*

La demostración más clara del origen de las mutaciones es el grado de error que poseen las ADN polimerasas naturales, las ADN polimerasas (dependientes de un molde), cuando se realiza una síntesis *in vitro* de ADN bajo ciertas condiciones. Las principales clases de ADN polimerasa en mamíferos son  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\gamma$ . Las polimerasas  $\alpha$  y  $\delta$  intervienen en la replicación del genoma en mamíferos, mientras las  $\beta$  y  $\epsilon$  están vinculadas a procesos especiales de reparación del ADN. La polimerasa  $\gamma$  está vinculada a la replicación del ADN mitocondrial (cuadro 5-2).

En ciertas condiciones, las polimerasas  $\alpha$  no poseen la actividad correctora, 3'-5' exonucleásica, 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 la síntesis *in vitro* con las polimerasas purificadas, o cada 500.000 bases, cuando se utilizan complejos de replicación.<sup>8</sup> Estas altísimas tasas de error implican la existencia de mecanismos correctores *in vivo*.



**Cuadro 5-2.** Tipos de ADN polimerasas eucarióticas y sus características

Tipo de polimerasa	PM	Principal función	Actividad exonucleásica	Sensibilidad a inhibidor
$\alpha$	340 kDa (4 subun.)	En replicación genómica	Inhibida 3'-5'	+ Afidocolina
$\beta$	45 kDa	Reparación ADN	-----	- Afidocolina
$\delta$	200 kDa (2 subun.)	En replicación genómica. Se une a la ciclina	3'-5'	+ Afidocolina
$\epsilon$		Reparación ADN		- Afidocolina
$\gamma$	60 kDa	Replicación ADN Mt		

### La "lectura de prueba" por las polimerasas provee una reducción de errores

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. 5-3).<sup>7</sup>

### 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 "inmor-

talizan" los errores introducidos previamente y llevan a que puedan existir entre  $10^{14}$  y  $10^{18}$  tipos de virus.<sup>9</sup>

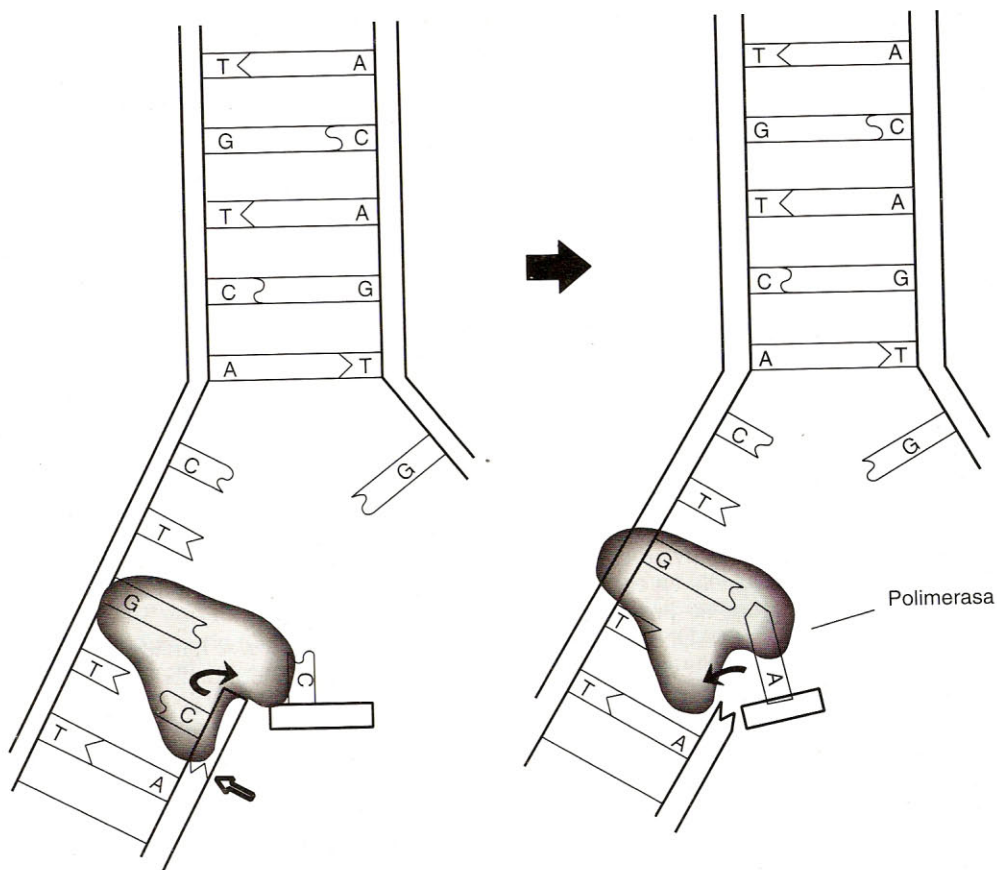
### SISTEMAS POSREPLICATIVOS DE REPARACIÓN DEL ADN

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.

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 profundas 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:

- Sistema de reparación de mal apareamiento de bases (REMA)*. Es posreplicativo temprano, repara el mal apareamiento de uno o



**Fig. 5-3.** "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.

- 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).
- Reparación por escisión de bases (REBA).** Es posreplicativo tardío y reemplaza generalmente a un único nucleótido dañado, en especial los sitios depurados en el ADN (véase antes).
  - 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 ultravioleta (UV); sus genes comprenden a los respon-

sables del xeroderma pigmentoso y otras enfermedades.

- Reparación de rupturas de doble cadena.** Este tipo de reparación es el menos desarrollado en las células y se asocia con los mecanismos de recombinación meiótica (véase cap. 9).

Estos sistemas proveen la reparación del ADN para cambios inducidos por agentes ambientales, como luz ultravioleta (UV), agentes desaminantes, agentes alquilantes (que introducen un grupo alquilo a una base) y otros, no están relacionados con los errores durante la replicación, 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 cambios premutacionales. Sin embargo,



**Cuadro 5-3.** 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)

si 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.

### 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 5-3).

Por otro lado, varias sustancias altamente mutagénicas, como la metilnitrosoguanidina, las nitrosaminas, el dimetilsulfato y el metilmetano-sulfonato, transfieren grupos metilo, etilo u otros grupos alquilo a bases del ADN, provocando cambios premutagénicos que, si no son reparados 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 demetilar la base anormal. El mecanismo general de la eliminación de bases alquiladas, desaminadas y anormales puede estar a cargo del sistema REBA o del sistema REN, como se expone en los dos ejemplos siguientes.

### Reparación por escisión de bases (REBA)

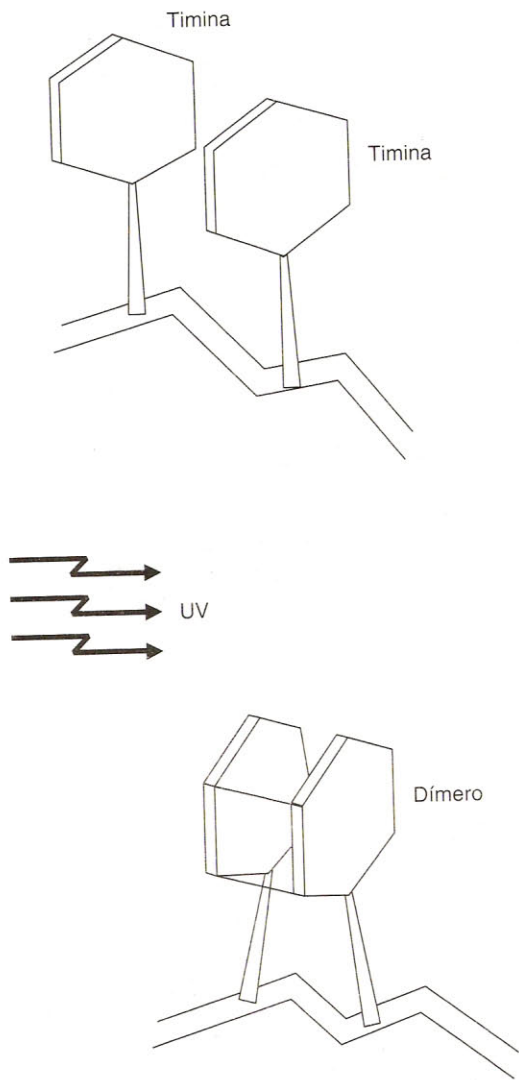
Este tipo de reparación opera a través de varios pasos:

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 destuerzan la hélice del ADN), que muestran que estos mecanismos funcionan en el hombre.<sup>10</sup>

### 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 2 uniones entre las bases adyacentes que dan una estructura de ciclobutano y que distorsiona la estructura de la doble hélice (fig. 5-4). 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 hue-



**Fig. 5-4.** Formación de dímeros de timina por acción de luz UV. El dímero es escindido por una nucleasa (escisinucleasa), para luego proceder a la reparación de la cadena.

co es llenado por una ADN polimerasa y una ligasa.

### Mecanismos moleculares de la reparación de mal apareamiento (REMA)

Este tipo de reparación ocurre inmediatamente después de la acción de la ADN polimerasa, 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 humana, Mutante S, Homóloga, 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).<sup>11</sup>

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.<sup>12</sup> 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. 5-5).

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 5) de bases mal apareadas,<sup>11</sup> que la "lectura de prueba" de la ADN polimerasa ( $\delta$  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) (véase panel 5-1).

### 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 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. 4), y más concretamente, que es



**Cuadro 5-3.** 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)

si 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.

### 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 5-3).

Por otro lado, varias sustancias altamente mutagénicas, como la metilnitrosoguanidina, las nitrosaminas, el dimetilsulfato y el metilmetano-sulfonato, transfieren grupos metilo, etilo u otros grupos alquilo a bases del ADN, provocando cambios premutagénicos que, si no son reparados 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 demetilar la base anormal. El mecanismo general de la eliminación de bases alquiladas, desaminadas y anormales puede estar a cargo del sistema REBA o del sistema REN, como se expone en los dos ejemplos siguientes.

### Reparación por escisión de bases (REBA)

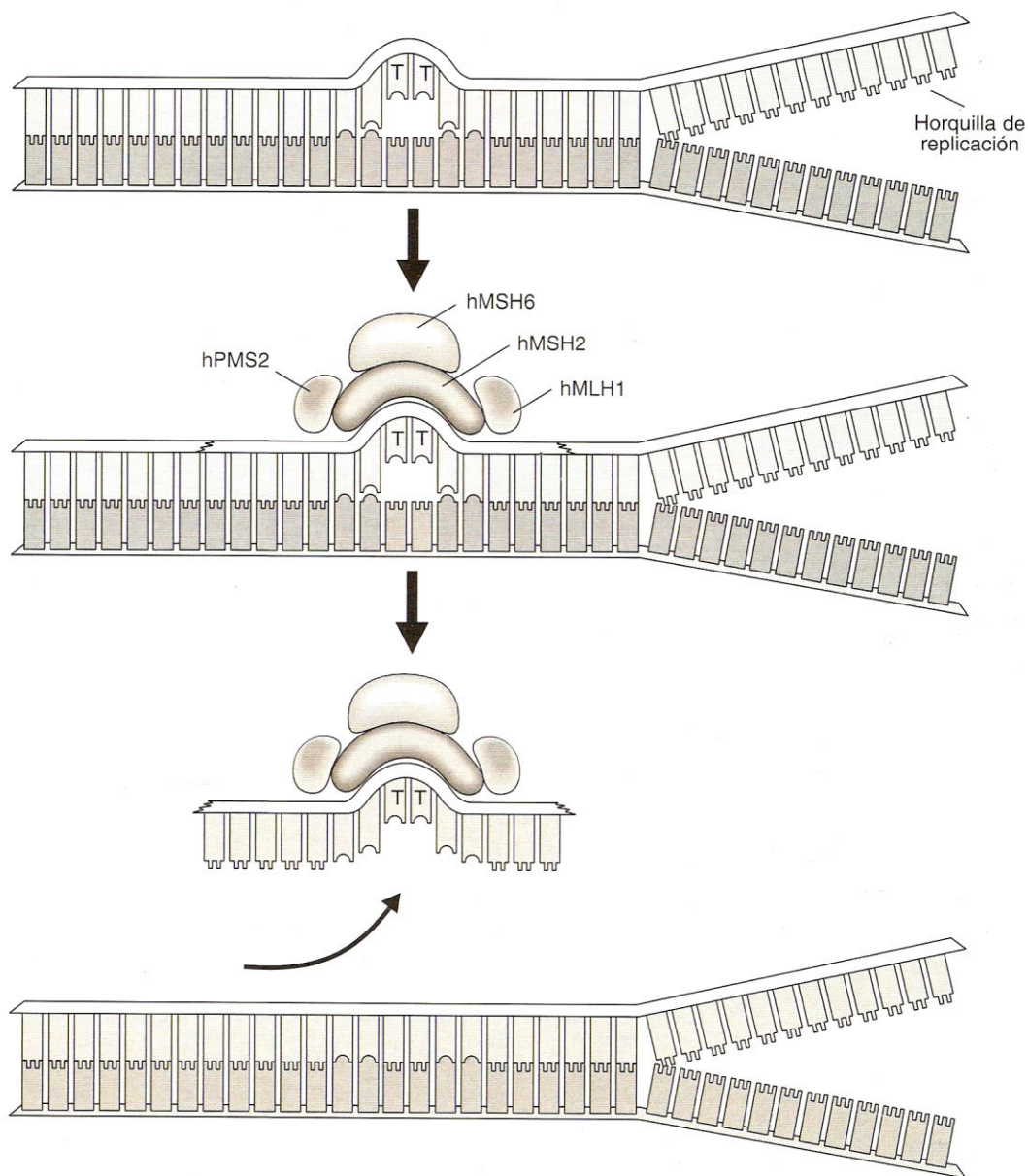
Este tipo de reparación opera a través de varios pasos:

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.<sup>10</sup>

### 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 2 uniones entre las bases adyacentes que dan una estructura de ciclobutano y que distorsiona la estructura de la doble hélice (fig. 5-4). 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 hue-



**Fig. 5-5.** Reconocimiento, asociación y reparación de una (o varias) bases mal apareadas (T) por la proteína hMSH2 y sus proteínas asociadas (hMSH6; hPMS2; hMLH1 y PCNA).<sup>12</sup>

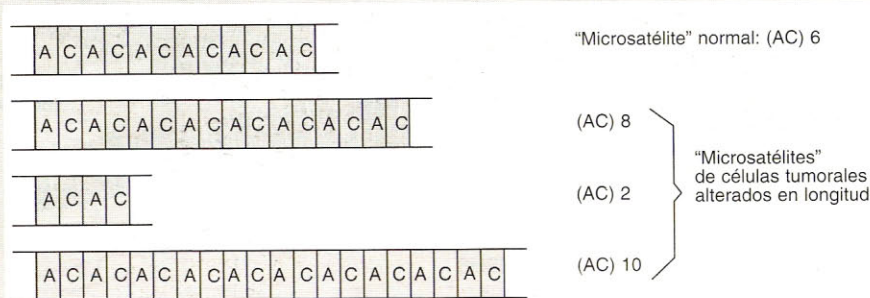
asociada al factor de transcripción FTIIH (véase cap. 4).

#### Enfermedades por alteración del sistema REN: xeroderma pigmentoso

En la enfermedad llamada *xeroderma pigmentoso* (véase panel 5-2) 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 (fig. 1 del panel 5-2) 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 queratoacanto-





**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.

**Panel 5-1. Inestabilidad de microsatélites (IMS = MSI), en inglés en el cáncer colónico hereditario no polipósico (CCHNP).** 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. 3 y cap. 8).<sup>13</sup> 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.<sup>11</sup> 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. 13) 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.<sup>11</sup> 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. 13).<sup>14</sup> 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.<sup>14</sup>





**Fig. 2.** 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 epiteloma basocelular. (Gentileza del Profesor Dr. Alejandro Cordero.)

**Panel 5-2. El xeroderma pigmentoso.** Esta enfermedad es rara, con una incidencia variable según los países (en EE.UU. 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.

mas) 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 7 genes diferentes, pueden ocasionar la enfermedad. Estos 7 genes han sido clonados, y a ellos se le agregan 2 genes conocidos de una enfermedad vinculada, el síndrome de Cockayne, y



**Cuadro 5-4.** 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 del FTHH)
XPC	—	Reparación general de ADN
XPD	19q13	Helicasa 5'-3' (integrante del FTHH)
XPE	—	Proteína ligante a ADN dañado
XPF	16p13.1	Endonucleasa de corte en 5
XPG	—	Endonucleasa de corte en 3
ERCC1	19q13	Proteína asociada con XPF
CSA	—	Proteína interactiva (s. de Cockayne A)
CSB	10q11	Factor acoplante REN-transcripción Helicasa del s. de Cockayne B

otro gen de una proteína asociada al XP (cuadro 5-4).

Dos de las proteínas del XP son *helicases*, es decir, enzimas que destuerzan las dos hélices del ADN y, al hacerlo, hidrolizan ATP (son ATPasas dependientes de ADN, su sustrato). Estas dos helicases (XPB y XPD, véase cuadro 5-4) forman parte integrante del aparato de transcripción normal en el factor de transcripción FTHH.<sup>15</sup> De esta manera, se ha establecido la *relación funcional entre reparación de ADN y transcripción*.

### Vinculación entre reparación de tipo REN y transcripción

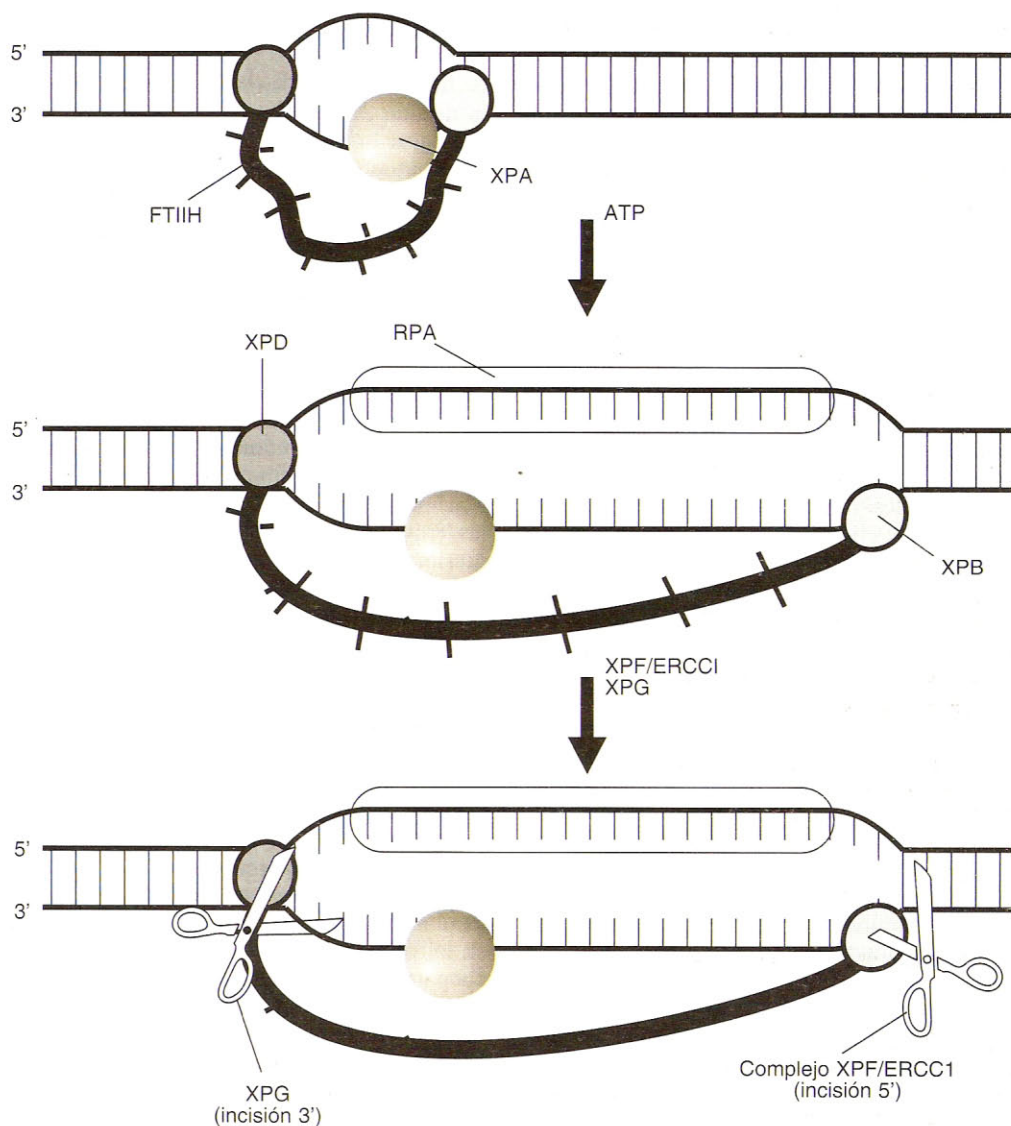
Recientemente se ha comprobado que uno de los componentes del complejo de transcripción, el factor FTHH, no sólo contiene una parte de los constituyentes del sistema de reparación REN, sino que por sí mismo puede intervenir completo, junto a las proteínas XPA y XPG (véase cuadro 5-4), para efectuar la reparación de tipo REN. Es decir que este factor FTHH 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 FTHH interviene en la reparación mediante su capacidad de "abrir" el ADN por medio de sus dos helicases 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. 5-6).

En el comienzo de la transcripción, el factor FTHH abre el ADN mediante sus dos helicases, y permite el recorrido de la ARN polimerasa. El FTHH 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 FTHH, 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 FTHH trabaja en *modo reparativo*, posee una actividad fosforilante (de quinasa) que puede detener el ciclo celular. De esta manera, se integran 3 áreas: transcripción, reparación y regulación del ciclo celular.

### Otras enfermedades asociadas con sistema 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 A. 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 retraso, 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' codificada por XPG, que impiden, cualquiera de ellas, la asociación normal del FTHH con los componentes del REN.



**Fig. 5-6.** Intervención del factor de transcripción FTIIH en la reparación REX del ADN. La lesión es reconocida por XPA, que recluta el factor FTIIH. Las helicasas XPB y XPD abren el ADN en sentidos opuestos, y luego las endonucleasas XPG y XPF/ERCC1 (tijeritas) cortan los extremos de la cadena dañada.<sup>16</sup>

El síndrome de Bloom es muy raro, salvo en los judíos asquenazí 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. 8), 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.<sup>17</sup> Por consiguiente, es una enfermedad monogénica, de herencia recesiva, caracterizada 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 probablemente hay varios genes relacionados con esta enfermedad.

El *síndrome de Werner* o "envejecimiento prematuro hereditario" es una enfermedad rara, con incidencia de 1 por millón, cuyo defecto radica en la mutación del gen *WNR* ("Werner"), que codifica una *helicasa* de 1.432 aa.<sup>18</sup>

## LAS MUTACIONES EN LA NATURALEZA

### Función biológica de las mutaciones

Si bien los organismos eucariontes poseen métodos muy eficientes para preservar la fidelidad 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 *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 ( $\%_{10}$ ), 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 especialmente propicias 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.

### La 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.<sup>19</sup> 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 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



ta 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) a aquellas secuencias de ADN que son compartidas en gran parte de su extensión en distintas especies de organismos, porque codifican proteínas o ARNs 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 3 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, 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 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. 5-7). A nivel del ADN, los segmentos no codificantes son muy poco conservados, es decir que rápidamente sufren cambios que hacen que esas secuencias sean *divergentes* aun en especies bastante cercanas.

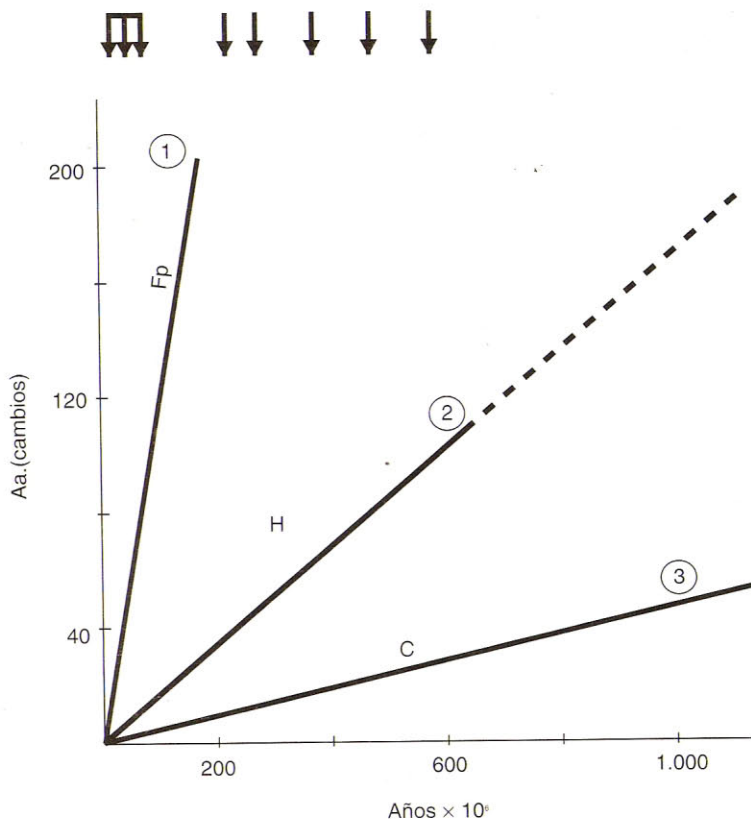
## INDUCCIÓN DE MUTACIONES

### Agentes "mutagénicos"

El genetista norteamericano H.J. Müller 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.

Las radiaciones aumentan la tasa de mutación en proporción directa a la intensidad de ionización provocada por la radiación (fig. 5-8); las dosis de radiación se miden en unidades Roentgen ( $2,08 \times 10^9$  iones por  $\text{cm}^3$  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 necesaria para duplicar la tasa de mutación *por generación* es de 1,69 sievert (= 169 rads)<sup>20</sup> 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





**Fig. 5-7.** 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.

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, etc.), 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 incre-

mentó significativamente la aparición de mutaciones visibles en el fenotipo o detectables electroforéticamente.<sup>20</sup>

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 espermatozoides 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 irradiación aguda (deleciones u otras aberraciones cromosómicas) degeneren antes de formarse.

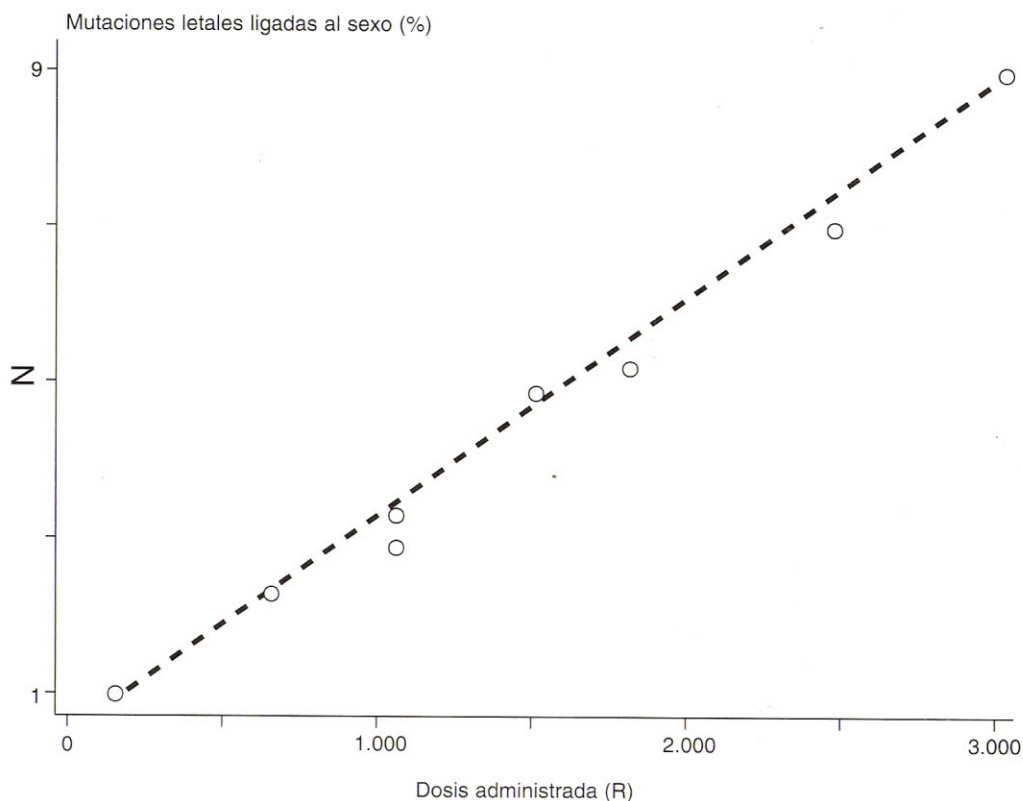


Fig. 5-8. Proporcionalidad entre la dosis de rayos X recibida y la tasa de mutaciones ligadas al sexo en *Drosophila*.

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 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.

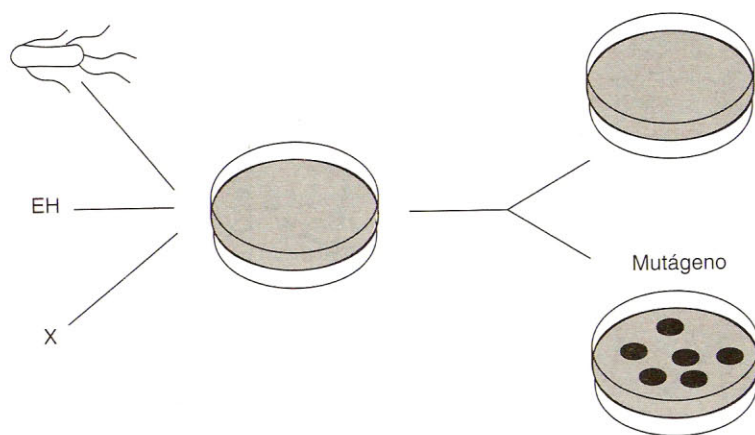
Al actuar a través de radicales libres, la tasa de mutación inducida es influida por la presión parcial de oxígeno presente. La acción premutagénica de las radiaciones guarda semejanzas con la de sustancias químicas.

La mayor parte (hasta un máximo del 90%) de las mutaciones inducidas por radiación son *deleciones*.<sup>21</sup> 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*.<sup>21</sup>

### Agentes mutagénicos químicos

Numerosas sustancias han sido probadas para determinar su potencialidad mutagénica, y





**Fig. 5-9.** 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 a probar (X). Si la sustancia es mutagénica, algunas mutaciones reversionan la bacteria a la normalidad, y esto se expresa por un número de colonias (de bacterias que proliferan).

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 carcinogénico 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 mutagénica (fig. 5-9).<sup>22</sup> Mediante este tipo de pruebas se ha demostrado el potencial mutagénico de un número considerable de contaminantes ambientales.

### 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 reem-

plazo 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 primer 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 desconoce.<sup>23</sup>

### 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 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

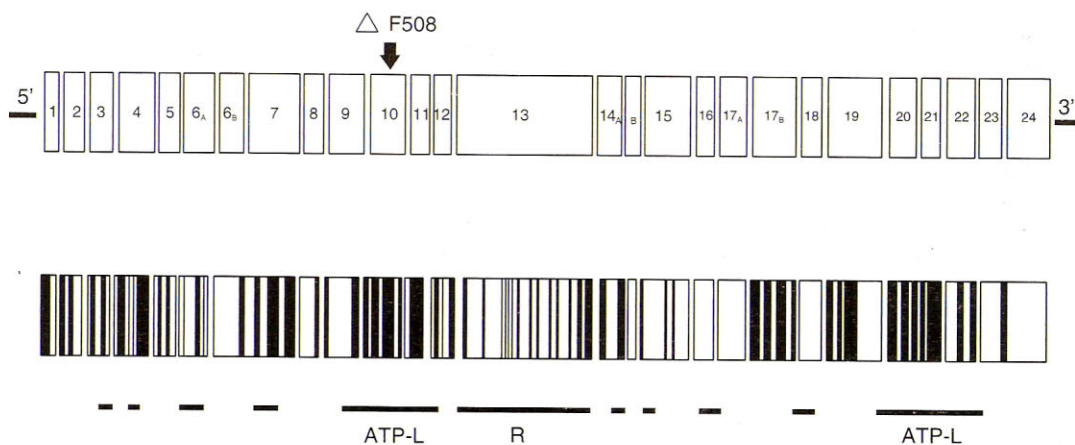
**Cuadro 5-5.** Genes de interés médico y de estructura conocida

Gen	Tamaño	Nº exones	Enfermedad mutacional
G6PD (glucosa 6-P deshidrogenasa)	18 kb	13	Anemia hemolítica
$\beta$ -Globina	1,5 kb	3	$\beta$ -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

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 5-5.

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 ion cloro en la membrana celular de glándulas exocrinas, es de gran tamaño y consta de 27 exones. Hasta 1992 se habían comunicado 230 mutaciones de este gen,<sup>24</sup> 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 unen al ATP en la proteína reguladora producto de este gen (fig. 5-10). Estas regiones pueden ser críticas para la función de la proteína y por ello las mutaciones son más fácil-



**Fig. 5-10.** 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 ( $\Delta$  F508) está señalada aparte, arriba del exón 10. Hacia abajo se esquematizan los segmentos de la proteína codificada. ATP-L: dominio ligante de ATP; R: dominio regulador.



mente observables. Sin embargo, *una sola mutación es responsable del 67% de los pacientes (la  $\Delta$  F508) (véase en el cap. respectivo).*

## 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 efectivos 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

- Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, y Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992; 89:491-496.
- Ledbetter DH. Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet* 1992; 51:451-456.
- Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Sclessinger D, Sutherland GR, Richards RL. Mapping of the DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)<sub>n</sub>. *Science* 1991; 252:1711-1714.
- Bates G and Lehrach H. Trinucleotide repeat expansions and human genetic disease. *Bioessays* 1994; 16:277-284.
- Freese E. Molecular mechanism of mutations. En: *Molecular Genetics, I* (Ed. J. Herbert Taylor), New York: Academic Press, 1963; 207-269.
- Slagboom PE and Vijg J. Genetic instability and aging: theories, facts and future perspectives. *Genet* 1989; 31:373-385.
- Radman M, Wagner R. The high fidelity of DNA replication. *Sci American* 1988; 259:24-30.
- Kunkel TA, Bebenek K, Roberts JD, Fitzgerald M, Thomas DC. Analysis of fidelity mechanisms with eukaryotic DNA replication and repair proteins. *Genet* 1989; 31:100-103.
- Wain-Hobson S. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Current Op Genet* 1993; 3:878-883.
- Wevrick R and Buchwald M. Mammalian DNA-pair genes. *Curr Op Genetics* 1993; 3:470-474.
- Fishel M, Wilson T. Muts homologs in mammalian cells. *Current Op Genet Develop* 1997; 7:105-113.
- Lindahl T, Karran P, Wood RD. DNA excision repair pathways. *Current Op Genet Develop* 1997; 7:131-169.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-819.
- Arnheim N, Shibata D. DNA mismatch repair in mammals: role in disease and meiosis. *Current Genet Develop* 1997; 7:364-370.
- Bathia PK, Wang Z, Friedberg EC. DNA repair and transcription. *Current Op Genet Develop* 1997; 6:146-150.
- Hoeijmakers JH, Egly JM, Vermeulen W. TFIIF, a key component in multiple DNA transactions. *Current Op Genet Develop* 1996; 6:26-33.
- Ellis NA, German J. Molecular genetics of Bloom syndrome. *Human Mol Genet* 1996; 5:1457-1463.
- Epstein CJ, Motulsky AG. Werner syndrome: entering the helicase era. *BioEssays* 1996; 18:1025-1030.
- Kimura M. The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists. *Genome* 1991; 31:24-31.
- Neel JV, Schull JW, Awa A, Satoh C, Otake M, et al, Yoshimoto Y. Implications of the Hiroshima Nagasaki genetic studies for the estimation of the human "doubling dose" of radiation. *Genome* 1991; 31:853-859.
- Sankaranarayanan K. Ionizing radiation, genetic estimation and molecular biology: impact and references. *Trends in genetics* 1993; 9:79-84.
- 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; 70:2285.
- Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; 244:1288-1292.
- Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends in Genet* 1992; 8:392-398.

## BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

- Sancar A and Sancar GB. DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:29-67.
- Hickson ID (ed.). *Base Excision Repair of DNA Damage*. R.G. Landes Co., Georgetown, 1997; 184.

## ***PATRONES DE HERENCIA HUMANA***

***Tipos de herencia patológica. Dominancia y recesividad. Mecanismos moleculares en las enfermedades mendelianas. Patogenia en enfermedades mendelianas. Interacción alélica, epistasis y expresión variable. Ejemplos***

### **Introducción: tipos de herencia en Medicina**

Como se vio en el capítulo 1, el desarrollo de los rasgos (tanto los normales como los anormales) de los organismos es el resultado de la interacción, en grado variable, de la información genética contenida en el ADN, por un lado, y de los factores ambientales que actúan sobre el organismo, por el otro; es decir, en la terminología genética, que el *fenotipo* es el resultado de la interacción del *genotipo* con el *ambiente*. También se ha visto que el problema primario de la Genética Médica es determinar qué parte le corresponde al genotipo y qué parte a los factores ambientales en el desarrollo de las enfermedades o fenotipos patológicos. El factor genético está representado por los tres principales tipos de enfermedades genéticas, a saber (cuadro 6-1):

1. Enfermedades (o rasgos) *monogénicas*, con herencia *mendeliana* más o menos regular, como por ejemplo la hemofilia, la acondroplasia y muchas otras.
2. Enfermedades (o rasgos) de *herencia multifactorial*, frecuentemente poligénicas y a veces monogénicas, con componente ambiental significativo, como el paladar hendido y muchas otras.
3. Enfermedades de origen cromosómico, o *cromosomopatías*, no heredables (como el síndrome de Turner), o con herencia regular o

irregular, según los casos, como las translocaciones.

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 unos pocos 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 heredables, o no se heredan regularmente, ya que la mayoría de las cromosomopatías se originan esencialmente por azar.



**Cuadro 6-1.** Tipos de enfermedades genéticas

Tipo	Herencia	Diagnóstico	Incidencia promedio	Ejemplos
Monogénicas	Mendeliana	Clínico; sondas de ADN	1:10.000 nacidos	Hemofilia, talasemia, acondroplasia, etc.
Multifactoriales	>Incidencia familiar	Estadístico; marcadores	Muy frecuente	Paladar hendido, diabetes, etc.
Cromosomopatías	Ausente o irregular	Microscópico	1:1.000 nacidos	Síndrome de Klinefelter, trisomías, etc.

Las cromosomopatías se estudian junto con la descripción del cariotipo humano (véase el cap. 14) y en parte con el estudio de la meiosis (cap. 9); por eso aquí se continuará sólo con los primeros dos tipos, en especial con las enfermedades monogénicas o mendelianas.

Si bien, por razones históricas, tanto las cromosomopatías como las enfermedades monogénicas mendelianas clásicas han sido ampliamente reconocidas en Medicina, las enfermedades de herencia multifactorial son las que tienen el mayor impacto. Esto se debe al amplísimo espectro que abarcan estas enfermedades y a su gran incidencia en la clínica, lo que hace necesario su estudio por separado. En el presente capítulo sólo se definirá este tipo de herencia subrayando su importancia, dado que incluye enfermedades tan frecuentes como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, numerosas malformaciones congénitas, enfermedades mentales, etc. Lo que hace menos reconocido a este tipo de herencia es la falta de un patrón claro y regular de herencia que sea fácilmente entendible, 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; por ello los métodos estadísticos son importantes en su estudio.

### 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 proviene del otro (aunque no de contenido génico idéntico), son "cromoso-

mas homólogos" que forman parejas con idéntica morfología. Por ejemplo, el cromosoma N<sup>º</sup> paterno y el materno normalmente son de idéntica forma y patrón de bandas. Los genes, en el individuo *diploide* (que tiene 2 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 *homocigoto* para ese gen; en caso contrario es *heterocigoto* para ese gen.

Los individuos homocigotas para un gen, *l*, expresan de una sola manera; en cambio, los individuos heterocigotas para un gen, puede expresar una forma del gen, o las dos formas, 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. Sin embargo, en muchas ocasiones, el patrón de herencia no es absolutamente rígido y de acuerdo con las reglas mendelianas; ello se debe al gran 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 (cap. 4); en el citoplasma, la traducción y luego, a nivel de los tejidos, de los órganos y finalmente en el organismo completo se puede ir haciendo menos clara la expresión de un gen por la interacción con otros procesos. Sin embargo, un número de enfermedades y rasgos normales pueden asignarse a las categorías mendelianas, haciendo ciertas limitaciones a estas reglas. Una de las limitaciones se refiere

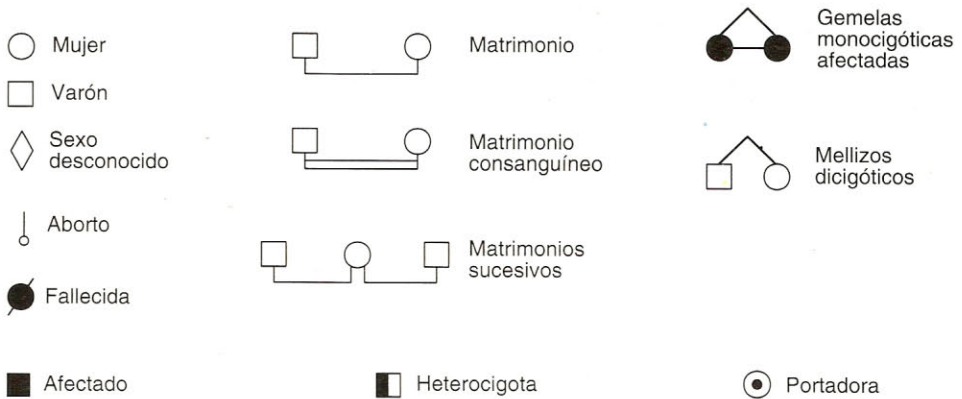


Fig. 6-1. Símbolos usados en genealogías.

al grado de expresión 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 aspecto o 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 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; este patrón se denomina de ligamiento al X o ligamiento al sexo y es descrito en detalle en el capítulo 8.

### 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. En una genealogía, las diferentes generaciones se numeran con números romanos, 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 6-1.

### 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 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 están severamente limitados por la selección natural contra los heterocigotas, y en un matrimonio lo más probable es que el portador de un gen dominante se case con un cónyuge que lleva el gen normal. 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. 6-2). Si la penetrancia es alta, un homocigota para un gen dominante no muestra mayores diferencias fenotípicas con el heterocigota; un ejemplo de esto ocurre en la corea de Huntington (véase más adelante). Las genealogías de un gen dominante raramente muestran un “salteado” u omisión de pacientes en una generación. Al ser de localización autosómica, ambos sexos están afectados por igual.



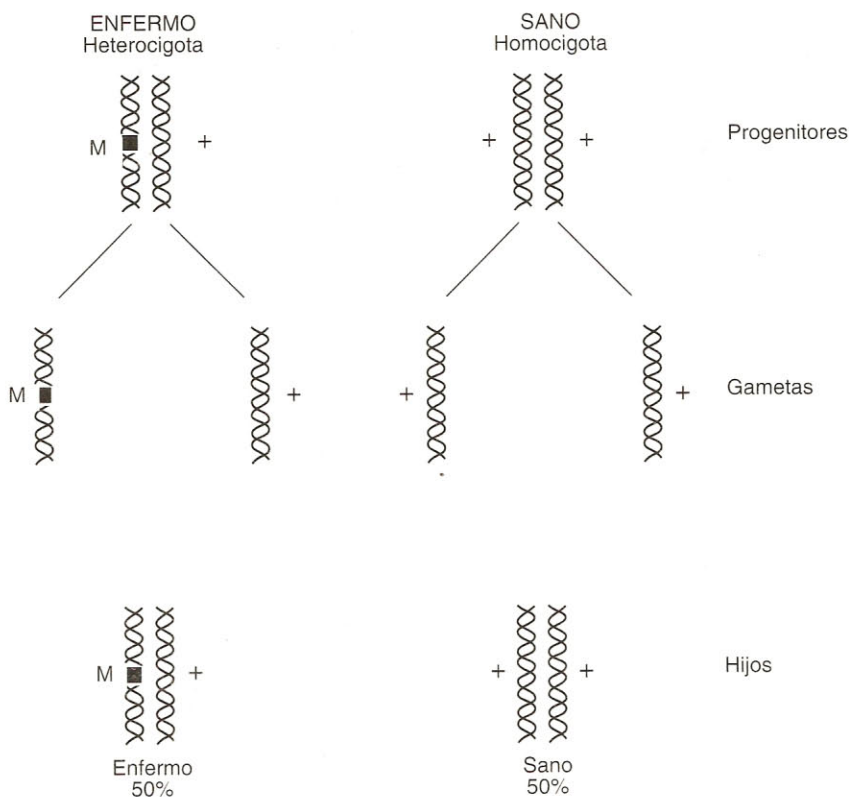


Fig. 6-2. Esquema del tipo de herencia dominante con 100% de penetrancia. Se esquematiza una molécula de ADN por cada cromosoma homólogo. El signo + corresponde al gen normal.

### 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. 6-3) 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; el número total de 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%.

Las enfermedades provocadas por genes recesivos son causantes de más pacientes de enfermedades hereditarias comparadas con las de herencia dominante, dado que poseen un reservorio genético mucho mayor y, por consiguiente, son objeto de especial consideración en Medicina. Las enfermedades por genes recesivos suelen ser *esporádicas*, dado que casi nunca han sido transmitidas por dos portadores 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 posibilidad de 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.

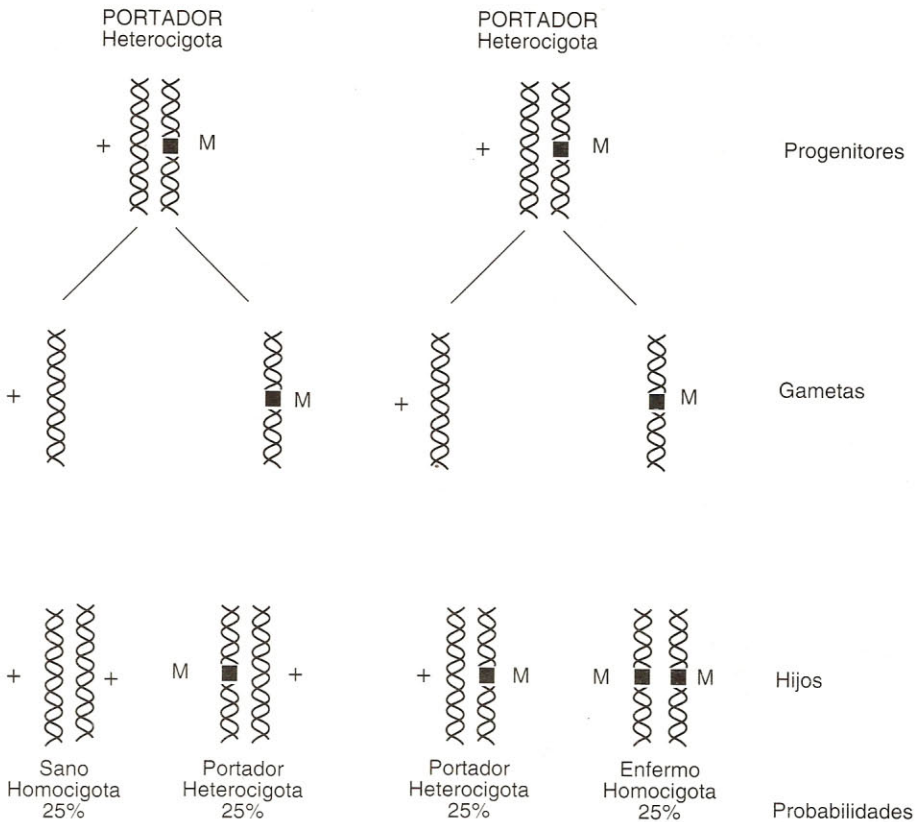


Fig. 6-3. Esquema del tipo de herencia recesiva.

Esto se refleja en la investigación de los pacientes: los enfermos tienen una mayor probabilidad de ser hijos de progenitores consanguíneos.

### Enfermedades con herencia dominante: corea de Huntington

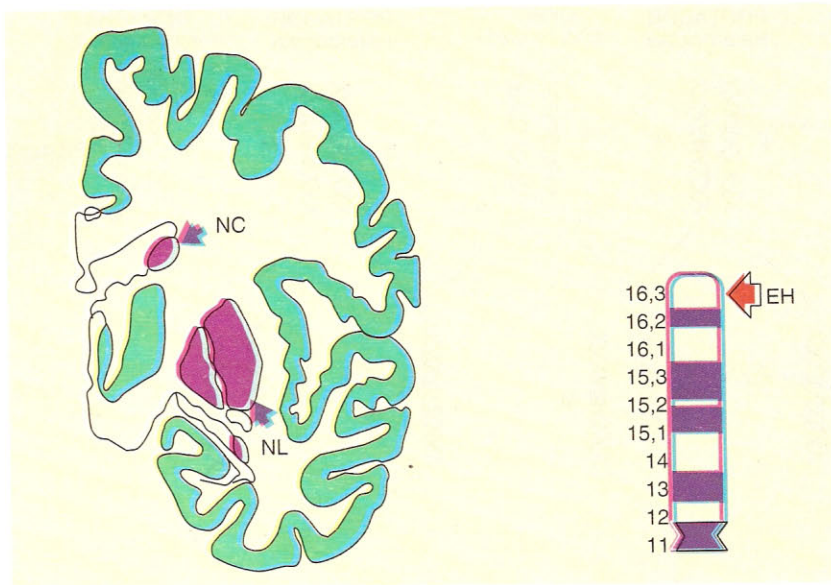
La enfermedad de Huntington o corea de Huntington es una enfermedad de herencia dominante clásica que ha sido intensamente estudiada en los últimos años y continúa aportando datos muy importantes para la genética humana. Se trata de una enfermedad degenerativa de los núcleos basales del encéfalo, que 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 general-

mente rodeado de parientes perturbados por la posibilidad de llevar el gen anormal y desarrollar la enfermedad.

Los síntomas iniciales son perturbaciones emocionales, a las cuales se suman luego movimientos involuntarios de los miembros y el rostro (corea) y signos de agitación. El deterioro mental del paciente comienza y no se detiene hasta la demencia total. Desde el punto de vista anatómico, existe muerte celular de un tipo específico de neuronas medianas (neuronas espinosas medianas), con conservación de las grandes. Las lesiones se observan especialmente en el cuerpo del triado (núcleo lenticular + núcleo caudado), mientras la corteza cerebral está más conservada hasta avanzada la enfermedad y la corteza cerebral 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;<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup> Este gen

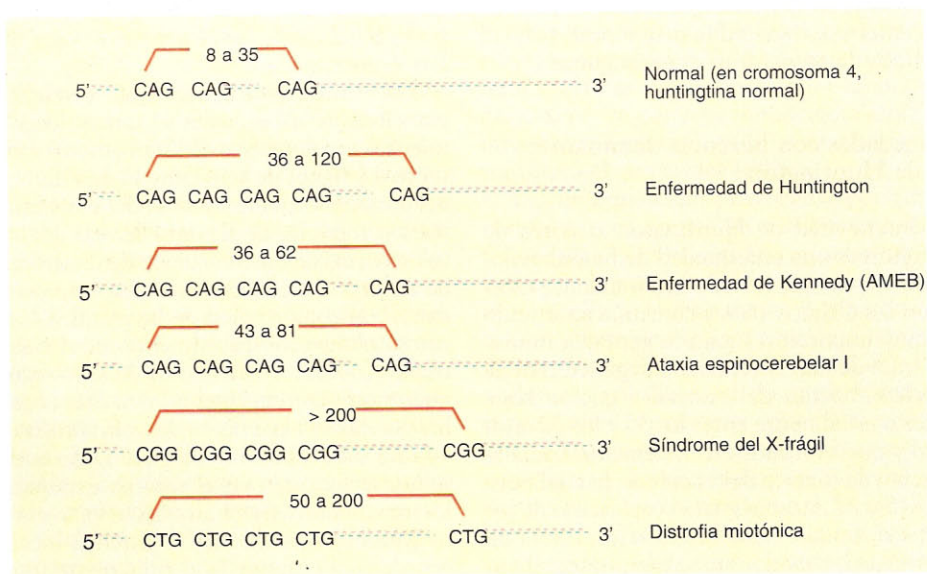




**Fig. 6-4.** Localización de las lesiones en la enfermedad de Huntington (izquierda) y esquema del brazo corto del cromosoma 4, donde se localiza el gen HD = EH (derecha). NC: núcleo caudado; NL: núcleo lenticular.

encuentra en una zona difícil de investigar, muy cerca del telómero del brazo corto del cromosoma 4 (el contenido génico de este cromosoma es potencialmente de 5.000 genes, de los cuales 27 han sido identificados como causantes de enfermedades) (fig. 6-4).<sup>3</sup>

El aislamiento (clonado) del gen HD = significó sorpresivamente una conexión con otras enfermedades hereditarias, todas ellas con un mecanismo mutacional común: la expansión de repeticiones de trinucleótidos (fig. 6-5; se también cap. 5).



**Fig. 6-5.** Expansión de repeticiones de trinucleótidos en enfermedades hereditarias. Las expansiones ocurren en los lugares del genoma y tienen en común su origen a partir de repeticiones cortas halladas en individuos normales. AMEB: atrofia muscular espinobulbar.

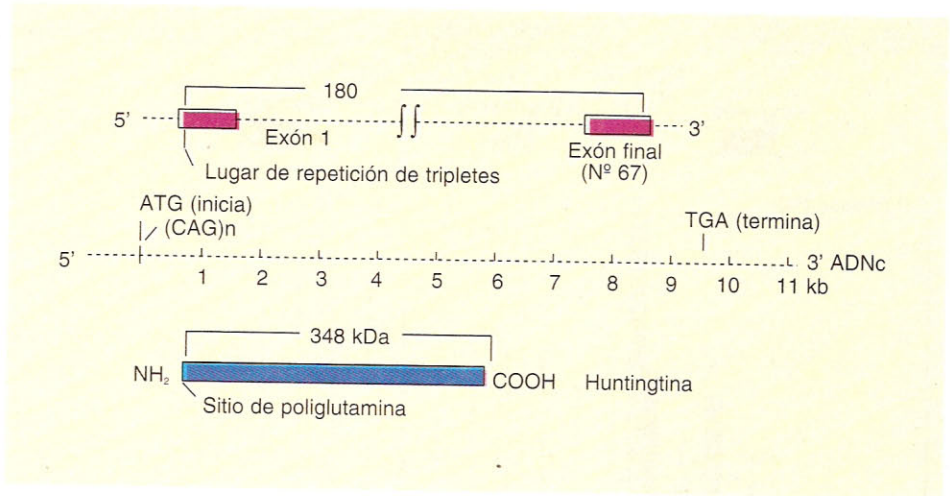


Fig. 6-6. Esquema de la relación entre el gen HD = EH de la huntingtina, su ADN copia y la proteína (huntingtina).

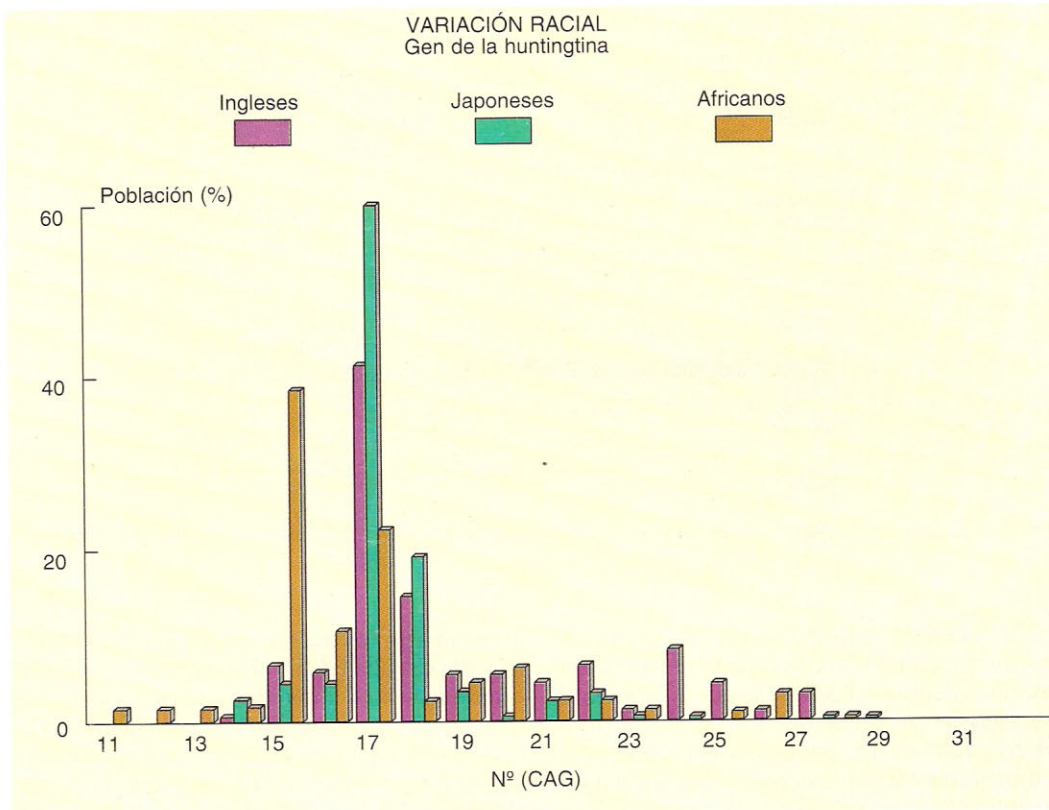
Este aumento patológico en el número de tripletes repetidos uno tras otro en una posición específica dentro del gen, es lo que diferencia al gen mutado en la enfermedad de Huntington del gen normal, que produce una proteína denominada *huntingtina* y cuya función normal todavía no es bien conocida. El gen normal de la huntingtina posee, muy cerca de su extremo inicial (5'), un grupo 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 un grupo repetido de glutaminas, es decir un grupo de poliglutamina (fig. 6-6).<sup>5</sup>

### 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 se debe a 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 recientemente.<sup>4</sup> 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 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 (hay escasos ejemplos en los que los máxi-





**Fig. 6-7.** Distribución de los números de triplete repetidos (CAG) en la población inglesa comparada con la japonesa y la africana del sur.<sup>6</sup>

mos de longitud normal y los mínimos de los enfermos se superponen).

### Variaciones raciales de las repeticiones y evolución del gen de la huntingtina

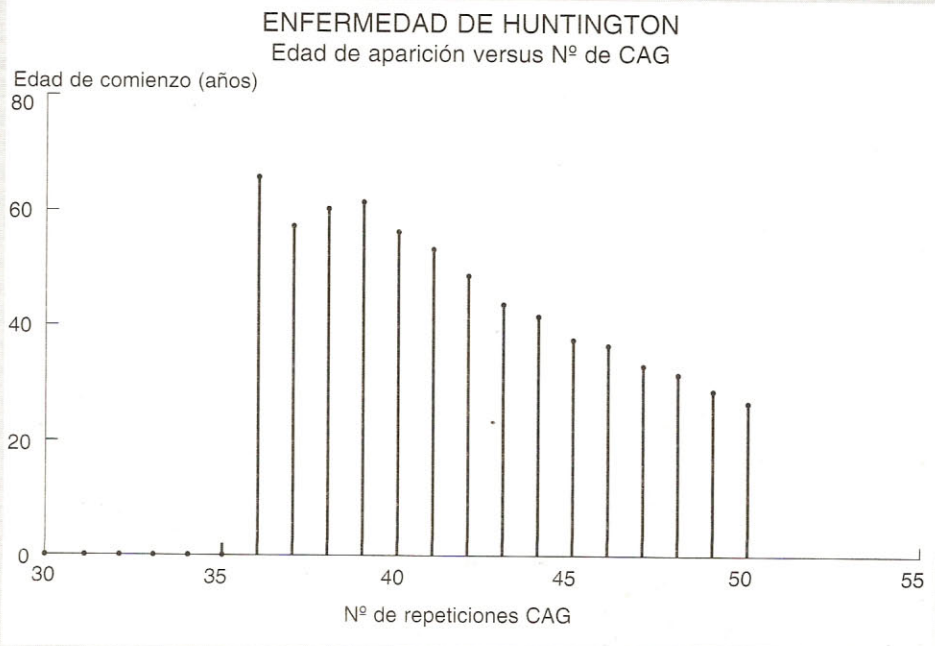
Ya era sabido que la incidencia de la corea de Huntington es mucho más baja en los orientales (1 en un millón) comparada con los europeos (1 en 10.000); en un estudio reciente se ha demostrado una significativa diferencia molecular con respecto a esto.<sup>6</sup>

Cinco grupos raciales (ingleses, japoneses, indostanos, africanos del sur y centroefricanos) 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 triplete de repetición, el resto de las curvas de distribución de longitudes es significativamente diferente, especialmente la región de longitudes mayores de 20 re-

peticiones: los ingleses presentaron significativamente mayor proporción de la población en este sector (fig. 6-7).

De la figura 6-7 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 8 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;<sup>6</sup> de ser así, la raza blanca está inexorablemente expuesta a un agrandamiento progresivo en la incidencia de la corea de Huntington, que parece inevitable con los conocimientos actuales.



**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 col. 1996).<sup>7</sup>

**Panel 6-1. Edad de aparición de la enfermedad de Huntington.** 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 recientemente en un estudio de 728 pacientes con enfermedad de Huntington.<sup>7</sup> 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.<sup>8</sup>

El origen de cada caso de enfermedad de Huntington parece ser al aumento de longitud 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 (véase panel 6-1).

#### El paradójico rechazo del diagnóstico precoz de la mutación de la huntingtina

Actualmente, con el gen clonado y métodos rápidos para la comprobación del número de tripletes repetidos (con la RCP), es posible, por primera vez en Medicina, detectar el futuro paciente de la corea de Huntington an-



tes 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*. 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 dominancia 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 es idéntico (y no más grave) al de los heterocigotas.<sup>9</sup> 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 se conoce, su localización citoplasmática muestra que no es un regulador transcripcional, sino una proteína estructural o funcionante en las terminaciones nerviosas. La localización neuronal se repite 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 éstas aparecen como un doblete en electroforesis.<sup>5</sup>

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 mayor gravedad en los homocigotas. Lo que aparentemente produce la enfermedad es la *adquisición* de una nueva propiedad por parte de 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. Es posible que la huntingtina mutada tenga un efecto tóxico a través de algún mecanismo,<sup>10</sup> pero dada la tardía aparición de los síntomas y su progresividad, es probable que actúe interfiriendo con un proceso de reparación normalmente usado por la célula y cuya necesidad se acentúa con la edad. Otras formas de dominancia también están basadas en la interferencia con la función de la proteína normal en el citoplasma, al competir la proteína mutada con la proteína normal.

### 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.<sup>11</sup> La neurofibromatosis 1 (NF-1) es producida por una mutación del gen NF-1 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 NF-2 localizado en el cromosoma 22. 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, generalmente palpables bajo la piel o procidentes sobre ella, e infinidad de manchas o pigmentaciones epidérmicas, en especial las llamadas manchas "café con leche". Estas manchas están desde el nacimiento, mientras que los tumores se desarrollan progresivamente con la edad (fig. 6-8). También hay pequeños nódulos ("de Lisch") en el iris.

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, pseudoartrosis 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.<sup>12</sup> 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 gen de la NF-1 fue localizado en el cromosoma 17 mediante el análisis de ligamiento (véase cap. 8). 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 transcritos de una región determinada), y ha sido intensamente estudiado desde entonces.<sup>13</sup>

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  $1 \times 10^{-4}$ . El gen contiene 60 exones y, a pesar de haber sido clonado, aún no está completamente estudiado.<sup>13</sup> Contiene intrones muy variables en longitud, desde 60 pares de bases hasta el intrón gigante N° 27; este intrón muy especial contiene en su interior 3 genes pequeños, cuya transcripción se hace en sentido contrario al del gen contenedor, NF-1, es decir, de 3' a 5'; dos de estos genes corresponden a secuencias de tipo endoviral (EV12A y EV12B), pero el tercero codifica una glucoproteína componente de la mielina y presente 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), de 424 aa. (entre los residuos 1.175 y 1.524), codificado por los exones 20 al 27 (fig. 6-9).

### Mutaciones de la neurofibromina

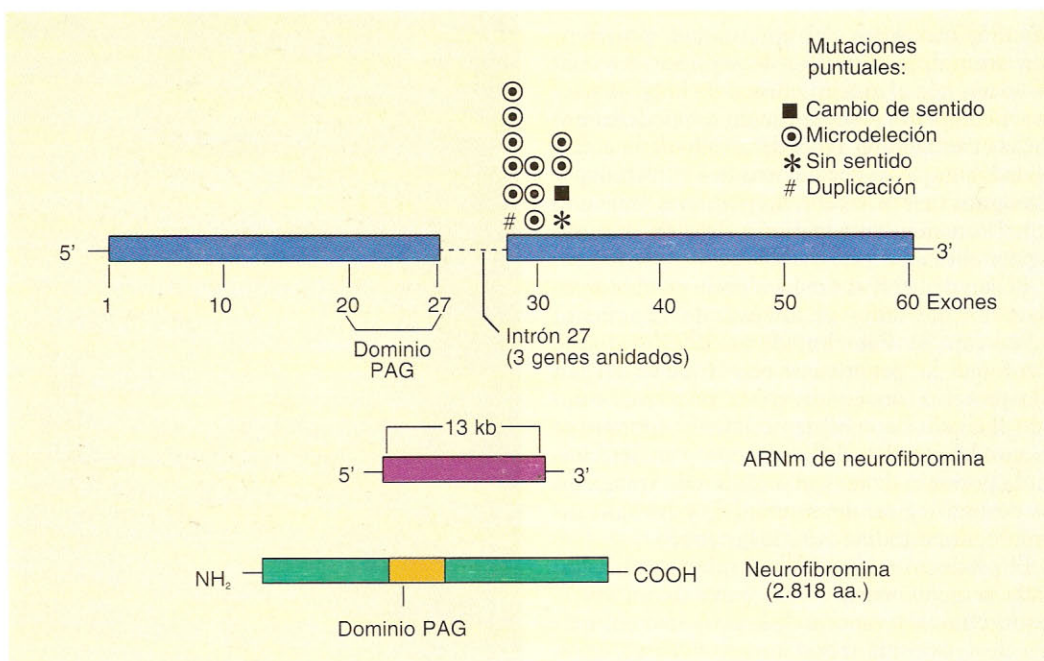
Se han detectado más de 50 mutaciones del gen de la neurofibromina, de las cuales aproximadamente la mitad son cambios pequeños (puntuales) y también un considerable número



**Fig. 6-8. Neurofibromatosis.** Neurofibromas superficiales de distinto tamaño; dos moluscos péndulos grandes. No se descubren manchas “café con leche”. (Tomada de Cordero A. y col., *Manifestaciones cutáneas de las enfermedades sistémicas*, Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1997).

de delecciones grandes; la mayoría de las mutaciones implica el truncamiento de la proteína luego del dominio PAG. Si bien estas mutaciones, al ser diferentes, no permiten más que el diagnóstico molecular de un 10-15% de los enfermos, se espera contar con un número mayor de mutaciones detectadas a medida que el gen sea completamente estudiado. Las presentes evidencias sugieren que se transcriben ambos alelos, el normal y el mutado, 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—quedando sólo el mutante—se acompaña de cambios celulares típicos del crecimiento celular en tumores malignos.<sup>14</sup> Al contrario de lo que sucede en la enfermedad de Huntington,





**Fig. 6-9.** Gen de la neurofibromina, su ARNm y la proteína (neurofibromina), con su dominio activador de GTPasa (PAG).

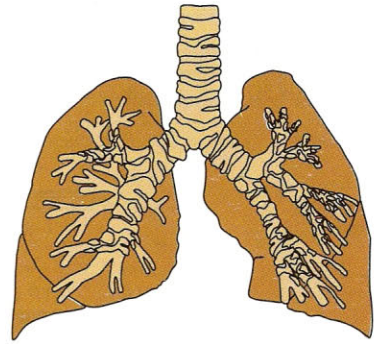
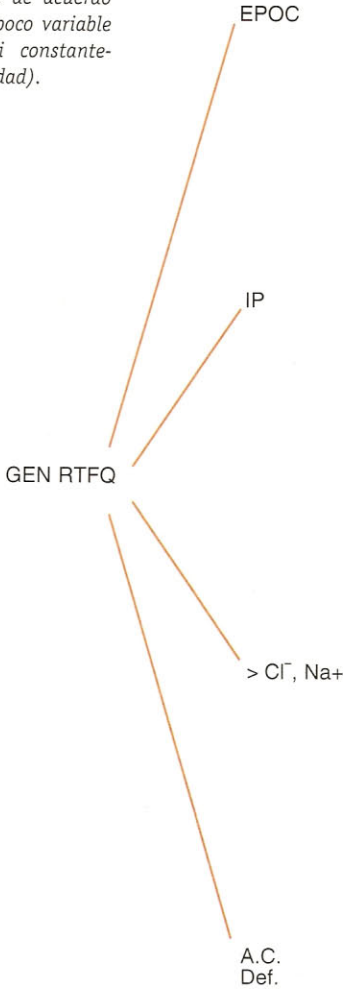
muchas mutaciones son “de novo”, es decir, que en pacientes no consanguíneos, el 50% de las mutaciones son nuevas. Este hecho contrasta con la falta (hasta ahora) de observación de un centro mutacional o “punto caliente” en el gen, es decir, hasta ahora no se ha observado una región del gen que tenga características de hiper-mutabilidad.

### Explicación de la dominancia en la neurofibromatosis

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 (onco-génico) p21<sup>ras</sup> en forma activada, con GTP, en vez de la forma inactiva, con GDP. Se cree que la neurofibromina regula a las proteínas Ras (que transmiten señales desde receptores tirosina-quinasa de membrana, hasta el núcleo), convirtiendo su forma activa con GTP a

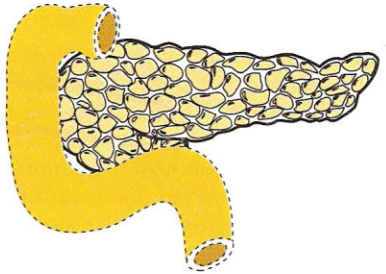
la inactiva con GDP. La neurofibromina, por su localización citoplasmática, no interviene en los fenómenos de regulación intranuclear. Las neurofibrominas normales y mutantes se encuentran ambas en cultivos de melanocitos de pacientes y en neurofibromas; pero las neurofibrominas mutantes tienen, en casi 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 el 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.

**Fig. 6-10.** 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 deferente. Niveles de variabilidad: III, muy variable; II, variable de acuerdo con la mutación; I, poco variable (se encuentran casi constantemente en la enfermedad).

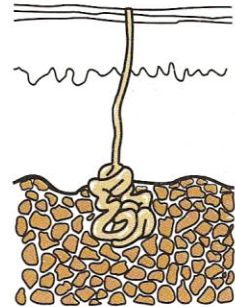


Nivel

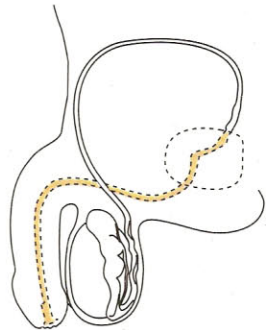
III



II



I



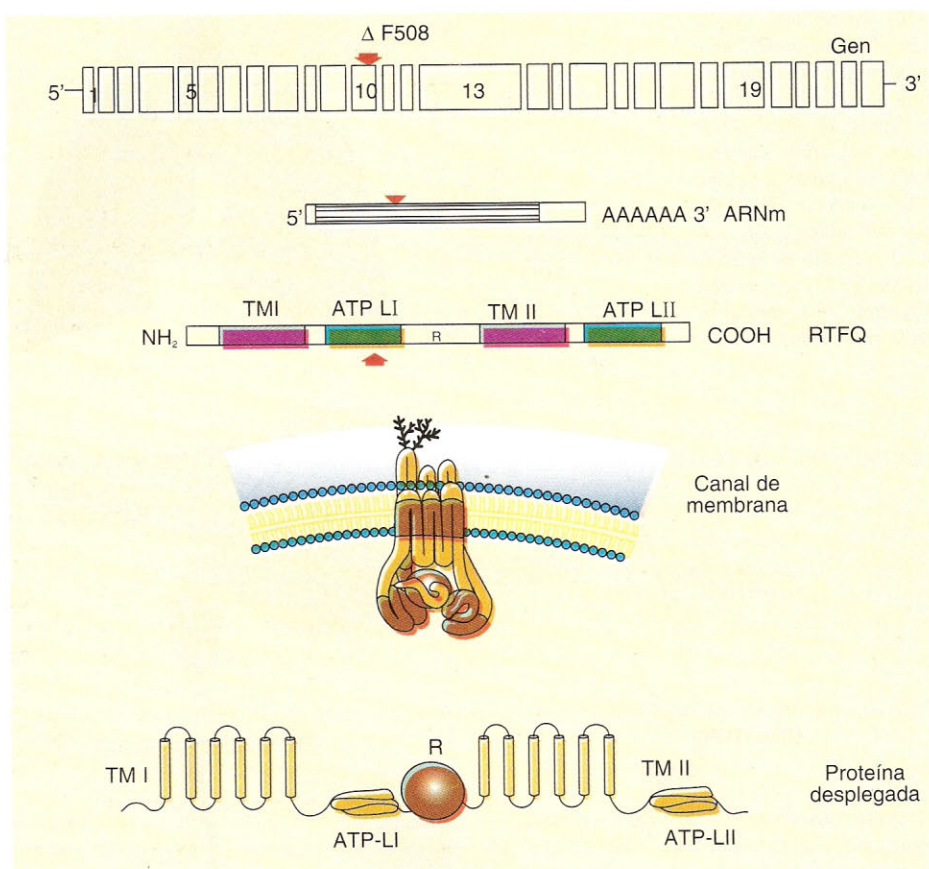
I

### Enfermedades de herencia recesiva: la enfermedad fibroquística

La enfermedad fibroquística (= enfermedad fibroquística del páncreas, mucoviscidosis, fi-

brosis quística, FQ) es una importante enfermedad hereditaria de tipo recesivo, que afecta 1 de cada 2.000 recién nacidos en las poblaciones de raza blanca, siendo menor su incidencia en las poblaciones africanas y asiáticas. Es una enfer-





**Fig. 6-11.** 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).

medad generalizada que afecta las glándulas exocrinas y las glándulas sudoríparas de todo el cuerpo, a causa de un defecto del transporte del anión  $\text{Cl}^-$  en las membranas celulares de los epitelios glandulares, y que lleva a la muerte entre los 10 y los 20 años de edad, por el desarrollo de complicaciones pulmonares y cardíacas. Los niños afectados tienen poco crecimiento de peso, malabsorción de los alimentos (por insuficiencia del páncreas exocrino) e infecciones respiratorias recurrentes; la prueba de análisis del sudor da un diagnóstico precoz, 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 aun más la ventilación

pulmonar, desembocando en una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y ésta, en la 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. 6-10).<sup>15</sup>

El gen de la enfermedad fibroquística fue localizado en el cromosoma N° 7 (7q21) por estudios de ligamiento y fue clonado en 1989.<sup>16</sup> 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 fibroquística* (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. 6-11; véase también cap. 5).

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 ion cloro dentro de la membrana citoplasmática, pero que también es capaz de regular el pasaje del ion, cuando se asocia con dos moléculas de ATP (una en cada dominio ligador de nucleótido ATP). Además, necesita asociarse con una proteínquinasa (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 proteínquinasa (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 proteínquinasa 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 6-2).

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.<sup>15</sup> El gen de este canal de cloro (RTFQ) presenta numerosas posibilidades de mutación por su gran tamaño (230 kb); en realidad, hasta 1995 se habían descrito más de 400 mutaciones diferentes del gen RTFQ;<sup>17</sup> 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  $\Delta$  F508 es una delección de tres bases en el exón 10, que no cambia el marco de lectura y

**Cuadro 6-2.** 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	Proteínquinasa	Regula la asociación ATP-dominio ligador de nucleótido

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 consiguiente, 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  $\Delta$  F508. Recientemente se ha comprobado que bajando la temperatura a 27°C en cultivos celulares, la proteína mutada de  $\Delta$  F508 es capaz de migrar hasta la membrana celular y restaurar un canal de cloro; por consiguiente, la  $\Delta$  F508 es una mutación "condicional", sensible a la temperatura.<sup>18</sup>

De las otras 400 diferentes 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:<sup>15</sup>

- Mutaciones de clase I: comprenden una mayoría de mutaciones, en las cuales el polipéptido mutante no se puede insertar en la membrana citoplasmática, por un defecto en el plegamiento o en la maduración del polipéptido, o en ambos; por ejemplo, la  $\Delta$  F508.
- Mutaciones de clase II: la proteína mutante se inserta en la membrana, pero no es funcional, porque no se abre al pasaje del ion



**Cuadro 6-3.** 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 $\text{Cl}^-$ no funcional
Secreción mucosa anormal	Poco hidratada
Acumulación de secreción	No movilizada por movimiento ciliar
Hipoventilación pulmonar	Disminución de la luz en conductos
Inflamación mucosa	Infección por <i>Pseudomonas</i>
Enfermedad pulmonar crónica	Bronquiectasias, enfisema

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; la afectación del páncreas y otras glándulas contribuye poco a la mortalidad y morbilidad, y por ello la mayor parte de los estudios se realizan sobre estas manifestaciones. 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 confiable. 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 ci-

liar y, al quedar estacionada, es colonizada por bacterias del género *Pseudomonas*, que producen inflamación muchas veces resistente a antibióticos; la mucosa se va deteriorando y producen dilataciones con contenido de secreción infectada (bronquiectasia) que conduce a una destrucción del parénquima pulmonar. El mucus en el enfermo es más viscoso porque está deshidratado: los canales no funcionando permiten un flujo de  $\text{Cl}^-$ , se retiene  $\text{Na}^+$  por un proceso complejo y, como consecuencia de esta retención de  $\text{Na}^+$ , se retiene agua que normalmente acompañaría a la secreción para volverla menos viscosa (cuadro 6-3).

### Relación entre genotipo y fenotipo en la enfermedad fibroquística

Esta enfermedad brinda una ocasión de analizar las variadas relaciones entre genotipo y fenotipo. En primer lugar, el concepto de *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 completa 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 variaciones más benignas de la FQ presentan aplasia del conducto deferente y consiguiente esterilidad. Esta aplasia se atribuye a una secreción anormal del conducto de Wolff, que produce su oclusión alrededor de la semana 18 del desarrollo embrionario.

Las manifestaciones digestivas, principalmente pancreáticas, están más visiblemente vinculadas con anomalías de la secreción: la secreción poco hidratada de los ácinos 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 conducto secretor.

Por otro lado, la enfermedad fibroquística muestra la variedad de origen: hay más de 100 mutaciones diferentes del mismo gen, muchas de las cuales dan un cuadro patológico similar, por ejemplo las que afectan el dominio ligando 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



lo 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.

### Mecanismo de la recesividad en la fibrosis quística

La enfermedad fibroquística es claramente recesiva: los heterocigotas para una de las mutaciones graves, como la  $\Delta F508$ , 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 al menos basta que 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.<sup>16</sup>

Estas observaciones han conducido a que la enfermedad fibroquística sea considerada un modelo propicio para lograr una *terapia génica*, consistente en la introducción del gen normal en una parte de las células del epitelio respiratorio. Como ocurre típicamente en las enfermedades mendelianas recesivas, la presencia del producto anormal no interfiere con la función del normal (véase panel 6-2).

### 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 tres 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 degene-

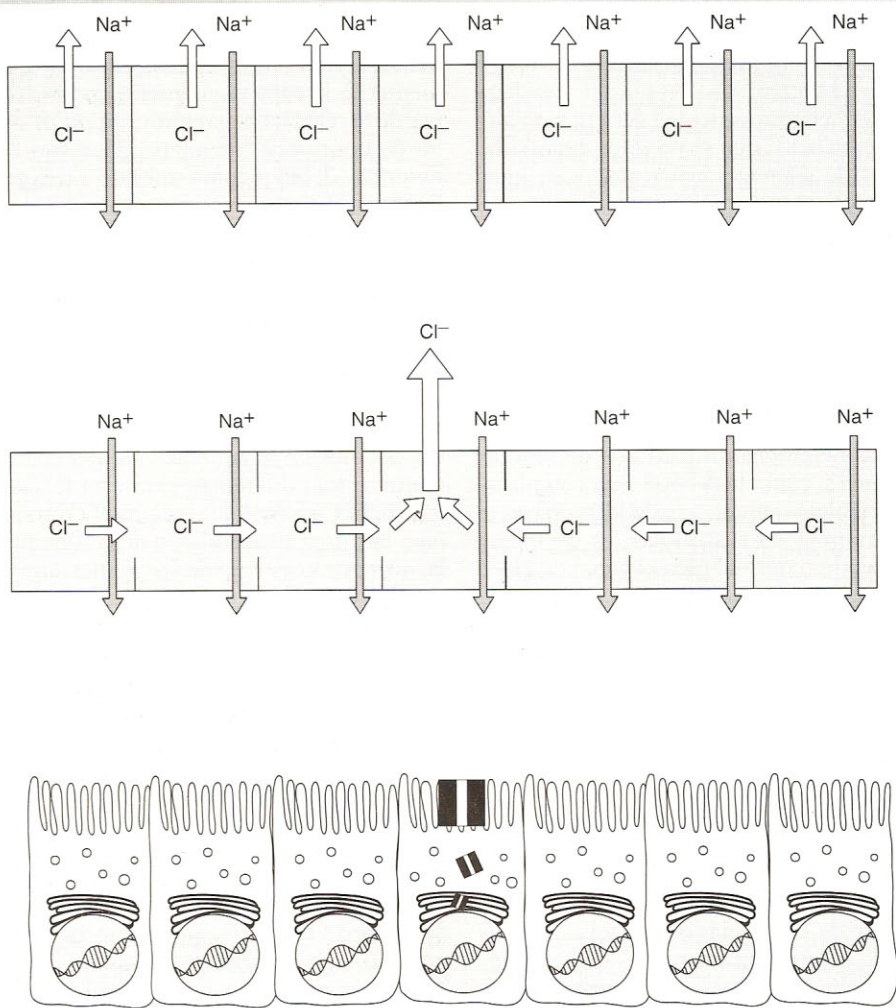
ración de bastones y conos, y aparición del pigmento de la capa pigmentaria en las demás capas de la retina, el cual forma gránulos o espículas de contornos irregulares. Hay tres tipos de herencia, *debidos como mínimo a tres genes diferentes*: el tipo menos raro, autosómico recesivo; el autosómico dominante, y el más grave, el ligado al X.

La prevalencia de este grupo de enfermedades es de 1:3.000 a 1:5.000. 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,<sup>23</sup> aunque los estudios de ligamiento asignan *cuatro* posiciones o loci diferentes para esta forma dominante; hay además dos loci en el cromosoma X para la forma ligada al X y dos, al menos, para las formas recesivas, de los cuales uno corresponde al gen de la fosfodiesterasa de los bastones retinianos.

### 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, 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 el homocigota normal, el portador sano heterocigota y el 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





**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.

**Panel 6-2. Disfunción del canal de cloro y terapia génica en la enfermedad fibroquística.** La enorme cantidad de mutaciones diferentes que pueden ocasionar la enfermedad plantea un primer problema: diagnosticar cuál es la o las mutaciones presentes. La incidencia de cada tipo de mutación varía según la región y el grupo humano: así, para Argentina, las frecuencias de cada mutación son similares a las de Europa Occidental, pero diferentes de las de otros países de Latinoamérica.<sup>20</sup> 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.<sup>21</sup> Por otra parte, los requerimientos para una eficaz terapia génica de la FQ, indican que sólo un 6 a un 10% de las células de la mucosa respiratoria requieren ser corregidas para restaurar la función normal del epitelio, debido a que las comunicaciones interepiteliales (uniones nexos) que dejan pasar iones son abundantes y permiten que varias células anormales vehiculicen sus iones a través de una sola célula con canal normal (fig. 1).<sup>22</sup> Los ensayos clínicos de terapia génica se vienen haciendo en los Estados Unidos desde 1994, siendo los que utilizan a adenovirus como vectores 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 administración, lo cual constituye la mayor barrera para esta terapia.<sup>22</sup>



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: efecto tóxico del producto del gen mutado (véase corea de Huntington); insuficiencia del alelo normal (véase neurofibromatosis); interacción con el producto normal o con el "blanco" del producto normal, compitiendo con él. Además, muchas enfermedades dominantes afectan *proteínas estructurales*, como el colágeno en la osteogénesis imperfecta, 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.

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 fenotípica: interacción alélica y epistasia

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 dife-

rente. Las interacciones alélicas son significativas en la variabilidad de la expresión génica de las enfermedades de herencia dominante.

Otro fenómeno similar es la *epistasia*: 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; aquí se resumirá la expresión génica variable en los albinismos.

### 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-IA es el tipo más común de albinismo. 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 que no es completamente conocido,<sup>24</sup> aunque el tipo más común de albinismo, llamado oculocutáneo de tipo IA, es frecuentemente producto de mutaciones del gen para la *tirosinasa* IA, mientras que el albinismo ocular más frecuente, el AO-1, se debe a un gen ligado al cromosoma X.<sup>25</sup> En los albinismos hay constantemente reducción de la agudeza visual, reducción de la pigmentación del epitelio retiniano y transposición anormal de fibras nerviosas a nivel del quiasma óptico, responsables de un temprano estrabismo. 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. 6-12).

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 a 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 específi-



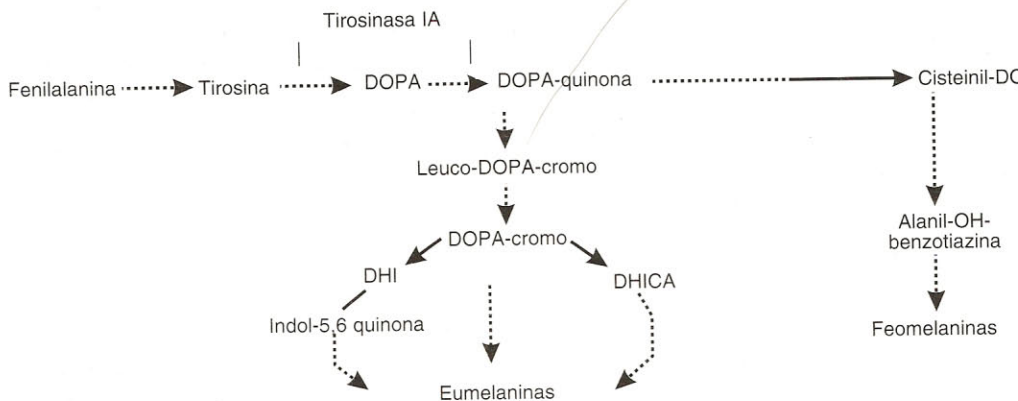


Fig. 6-12. Camino metabólico de la melanina (simplificado).

camente 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 estructuras membranosas especiales, los *melanosomas*. Los melanosomas se diferencian hasta madurar en gránulos de melanina; y 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. 6-13):

- migración de los premelanocitos a sus destinos blanco,
- organización de los melanosomas,
- síntesis de eumelaninas y feomelaninas,
- transporte de los gránulos de melanina a la periferia del melanocito, su extrusión e ingreso dentro de los queratinocitos.

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 de la cresta neural, acompaña muchas veces al pro-

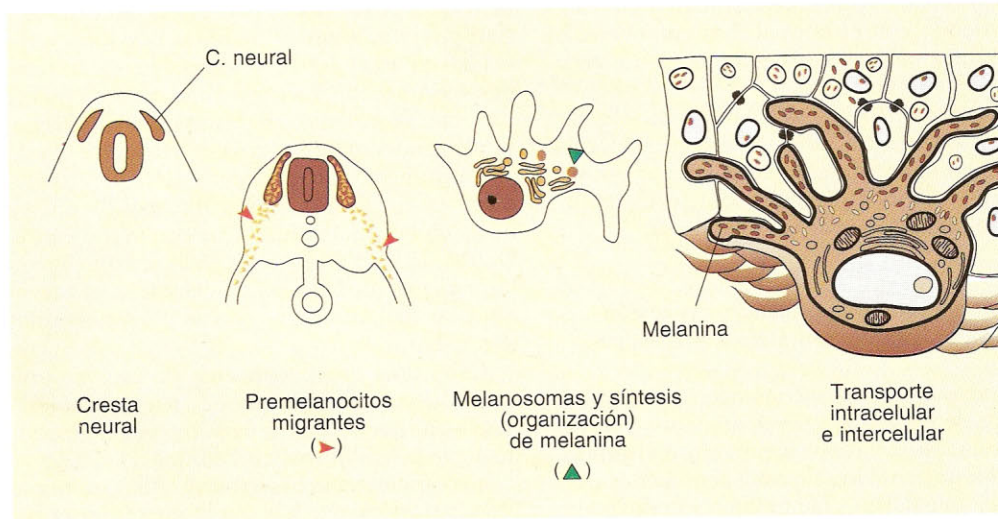


Fig. 6-13. Etapas del desarrollo de la pigmentación melanínica.

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, 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.

### Relevancia de las enfermedades mendelianas

Las enfermedades monogénicas mendelianas son raras por su incidencia individual en la población, pero muy numerosas en total, por lo cual la presencia de alguna de ellas en un grupo humano no es improbable.

Los cuadros 6-4 y 6-5 resumen unos pocos ejemplos de enfermedades mendelianas típicas;

se debe tener en cuenta que el número de enfermedades mendelianas autosómicas y dominantes catalogadas en 1992 era de 2.470, autosómicas recesivas, 647, y ligadas al X, 190, todas las cuales totalizaban 3.307 enfermedades monogénicas.<sup>26</sup>

### 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 *cromosomopatías*, generalmente no heredables y en las cuales los cromosomas o partes visibles de ellos están alterados. 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 de Huntington* ocasionada por las mutaciones del gen de la *huntingtina*, localizado en 4p16.3. Además de la dominancia, esta enfermedad exhibe la *anticipa-*

**Cuadro 6-4.** *Enfermedades de herencia autosómica dominante*

Enfermedad	Prevalencia	Características
Acondroplasia	1:10.000	Enanismo. Miembros cortos (rizomelia), lordosis, posible compresión medular
Déficit de $\alpha$ -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)	1:100.000	Adenomas sebáceos, manchas epidérmicas, gliomas y angiomas encefálicos, convulsiones
Osteogénesis imperfecta	1:60.000	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



**Cuadro 6-5.** Enfermedades de herencia autosómica recesiva (ejemplos)

Enfermedad	Prevalencia	Características
Hiperplasia adrenal de tipo III	1:5.000 según grupo	Comprende el 90% de los síndromes adrenogenitales. Defecto de la 21-hidroxilasa. Virilización
Albinismo oculocutáneo	1:35.000	Iris rosado, piel y cabello blancos. Tirosinasa negativa
Fenilcetonuria	1:10.000	Déficit de fenilalanina-hidroxilasa; idiocia fenilpirúvica
Anemia falciforme	1:1.800 (raza negra)	Hemoglobina S. Anemia, crisis vasculares
Talasemias	Muy variable	Variadas hemoglobinas anormales. Hepatoesplenomegalia, ictericia, anemia
Galactosemia	1:20.000	Déficit de Gal-1P-uridil transferasa (GALT). Vómitos, desnutrición
Tesaurosis (varias)	Variables	Acumulación tisular de sustancias: glucógeno, lípidos, etc.
Enfermedad de Tay-Sachs	1:5.000 (judíos)	Gangliosidosis de tipo I. Idiocia amaurotica

ción en generaciones sucesivas (aparición cada vez más precoz 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* 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. La *retinitis pigmenta-*

*ria* es un ejemplo de heterogeneidad genética puede ser causada por lo menos por tres genes muy diversas características; y 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 *popigmentación*.

Las enfermedades monogénicas mendelianas, individualmente raras, son muy numerosas (más de 3.300 catalogadas) y son las más características de las enfermedades hereditarias.

## REFERENCIAS

1. Morell V. Huntington's gene finally found. *Science* 1993; 260:28-30.
2. 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.
3. Rie O, Winkelman B, Epplen JT. Towards the complete genomic map and molecular pathology of human chromosome 4. *Hum Genet* 1994; 94:1-18.
4. Bates G, Lehrach H. Trinucleotide repeat expansion and human genetic disease. *Bioessays* 1994; 16:284.
5. Trottier Y, Devys D, Imbert G, Saudou F, An I, L. Weber Ch, Agid Y, Hirsch EC, Mandel JL. Cellular localization of the Huntington's disease protein and its implication in the normal and mutated form. *Nat Genet* 1995; 10:104-110.
6. Rubinstein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Kumar S, Ramesar JO, Bontrop R, McMahon R, E. DE, Ferguson-Smith M. Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. *Nat Genet* 1994; 7:525-530.
7. Brinkman RR, Mezei MM, Theilmann J, Almqvist A, Hayden MR. The likelihood of being affected by Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1202-1211.

8. Perutz MF. Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Current Op Structural Biol* 1996; 6:848-858.
9. Wexler NS, Young AB, Tanzi RE et al. Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 1987; 326:194-197.
10. Housman D. Gain of glutamines, gain of function? *Nature Genet* 1995; 10:3-4.
11. Riccardi VM. Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis, 2<sup>da</sup> edición, Baltimore, John Hopkins University Press, 1992.
12. Riccardi VM. Genotype, malleotype, phenotype and randomness: lessons from neurofibromatosis-1 (NF-1). *Amer J Hum Genet* 1993; 53:301-304.
13. 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.
14. De Clue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N et al. Abnormal regulation of mammalian p21<sup>ras</sup> contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell* 1992; 69:265-273.
15. Tsui L-C. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends in Genetics* 1992; 8:392-398.
16. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992; 256:774-779.
17. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (Kazakian HH): Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Human Mutat* 1994; 4:167-177.
18. 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.
19. Dean M, Santis G. Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. *Hum Genet* 1994; 93:364-368.
20. Chertkoff L, Visich A, Bienvenu T, Grenoville M, Segal E, Carniglia L, Kaplan JC, Barreiro C. Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 1997; 51:43-37.
21. Zielinski J, Tsui L-C. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Ann Rev Gent* 1995; 29:777-807.
22. Boucher RC. Current status of CF gene therapy. *Trends in Genet* 1996; 12:81-84.
23. Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandel DW, Sandberg MA. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 1990; 343:364-366.
24. Hearing VJ. Unraveling the melanocyte. *Am J Hum Genet* 1993; 52:1-7.
25. Bassi MT, Schaffino MV, Renieri A, De Nigris F, Galli L, Bruttini M, Gebbia M, Bergen AAB, Lewis RA, Ballabio A. Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome. *Nature Genet* 1995; 10:13-19.
26. McKusick VA, Francomano CA, Antonarakis SE. *Mendelian Inheritance in Man*. John Hopkins University Press, Baltimore, 10th edition, 1992.

#### BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

- Buyse ML (editor). *Birth defects encyclopedia*. Center for Birth Defects Information Services, Inc.; Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Vols. I-II 1990.



# Capítulo

7

## ***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 de HAM y el de RA. Alteraciones genéticas de la determinación sexual***

### **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 (véase más adelante), no es una relación simple, como se creyó durante la mayor parte de este siglo. 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 deter-

minación 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.<sup>1</sup> Sucesivas especializaciones 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 encuentra el gen SRY y sus genes dependientes (o funcionan anormalmente), 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.

Los genes sexuales influyen poderosamente en la constitución 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 (fertilidad) del testículo.

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 inviable el desarrollo embrionario con el genoma proveniente de un solo progenitor.

### 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 despojar al tema científico de la determinación sexual de 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 de *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 7-1).<sup>2</sup>

### Homologías embrionarias de los sexos en la especie humana

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),<sup>3</sup> cuando el embrión posee el gen *SRY*, que determina la "comutación" 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 externos. En el cuadro 7-2 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. 7-1).

### Diferenciación de la gónada primitiva: conceptos generales

Las etapas iniciales de la diferenciación de la gónada primitiva han sido estudiadas principalmente en la rata<sup>4</sup> y en el ratón.<sup>5,6</sup> Una de las primeras evidencias de la diferenciación de la gónada (hacia testículo) es el desarrollo de un re-



**Cuadro 7-1.** 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 2 <sup>do</sup> 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 (pseudohermafroditismos)	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

tículo 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).<sup>4</sup> Otro indica-

dor 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.<sup>5</sup> 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

**Cuadro 7-2.** Homologías de órganos y estructuras masculinas y femeninas

	Masculino	Femenino
Gónada	Célula de Leydig Célula de Sertoli Espermatogonios Rete testis	Célula intersticial Célula folicular ovárica Ovogonios (ovario embrionario) Red ovárica
Conductos	Epidídimo Conducto deferente Hidátide testicular	Epoóforo Conducto de Gartner Trompas, útero y 1/3 superior de la vagina
Genitales externos	Pene Cuerpo esponjoso Escroto Próstata Glándulas de Cowper Utrículo prostático	Clítoris Labios menores Labios mayores Glándulas de Skene (parauretrales) Glándulas de Bartholin 2/3 inferiores de la vagina

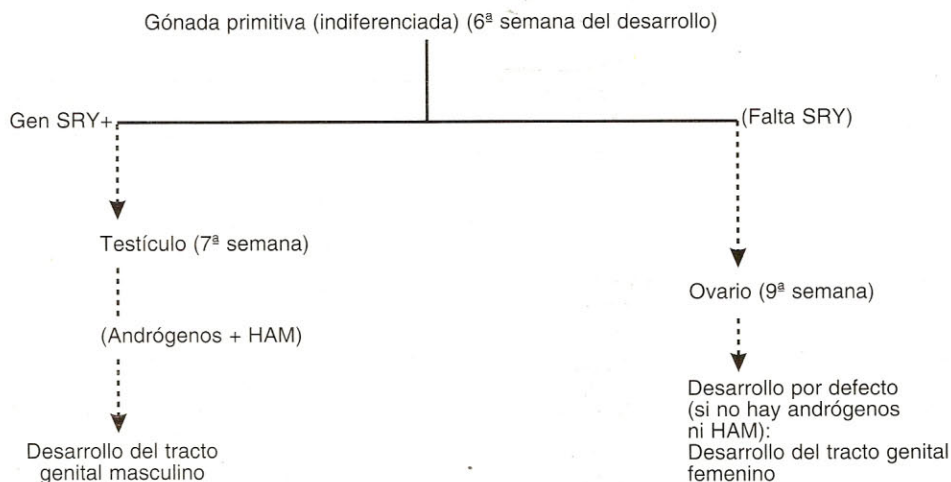


Fig. 7-1. Esquema general del desarrollo embrionario sexual humano. HAM: hormona anti-mülleriana.

los primeros signos de diferenciación de células de Sertoli,<sup>6</sup> 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.<sup>7</sup> 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.<sup>8</sup> Las células germinales (gonocitos) que se originan en la región basal de la alantoides<sup>9</sup> 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 diferenciaban 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.<sup>5</sup> 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 espermatogonios y espermatocitos del testículo adulto y, en menor grado, en las células de Sertoli adultas.<sup>10</sup> Esta función no es conocida, pero dadas las características del gen, podría ser de regulación inhibitoria (véase más adelante) en procesos de las células germinales del adulto.

### 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”.<sup>11</sup>

Los gonocitos son células grandes, con abundantes polirribosomas y expansiones citoplasmáticas relacionadas con su capacidad de movi-



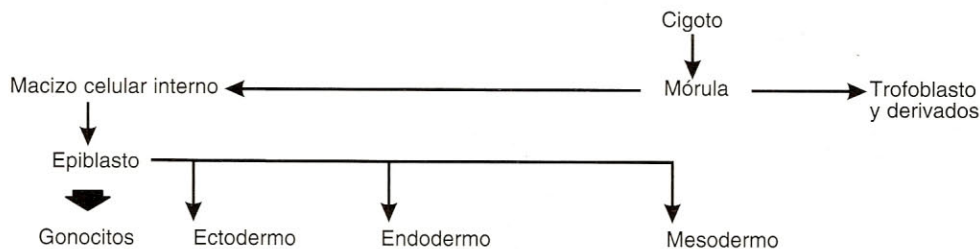


Fig. 7-2. Linaje de las células germinales primitivas.

miento 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. 7-2).

## 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.<sup>12</sup> 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.

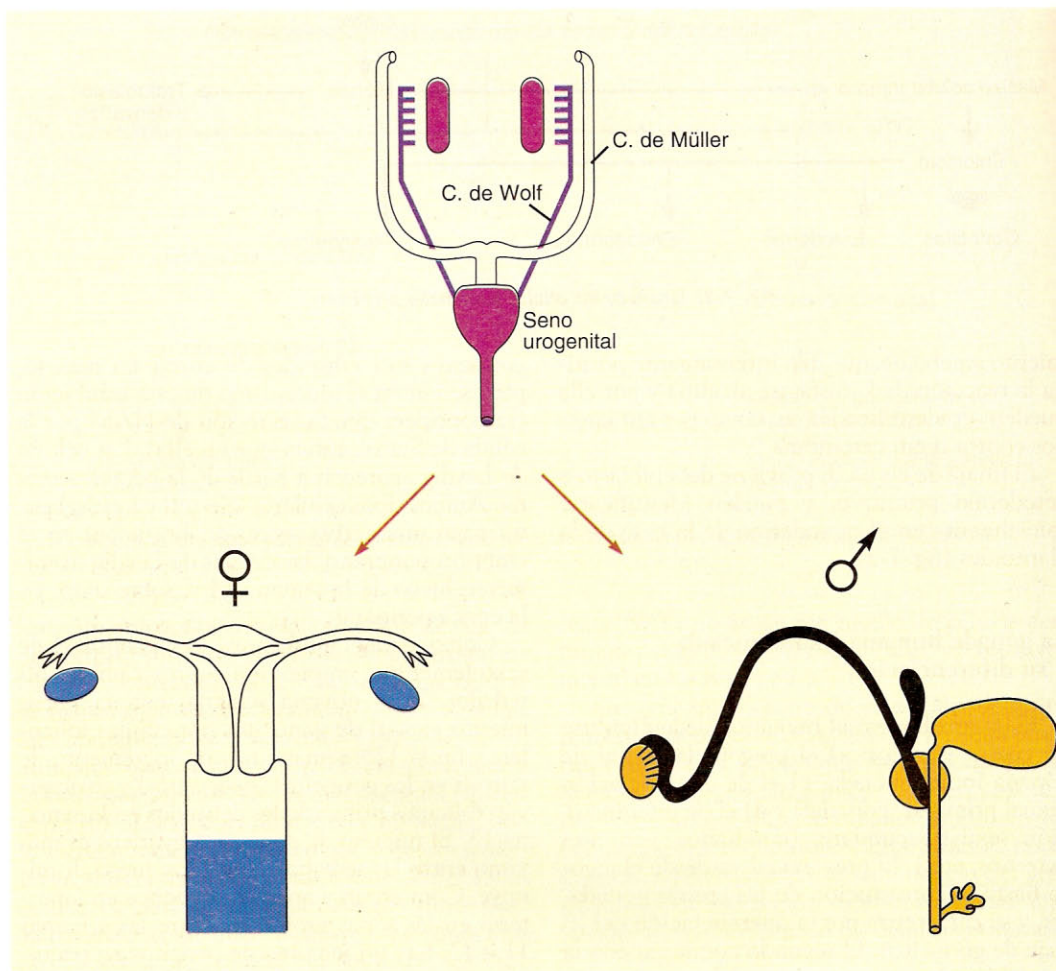
En la sexta semana, la gónada indiferenciada está formada en ambos sexos por células del epitelio celómico, mesénquima y gonocitos. El origen de las células epiteliales no germinales no está definido, aunque hay evidencia de que se diferencian del mesénquima, y éste proviene probablemente del esbozo 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 se ignora el mecanismo de esta inhibición (se considera que la secreción de HAM por la célula de Sertoli interviene en ella). 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 alrededor de la novena semana, con englobamiento parcial de gonocitos por células foliculares. En la 12<sup>ma</sup> semana hay un incremento de mitosis en los gonocitos (ovogonios) 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.<sup>13</sup> 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<sup>12</sup> en los primeros seis meses (aunque hay actividad de aromataasa) y carece de receptores para 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 *mesonefricos* o de Wolff, que circulan por el interior del mesonefros y luego hasta la cloaca, y 2) los conductos *paramesonef-*



**Fig. 7-3.** Conductos genitales (de Wolff y de Müller) y sus cambios posteriores.

fricos 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. 7-3).

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 cambios 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 con-

ductillos 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 semana 8 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  $5\alpha$ -reductasa, capaz de convertir la testosterona en dihidrotestosterona, andrógeno especialmente importan-



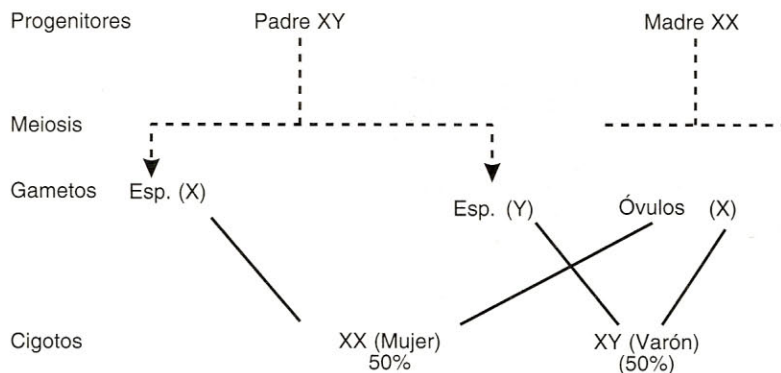


Fig. 7-4. Esquema de la determinación sexual por heterogametismo masculino. Esp.: espermatozoides.

te 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  $5\alpha$ -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 de siglo, con los trabajos de E. B. Wilson,<sup>1</sup> 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.<sup>1</sup> 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. 7-4).

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 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 ha ido conociéndose en detalle en los últimos años. 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 “pseudoautosómica”.

## 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 N° 22 y N° 21 son menores), y es subacrocéntrico, con un brazo largo que posee una gran zona heterocromática terminal (“Yqh”). Los patrones de bandeo G de ambos cromosomas sexuales son característicos y permiten su identificación inequívoca en los cariotipos (fig. 7-5).

## 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 espe-

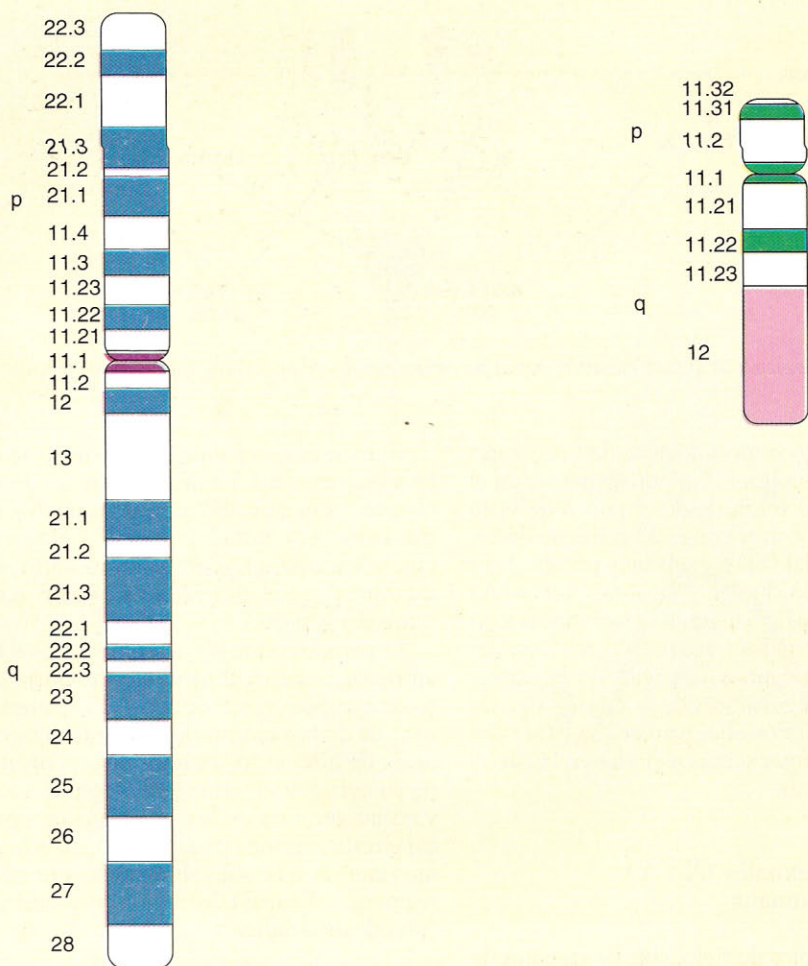
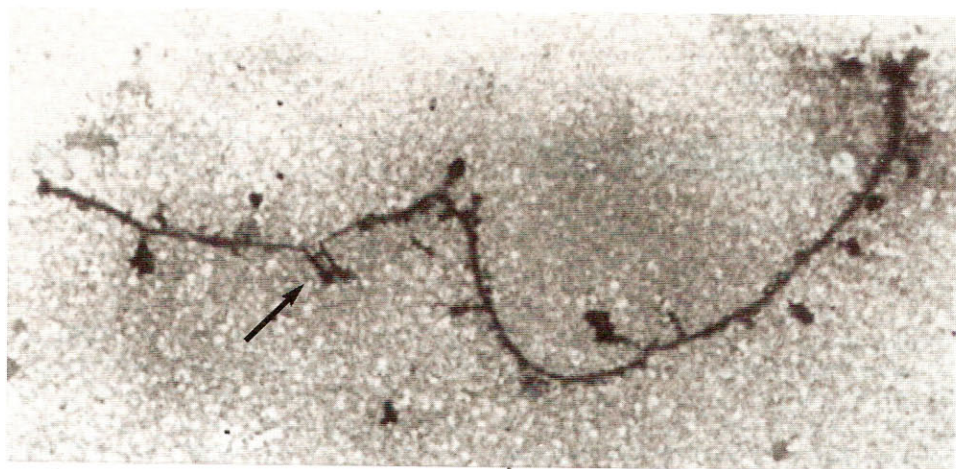


Fig. 7-5. Morfología y patrón de bandas G de los cromosomas X e Y humanos.

cial durante la profase meiótica de los espermatoцитos en el testículo humano.<sup>1</sup> 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".<sup>14</sup> 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",<sup>15</sup> de modo que quedó comprobado que existe *apareamiento parcial* entre el X y el Y humanos. Este apareamiento o sinapsis parcial es muy evi-

dente en las preparaciones hechas por "extendido" (fig. 7-6). La mayor parte de ambos cromosomas no se aparean, formando las regiones llamadas "diferenciales". En la meiosis, las regiones *diferenciales* de los ejes en el cuerpo XY humano sufren una serie de modificaciones estructurales (se ramifican, se forman "excrecencias", se anastomosan y forman nódulos de intercambio), que permiten determinar un patrón temporal de las secuencias de eventos durante el estadio de paquiteno.<sup>16</sup> Por otra parte, por esos 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





**Fig. 7-6.** Par XY humano que muestra la región de apareamiento con el complejo sinaptonémico y un nódulo de recombinación (flecha) (10.000  $\times$ ).

que siempre se encuentra en la región terminal del segmento apareado; es decir que el apareamiento promedio (de 1,33  $\mu\text{m}$  en el XY humano)<sup>16</sup> es mayor que el segmento que realmente participa en la recombinación. Este segmento recombinante es pequeño y constituye la región recombinante o "pseudautosómica".

### Contenido génico: región pseudautosómica (RPA) de los cromosomas X e Y

La región recombinante o pseudautosómica en la especie humana está constituida por 2,5 Mb de ADN, y es completamente homóloga en el X y en el Y.<sup>1</sup> Esto es así porque continuamente, en cada generación, en los espermatoцитos 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 y 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%.<sup>17</sup> Sin embargo, la recombinación puede producirse al azar en cualquier lugar de la región pseudautosómica (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 dis-

tancia 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 (probablemente menos de 10), un grupo de secuencias polimórficas que han servido como marcadores, y finalmente los telómeros de Xp y de Yp. Los genes conocidos en la RPA son,<sup>18</sup> 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 adenina-nucleótido translocasa, que en las mitocondrias cataliza la translocación de ADP y ATP en la membrana interna, siendo una enzima de "mantenimiento" muy conservada desde el punto de vista evolutivo; 5) el gen IL3RA, que codifica la subunidad  $\alpha$  del receptor para la interleuquina, y 6) el gen CSF2RA, que codifica el receptor  $\alpha$  para el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (fig. 7-7). Recientemente se caracterizó un gen aun más distal, el gen SHOX, relacionado con la estatura (ver cap.1).

### Contenido génico del cromosoma Y

El cromosoma Y humano es pequeño (su longitud es el 2,15% del largo total del conjun-

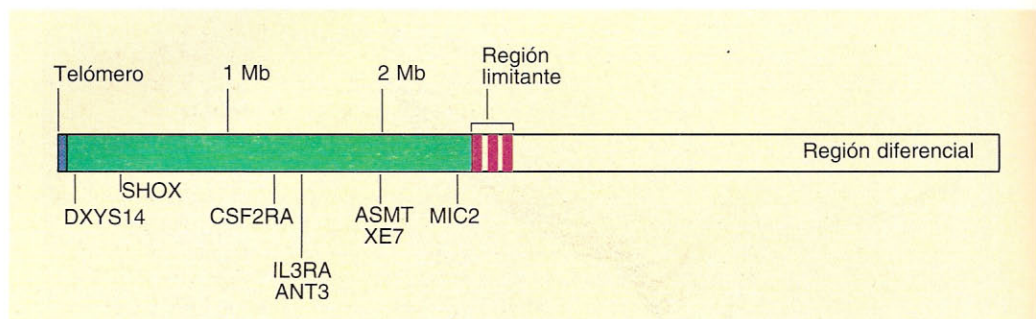


Fig. 7-7. Mapa de la región pseudoautosómica humana y los genes conocidos en ella.

to haploide de cromosomas),<sup>1</sup> y contiene aproximadamente el 1% del ADN de una célula diploide 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 12 genes y pseudogenes,<sup>19</sup> 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 TSPY (proteína específica de testículo, Y), el de la amelogenina (AMGY), el del antígeno de histocompatibili-

dad (H-Y), el relacionado con el síndrome de Kallmann (KALIG-1Y) y el factor de la azoospermia (AZF) (fig. 7-8).

### 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, obligadamente, en el varón, mientras que

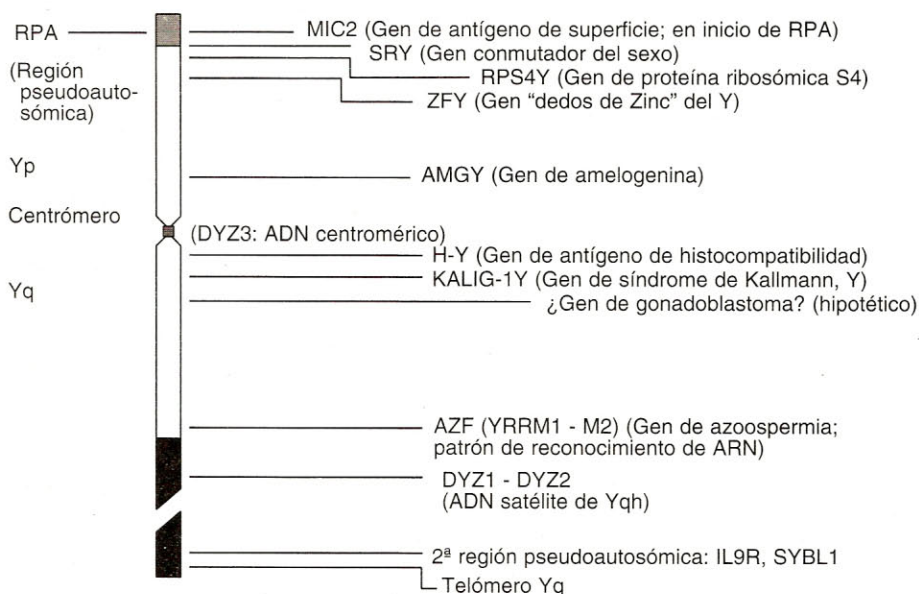


Fig. 7-8. Disposición de algunos genes en el cromosoma Y humano. Se incluye en el extremo de Yq la diminuta segunda región pseudoautosómica y sus dos genes recientemente reconocidos: IL9R (receptor de interleuquina 9) y SYBL1 (símil de sinaptobrevina).



en la mujer en general no se expresan (por ser heterocigotas y por el mosaicismo debido a la clonización del X; véase más adelante).

El cromosoma X humano contiene aproximadamente 164 Mb de ADN,<sup>20</sup> de las cuales 62 Mb corresponden a Xp; en la actualidad se conocen un centenar y medio de genes identificados y localizados en este cromosoma.<sup>21</sup> El número total de genes en el cromosoma X humano es seguramente superior a un millar (probablemente entre 1.500 y 2.500), pero tomará tiempo la identificación precisa de muchos de ellos, por desconocerse su función.

En el cuadro 7-3 se resume la localización de algunos de los más importantes genes conocidos del cromosoma X humano.<sup>21</sup>

### El gen determinante de testículo: SRY

Desde el descubrimiento en 1959 de las fórmulas cromosómicas XXY en el síndrome de Klinefelter y XO 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 reyección 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 segmento de ADN del cromosoma Y que contiene el gen SRY.<sup>22</sup>

El gen SRY, curiosamente, se encuentra casi en el borde (a 5 kb) de la región pseudoautosómica del cromosoma Y, que es homóloga a la del X y recombina con ella; por esto no es sorprendente 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 aminoácidos, que son producidos a partir de un ARN transcrito de 1,1 kb (fig. 7-9).<sup>23</sup> 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.<sup>24</sup> La regulación de este promotor no es conocida.

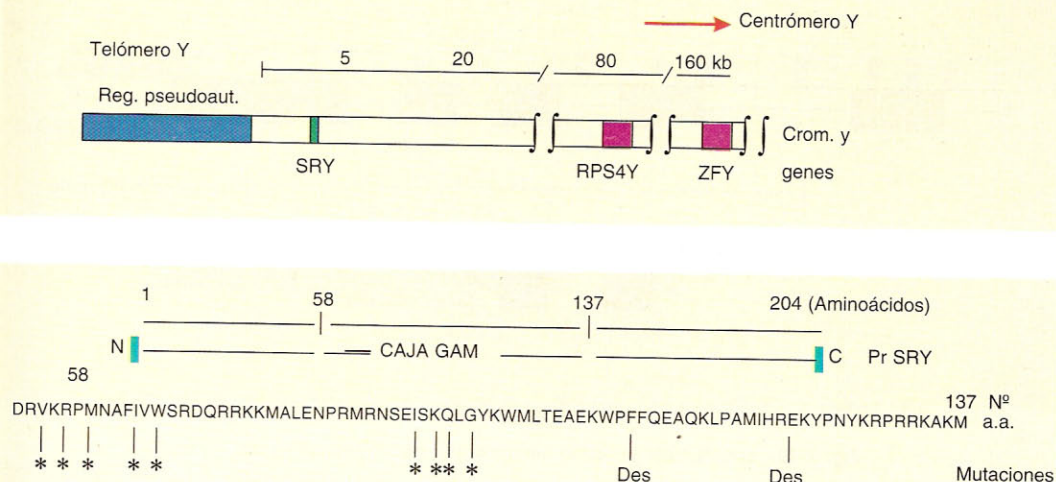
Hay más de 20 mutaciones registradas del gen SRY que producen reversión sexual, y todas ellas menos una recaen sobre la codificación de la "caja GAM". Por otra parte, esta secuencia de 80 aminoácidos en la "caja" está conservada; es muy similar en el ratón, el conejo, el perro y en otros 12 mamíferos, aunque con porcentajes de homología menores en especies más alejadas filogenéticamente de la humana (así, en el marsupial *Sminthopsis macroura* la identidad de la secuencia de la caja es sólo el 59% 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 (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  $\alpha$  hélices.<sup>25</sup> La "caja GAM" es necesaria y suficiente, en la proteína SRY, para unirse al ADN. La

**Cuadro 7-3.** 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 150) y el total puede superar el millar (Wang y col., 1994)

Abreviatura	Nombre del gen	Posición	Comentario
pter	Telómero del brazo corto de X		
CSF2RA	Receptor $\alpha$ del factor de crecimiento de leucocitos	RPA (p22.32)	No lyonizado
IL3RA	Receptor $\alpha$ de interleuquina 3	RPA	"
ANT3	Adenina-nucleótido translocasa	RPA	"
ASMT	Acetil-serotonina metiltransferasa	RPA	"
MIC2	Antígeno MIC2	RPA	"
XG	Antígeno XG	p22.3	Grupo sanguíneo Xg
CDPX1	Condrodysplasia punctata	p22.3	(Cerca del inicio de la región diferencial del X)
STS	Sulfatasa esteroideal	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, $\alpha$ -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-deshidrogenasa E1 $\alpha$	p22.1	
HYP	Hipofosfatemia		Mutación "gyro" en ratón
ZFX	"Dedos de Zn", ligado al X	p22.1	Homólogo del ZFY
POLA	$\alpha$ -Polimerasa (DNA)	p22.1	
DMD	Distrofia muscular (Duchenne-Becker)	p21.3	Distrofina (gen gigante)
CYBB	Citocromo B, $\beta$	p21.1	Granulomatosis crónica
OTC	Ornitina carbamoiltransferasa	p21.1	Mutante "sparse fur" en <i>Mus</i>
MAOA	Monoaminoxidasa A	p11.3	
MAOB	Monoaminoxidasa B	p11.3	
ARAF1	Oncogén V-raf	p11.3	Homólogo del de sarcoma ( <i>Mus</i> )
SYN1	Sinapsina I	p11.23	
TIMP1	Inhibidor de metalproteasa	p11.4	
IP1	Incontinencia pigmenti	p11.21	
DXZ1	ADN satélite centromérico	CEN	CENTRÓMERO DEL X
RA	Receptor de andrógenos	q11.2	Feminización testicular
EDA	Displasia ectodérmica	q12	Displasia anhidrótica
CCG1	Ciclo celular, defecto G1	q13.1	
RPS4	Proteína ribosómica S4	q13.1	
XIST	X-inactivo, transcripto específico	q13.2	Centro inactivador del X
MNK	Enfermedad de Menkes	q13.3	
GLA	$\alpha$ -Galactosidasa	q21.3	
PLP	Proteína proteolípídica	q21.33	Enfermedad de Pelizaeus
LYP	Síndrome linfoproliferativo	q25	
HPRT	Hipoxantina fosforribosil transferasa	q26	Síndrome de Lesch-Nyhan
F9	Factor IX de la coagulación	q26.3	Hemofilia B (enfermedad de Christmas)
FRAXA	Sitio frágil del X (A)	q27.3	Síndrome del X frágil
IDS	Iduronato-2-sulfatasa	q27.3	Síndrome de Hunter
GABRA3	Receptor $\alpha$ 3 de GABA	q28	
RCP	Pigmento de conos del rojo	q28	Daltonismo protanope
GCP	Pigmento de conos del verde	q28	Daltonismo deuteranope
G6PD	Glucosa 6-P deshidrogenasa	q28	
F8	Factor VIII de la coagulación	q28	Hemofilia A
qter	TELÓMERO DEL BRAZO LARGO DEL X		





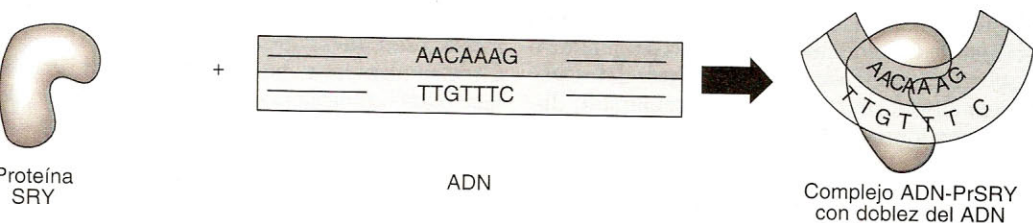
**Fig. 7-9.** Organización del gen *SRY* humano. La proteína *SRY* está escrita en el código de letra única para aminoácidos. En la línea inferior están señaladas algunas de las mutaciones puntuales del gen *SRY* que provocan reversión sexual (asteriscos). Des: mutaciones de des Encuadre.

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. 7-10).

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 doblaje 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 doblaje, 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 doblaje del ADN y además disocia el apilamiento de pares de bases del ADN.<sup>26</sup>

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 no está precisada, de modo que altera su transcripción. Una hipótesis plausible es que la acción inicial de la *SRY* es



**Fig. 7-10.** Interacción entre la proteína *SRY* y la molécula de ADN con el heptanucleótido AACAAAG. La proteína *SRY* puede unirse a otras secuencias parecidas.

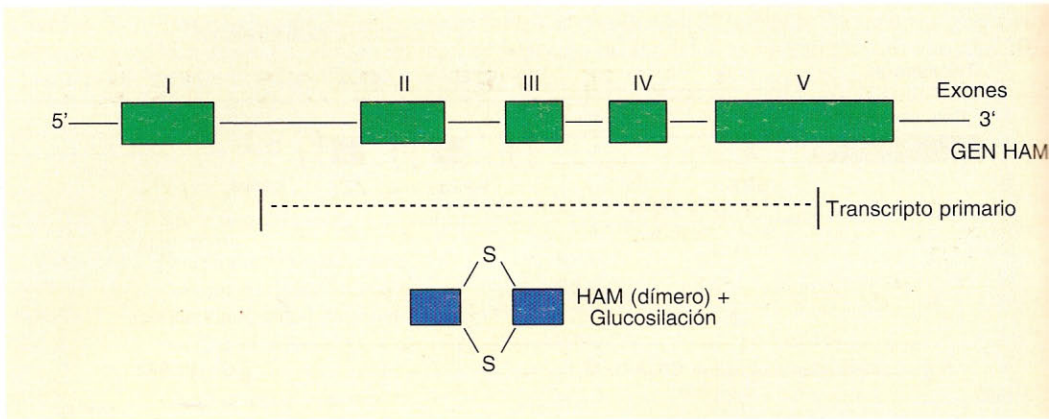


Fig. 7-11. Esquema del gen de la hormona anti-mülleriana y su producto.

inhibitoria (cancela una transcripción) de un supuesto elemento Z, que a su vez inhibe el desarrollo de la gónada masculina, por lo cual su acción finalmente deja libre la formación de testículo.<sup>25</sup>

### El gen de la hormona anti-mülleriana (HAM, MIS: Müllerian Inhibiting Substance)

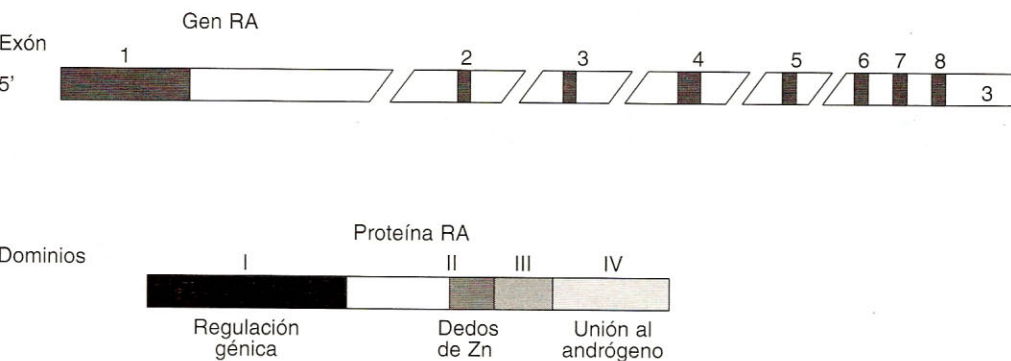
La hipótesis de que el testículo embrionario produce una sustancia inhibidora de los conductos de Müller, que actúa a distancia sobre órganos blanco —como una hormona—, la Hormona Anti-Mülleriana (HAM; MIS: Müllerian Inhibiting Substance), se debe a Alfred Jost, quien en los experimentos ya citados demostró 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  $\beta$  de Factores de Crecimiento y Transformación (TGF $\beta$  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 semana 8; dicha secreción es máxima durante la regresión de los conductos de Müller, aunque sigue segregándose durante el resto de la gestación y durante la época posnatal, siendo el ARNm de la HAM 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 secundotesticulares. 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 5 exones. El ARNm de la HAM es de 2 kb (fig. 7-11).

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 mutante provoca la falta de unión con la proteína SRY, aunque no impide la transcripción del gen HAM;<sup>26</sup> es decir que la SRY no actúa directamente sobre el gen HAM, pero puede actuar de forma indirecta (ayudando o inhibiendo otro factor proteínico que se asocia al promotor). Otras evidencias sugieren que el HAM no es un 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).





**Fig. 7-12.** Esquema del gen de receptor de andrógenos RA y su producto, la proteína RA.

### El gen del receptor de andrógenos (RA = AR) y los efectos de esteroides

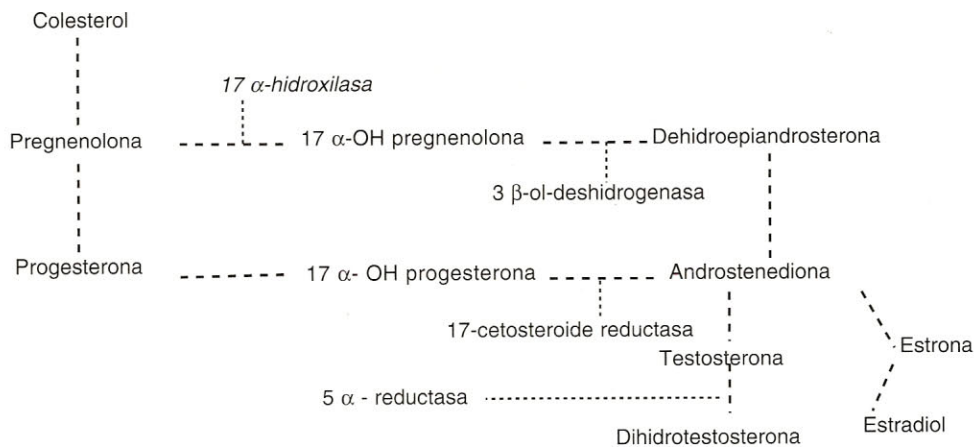
Las hormonas esteroideas tienen efectos fundamentales sobre la diferenciación sexual en todos los vertebrados, y en todos ellos, salvo en los mamíferos, es posible invertir el sexo gonadal con hormonas esteroideas.<sup>1</sup> Precisamente en los mamíferos ha surgido durante la evolución una superestructura 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 4 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. 7-12). La proteína RA necesita estar unida al andrógeno esteroide para poder regular la transcripción de genes andróge-

no-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 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. El gen RA es extenso (90 kb), con 8 exones, separados por algunos intrones extensos y otros menores (fig. 7-12).

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" CAG-CAG... 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 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-



**Fig. 7-13.** Camino metabólico de los andrógenos.

no. 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 masculinizan 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 5 $\alpha$ -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. 7-13).

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 5 $\alpha$ -reductasa. El receptor de andrógenos RA tiene mayor afinidad por la DHT que por la T. Durante la embriogénesis, la actividad de 5 $\alpha$ -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 5 $\alpha$ -reductasa se encuentra en el cromosoma 5 y consta de 5 exones, que codifican una proteína mediana, de 254 aminoácidos. La delección o mutación importante de este gen puede producir un síndrome de deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa, de pseudohermafroditismo masculino, con hipospadias perineoscrotal, pseudovaginal. 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; 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.<sup>1</sup> 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. Aunque no están identificados los genes "blanco" del SRY, es probable que la acción principal del SRY sea inhibitoria, al menos sobre un gen que trava el desarrollo testicular; es decir que el producto SRY libera el camino para la formación de testículo; y no estando el SRY, obligadamente se desarrolla el sexo constitutivo o, por defecto, el femenino. Se ha postulado un factor



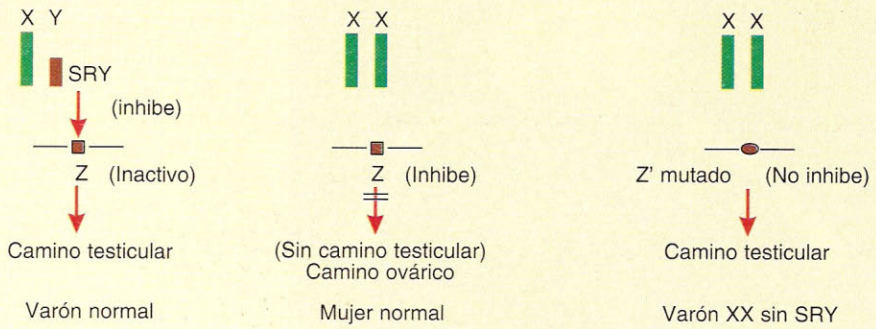


Fig. 7-14. Hipótesis del gen "Z", blanco del SRY.

"Z" como inhibidor del desarrollo testicular y blanco normal del SRY.<sup>27</sup> Esta hipótesis surge de la observación de algunos casos de "hombres XX" que no poseen SRY; en estos casos, el hipotético factor Z estaría inactivado por mutación, permitiendo el desarrollo masculino (fig. 7-14).

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 (7<sup>ma</sup> 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 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 promotora del gen 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. 7-15) (véase panel 7-1).<sup>28</sup>

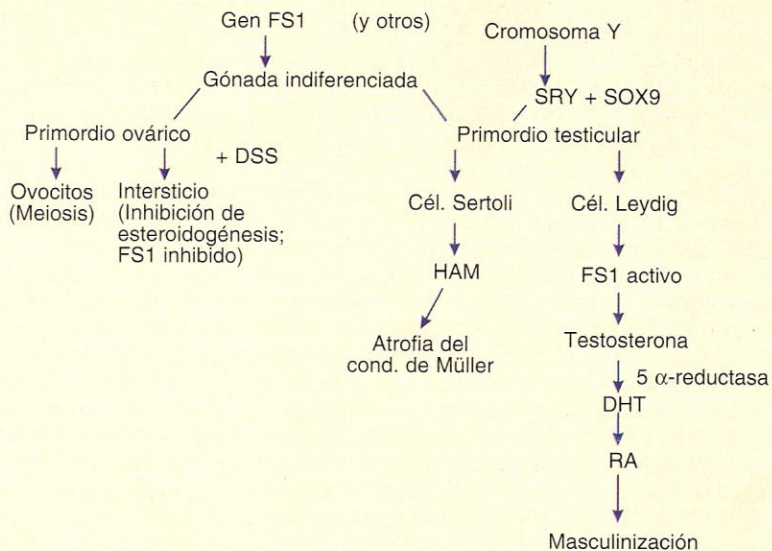
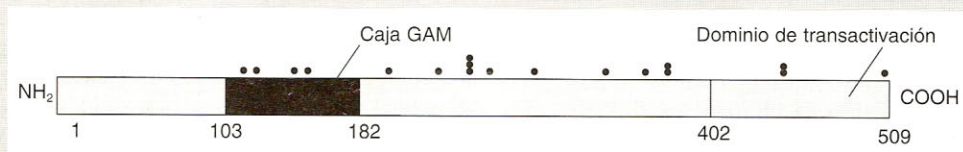


Fig. 7-15. Ubicación de algunos de los factores genéticos conocidos en el desarrollo sexual. SOX9, DSS: genes vinculados a la determinación sexual (ver paneles N° 1 y 2).





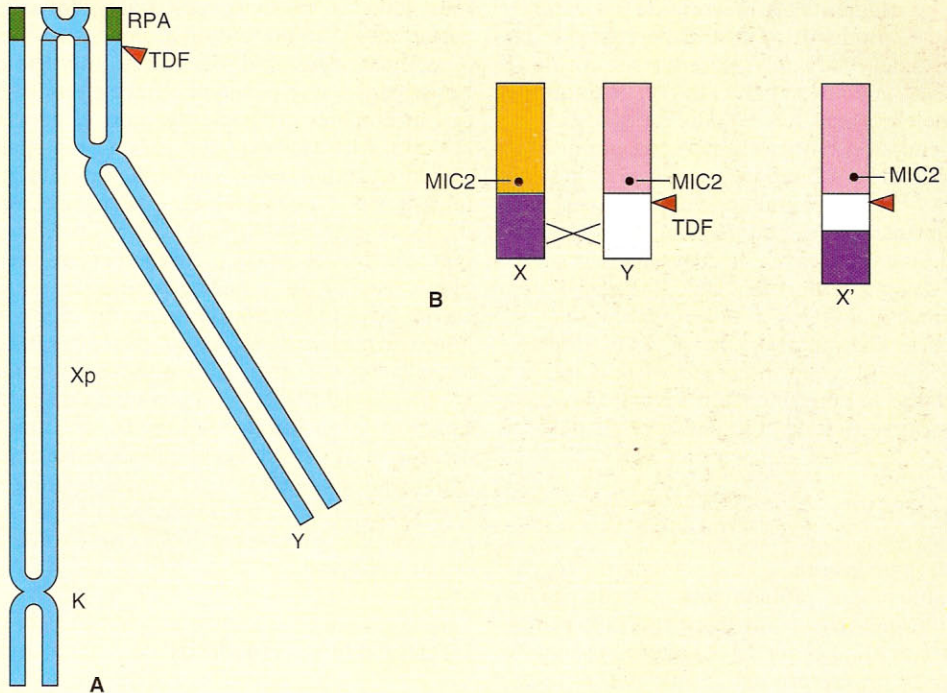
**Fig. 1.** Radiografía de un caso de displasia campomélica (de Silverman, FN, Kuhn, S.: "Essentials of Caffey's Pediatric X-ray Diagnosis", fig. 21-139 [(B)], con autorización de la Editorial Médica Panamericana).



**Fig. 2.** Proteína codificada por el gen SOX9. Algunas de las mutaciones de la displasia campomélica con reversión sexual se señalan arriba de la proteína.

**Panel 7-1. La displasia campomélica. El gen SOX9 y los efectos de sus mutaciones: reversión sexual y displasias congénitas.** 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.<sup>29</sup> El gen responsable de la displasia campomélica fue localizado en el cromosoma 17q24.3-q25, por su asociación con translocaciones en el cromosoma 17. Recientemente este gen fue clonado y sorprendentemente se encontró que presenta 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 campomélica 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. (véase 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.<sup>30</sup> 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".<sup>30</sup> 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 importante en la formación de testículo; y además porque está conservado en aves y mamíferos.





**Fig. 7-16.** 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 pseudoautosómica (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 pseudoautosómica 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.<sup>1</sup>

### Alteraciones 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.<sup>31</sup> 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).<sup>19</sup>

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 pseudoautosómica (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. 7-16).

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; más concretamente, este sería el supuesto gen Z.<sup>27</sup>

## Mujeres “XY”

Como puede apreciarse en la figura 7-16, cada vez que una recombinación anómala produce 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, produzca 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 cutáneos (“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 femeninos y los derivados müllerianos normales, pero tie-

nen gónadas atróficas, vestigiales, sin células germinales y no presentan anomalías somáticas específicas. Este síndrome tiene una etiología heterogénea, que puede clasificarse en dos grupos 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 segmento de “caja GAM” (véase ítem previo), 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 definitivamente 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.

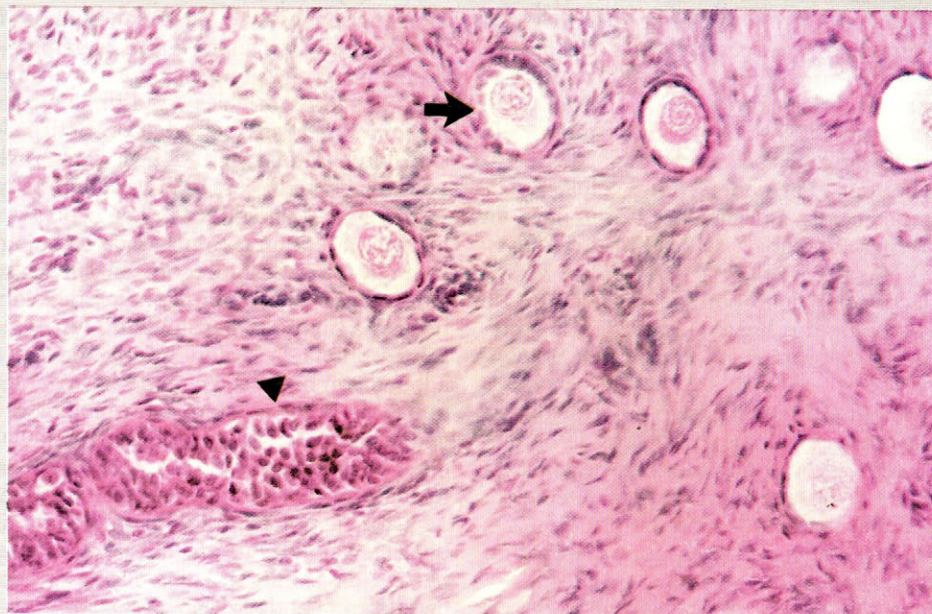
## Hermafroditas verdaderos

Se define como hermafrodita verdadero un individuo en el cual coexisten el tejido ovárico y el tejido testicular. Se han recopilado 409 casos,<sup>32</sup> 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 (véase panel 7-2).

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, testículo 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 cro-





**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 Dra. V. Adámoli).

**Panel 7-2. Hermafroditismo verdadero.** 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") (véase fig. 1). La mayoría de los hermafroditas verdaderos tienen un cariotipo 46,XX y no poseen el gen SRY en ningún tejido.<sup>33</sup> 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).

osomas sexuales XX y las que contienen XY, sendo estas últimas las responsables del desarrollo de tejido testicular.

Un mecanismo diferente existe cuando no hay indicios de la presencia del gen SRY en *ninuna línea celular*, como se encuentra en los casos de incidencia familiar de hermafroditismo o de varones XX;<sup>27</sup> en estos casos hay transmisión de un gen (Z, hipotético) mutado y ausencia del

SRY (son hermafroditas XX); el gen Z' (mutado) no realiza su función normal, que es reprimir la cascada regulatoria del desarrollo masculino, por lo cual se desarrolla tejido testicular en grado variable, y también por su grado variable de expresión se desarrolla tejido ovárico (por defecto, sería el tipo constitutivo de desarrollo). Otro mecanismo diferente existe en los casos (minoritarios, 10% de los hermafroditas) de



hermafroditas con cariotipo 46,XX, con presencia del gen SRY en el segmento distal (Xp22) del cromosoma X. A pesar de que se esperaba que en estos casos se desarrollara el "varón XX" (descrito anteriormente), se ha demostrado que, en algunos casos, el gen SRY translocado al X en las cercanías del gen STS, puede inactivarse (ionizarse) al azar en ciertas células del linaje gonadal; por consiguiente, se produce un "mosaicismo funcional" de dos líneas celulares, las  $X \times X_{sry}$  con el gen SRY activo y las  $XX_{sry}^*$  con inactivación 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 9 casos de hermafroditas fértiles; en todos ellos, los hermafroditas (aparte de poseer tejido testicular) eran somáticamente femeninos, con cariotipo 46,XX, buen desarrollo ductal femenino, y dieron a luz criaturas normales.<sup>34</sup>

## Pseudohermafroditismos

Los pseudohermafroditismos 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 pseudohermafroditismo genético, esta vez *femenino*, es el producido por la hiperplasia suprarrenal congénita (o síndrome adrenogenital) 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 genéticos 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) de 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 4 semanas se organiza como testículo, y a partir de allí se activan otros genes, como el de la hormona anti-mülleriana (HAM), que determinan su vez el destino de los conductos genitales. También, la permanencia en actividad del gen SF1 permite el desarrollo de 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 (5 $\alpha$ -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 semana 9, y la entrada en meiosis de las células germinales. Varios errores genéticos dan lugar a "va-



ones XX", "mujeres XY", hermafroditas verdaderos y pseudohermafroditismos, entre otros. Los cromosomas sexuales X e Y son muy diferentes, excepto en la pequeña región (2,5 Mb) llamada recombinante y pseudoautosómica, que posee sólo unos pocos 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.

## REFERENCIAS

1. Solari AJ. Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates. CRC Press, Boca Raton, 1993.
2. Van Wyk JJ, and Grumbach MM. Disorders of sex Differentiation. En: Williams RH, Ed., Textbook of Endocrinology, WB Saunders Co., Philadelphia, 1968.
3. Jirasej JE. The relationship between differentiation of the testicle, genital ducts and external genitalia in fetal and postnatal life. En: The Human Testis, E Rosenberg and A. Paulsen, Eds., Plenum Press, New York, 1970; 19-30.
4. Magre S, and Jost A. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat. *J Electron Microsc Techn* 1991; 19:172-188.
5. Merchant-Larios H, and Taketo T. Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Electron Microsc Techn* 1991; 19:158-171.
6. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Nigel V, and Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990; 348:450-452.
7. Palmer SJ, and 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.
8. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow PN, and Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; 351:117-121.
9. McLaren A. Primordial germ cells in mice. *Biblthca Anatom* 1983; 24:59-66.
10. Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, and Geremia R. Direct evidence that the mouse sex-determining gene 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.
11. Eddy EM, Clark JM, Gong D, and Fenderson BA. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gamete Res* 1981; 4:333.
12. Voutilainen R. Differentiation of the fetal gonad. *Horm Res* 1992; 38:(Suppl. 2) 66-71.
13. Kurilo LF. Oogenesis in antenatal development in man. *Hum Genet* 1981; 57:86-92.
14. Solari AJ. The behaviour of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol* 1974; 38:273-317.
15. Solari AJ, and Tres LL. The three-dimensional reconstruction of the XY chromosomal pair in human spermatocytes. *J Cell Biol* 1970; 45:43-53.
16. Solari AJ. Synaptic behaviour and recombination nodules in the human XY pair. *Genetica* 1988; 77:149-158.
17. Cooke HJ, Brown WRA, and Rappold GA. Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. *Nature* 1985; 317:687-692.
18. Rappold GA. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 1993; 92:315-324.
19. Wolf U, Schempp W, and Scherer G. Molecular Biology of the human Y chromosome. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992; 121:147-213.
20. Morton NE. Parameters of the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7474-7476.
21. Wang LH, Collins A, Lawrence S, Keats BJ and Morton NE: Integration of gene maps: Chromosome X. *Genomics* 1994; 22:590-604.
22. Sinclair AH; Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; 346:240-244.
23. Su H, Lau CYF. Identification of the transcriptional unit, 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.
24. Harley VR, and Goodfellow PN. The biochemical role of SRY in sex determination. *Mol Reprod Dev* 1994; 39:184-193.
25. McElreavey K, Vilain E, Cotinot C, Payen E, and Fellous M. Control of sex determination in animals. *Eur J Biochem* 1993; 218:769-783.
26. Haqq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi F, Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA. Molecular basis of mammalian sexual determination: Activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science* 1994; 266:1494-1500.
27. McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1993; 90:3368-3372.
28. Smith MJ. Turning on sex. *Current Biology* 1994; 4:1003-1005.
29. Schafer AJ, Goodfellow PN. Sex determination in humans. *BioEssays* 1996; 18:955-962.
30. Cameron FJ, Sinclair AH. Mutations in SRY and SOX9: Testis-determining genes. *Hum Mutation* 1997; 9:388-395.
31. De la Chapelle A. The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* 1981; 58:105-116.
32. Van Niekerk WA, Retief AE. The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet* 1981; 58:117-122.
33. Ramos ES, Moreira-Filho CA, Vicente YAM, Llorach-Velludo 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.
34. Verp MS, Harrison HH, Ober C, Oliveri D, Amarose AP, Lindgren V, Talerma A. Chimerism as the etiology of a 46,XX/46,XY fertile true hermaphrodite. *Fertil Steril* 1992; 57:346.

# Capítulo

# 8

## **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.*

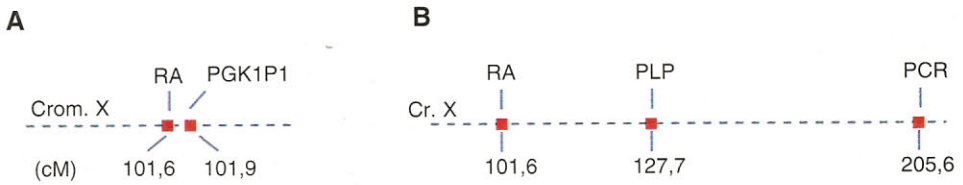
### **Introducción**

Como se ha descrito en los capítulos anteriores, una de las propiedades fundamentales del ADN es su capacidad de corte y repegado, que hace posible las manipulaciones de la "ingeniería genética" (cap. 2) 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. 9). 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. 9). 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. 7), que se encuentra en el cromosoma X, y el gen RTFQ (de fibrosis quística) (véase cap. 6), 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





**Fig. 8-1. 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 col., 1994).<sup>1</sup>

de los límites de la pura casualidad, que puede calcularse por métodos 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, 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. 8-1).

Históricamente, el *ligamiento de genes* fue descubierto en 1906, por W. Bateson y R. C. Punnett, mucho antes de que se conociera su vinculación con la molécula de ADN y su relación con la meiosis, en las cruces 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 reco-

nocimiento de estos hechos permitió la realización de los primeros mapas de genes en *Drosophila* en 1913.

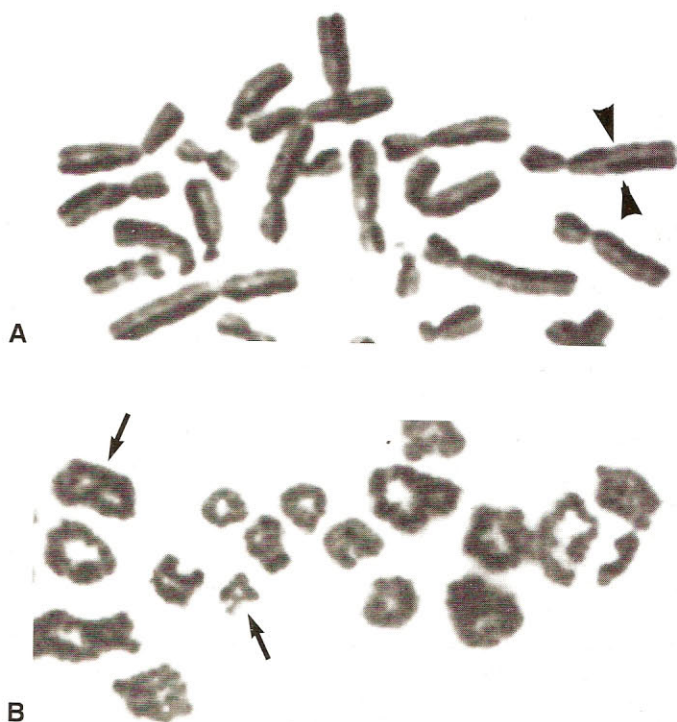
Los estudios de ligamiento en la especie humana fueron lentos (excepto para el cromosoma X) hasta los recientes desarrollos de la Genética Molecular. En los últimos años, los estudios de ligamiento humano han hecho aportes decisivos para el Proyecto del Genoma Humano y, esencialmente, para el aislamiento 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 (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, tal como las cromátidas hermanas en un cromosoma (que son idénticas por ser copias del mismo 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 rotulan 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. 8-2A).

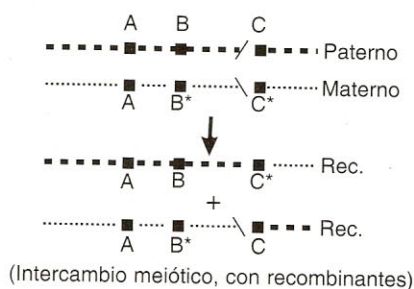
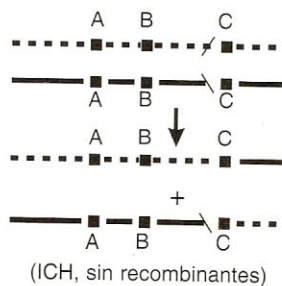
Por el contrario, cuando el intercambio ocurre entre moléculas de ADN se realiza entre las mo-

**Fig. 8-2.** 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.



culas 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. 8-3). 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 fenó-



**Fig. 8-3.** 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.



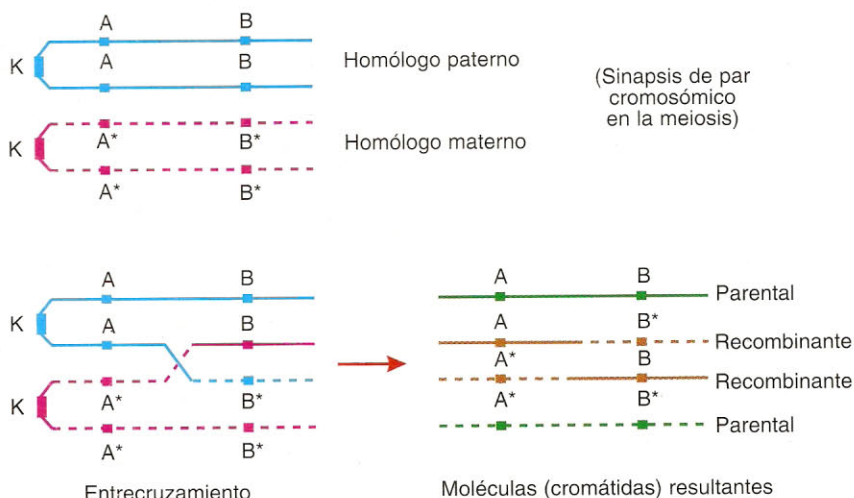
meno de recombinación se puede visualizar como un "quiasma" (fig. 8-2B). Finalmente, el estudio del ligamiento no es el único método para determinar en qué orden y a qué distancias se encuentran los genes, ya que hay métodos directos de análisis de la molécula de ADN que permiten localizar y medir los segmentos génicos ("mapas físicos" de genes); sin embargo, estos métodos son más laboriosos, sobre todo para distancias que no sean pequeñas.

### Recombinación meiótica: entrecruzamientos simples y múltiples

Durante la meiosis (proceso que se analizará en detalle en el cap. 9) 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. 9), permite un incremento notable de los fenómenos de corte y repagado 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 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. 8-4). Esta recombinación es *recíproca*, es decir, que cada molécula recombinante recibe un segmento exactamente igual, es decir, se intercambian segmentos iguales (sin pérdida o ganancia de ni siquiera un nucleótido). Dado que el cromosoma paterno y el cromosoma materno no tienen exactamente el mismo contenido genético, sino que presentan variantes diferentes en los lugares correspondientes a muchos genes (variantes de un gen se denominan *alelos*), el 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, prácticamente imposible de que el cromosoma materno y el paterno tuvieran *igual* contenido génico —"homocigotas" perfectos—, el entrecruzamiento no daría lugar a recombinación, tendríamos un resultado similar al ICH).

En los pares de cromosomas homólogos sinapsados puede ocurrir más de un entrecruzamiento



**Fig. 8-4.** 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 de ADN) resultantes (50% recombinantes y 50% parentales). K: centrómero.

en este caso se denominan entrecruzamientos múltiples. El número total de entrecruzamientos en cada par no es grande: en promedio es algo más de dos en la especie humana. Esto se comprueba por el número de quiasmas, que en la meiosis humana masculina es de 52 para los 23 pares de cromosomas.<sup>2</sup> 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 2 de las 4 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, 2 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 8-1, 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 1 de cada 2 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 ( $N_q$ ) observado en células meióticas por la medida (media) de un entrecruzamiento (= 50 cM):

Longitud total del mapa de ligamiento:

$$N_q \times 50 = 52 \times 50 = 2.600 \text{ cM}$$

Esta medida es válida para el varón, ya que  $N_q = 52$  en *espermatoцитos*. 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 3.800 cM<sup>3</sup> y hasta 5.222 cM en mapas recientes (cuadro 8-1).<sup>4</sup>

Algunos datos más actualizados, de 1992<sup>5</sup> y de 1994,<sup>4</sup> han confirmado que el número de entrecruzamientos en la mujer es apreciablemente más elevado que en el varón (un 60 a 68% 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); dado que la masa total del genoma humano haploide se calcula en 3.227 megabases de ADN,<sup>5</sup> 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.



**Cuadro 8-1.** Grupos de ligamiento humanos y sus medidas (1994)<sup>4</sup>

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

El cuadro 8-1 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 ha cumplido una de las metas del Proyecto del Genoma Humano en su debido tiempo.

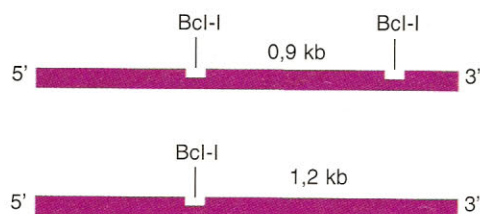
### Marcadores en el estudio del ligamiento

Históricamente, el estudio del ligamiento en especies animales y vegetales se basó en cruza- mientos 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, a aquellos segmentos de ADN cuya posición es conocida, es decir, se sabe a qué cromosoma corresponde 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 Restricción (PLFR = RFLP en inglés), b) los “minisatélites” o Repeticiones de Tandem de Número Variable (RTNV = VNT en inglés), y c) los “microsatélites” o repeticiones de dinucleótidos (fig. 8-5).

La gran utilidad de los marcadores moleculares para el estudio del ligamiento de genes reside en dos características de éstos: a) son sum-



Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (PLFR) en un segmento de ADN que tiene un sitio variable frente a la enzima de restricción Bcl-I (*Bacillus caldolyticus*-I) como resultado del cual puede haber un fragmento de 0,9 kb o uno de 1,2 kb (PLFR marcador de hemofilia)



Repeticiones en tándem de número variable (RTNV), que determinan fragmentos de tamaño variable

CACACACACACACACACACA : (CA) 10  
CACACACACACACACACACACA : (CA) 12

Microsatélites: repeticiones (en número variable) de dinucleótidos, que amplificados por RCP forman bandas diferentes en geles de acrilamida

**Fig. 8-5.** Representación de los tres tipos básicos de “marcadores” moleculares para estudios de ligamiento, que son altamente polimórficos en la especie humana.

mente “polimórficos” en los seres humanos, y b) son muy abundantes dentro del genoma humano. Estas dos características merecen algunos comentarios.

### “Polimorfismos” en marcadores y en genes

Todo estudio de ligamiento se basa, necesariamente, 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 idénticas en su secuencia de bases, no resulta ninguna nueva molécula (o cromátida) recombinante.

En tal caso (como en los ICH), el estudio del ligamiento es imposible. El ligamiento es detectable por variantes en los genes (p. ej., el gen normal que produce el factor VIII de la coagu-

lación o globulina antihemofílica posee tantas variantes como mutaciones diferentes que alteran la codificación de esa proteína y provocan hemofilia: el resultado es uno solo, 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 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 fre-



cuentes en la población, y que por lo tanto sea frecuente que una persona sea *heterocigoto* (el alelo materno diferente del paterno) para ese locus (un ejemplo clásico de locus polimórfico es el de los antígenos de los grupos sanguíneos O, 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 dinucleótidos) son todas 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. 5, 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,<sup>6</sup> comenzando con los PLFR, y se ha hecho cada vez más eficiente con los RTNV y los microsatélites. Se estima que hay alrededor de 100.000 secuencias de microsatélites (CA)<sub>n</sub> distribuidas a lo largo del genoma humano, es decir que en promedio habrá una secuencia polimórfica (CA)<sub>n</sub> cada 30 kb de ADN y además, hay una cantidad similar de secuencias (GT)<sub>n</sub>. Con 400 PLFR distribuidos a lo largo de todo el genoma, se logró en 1987 un mapa de ligamiento que posee una distancia promedio de 10 cM entre marcadores; 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,<sup>5</sup> por lo cual, actualmente, cada gen humano tiene, en promedio, un marcador disponible a menos de 1 cM de distancia genética, y esto acelera notablemente la posibilidad de aislar (clonar) y secuenciar cada gen humano importante en Medicina. Los estudios de ligamiento se efectúan en centros especializados, tales como el Centre d'Etude du Polymorphis-

me 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 genéticos 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 es 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 puede ser incapaz de determinar si existe tal ligamiento. El tipo informativo de matrimonio es aquél formado por un heterocigoto para los dos genes, caso contrario un homocigoto 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)

siendo el ligamiento entre H y M 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



paterno de un heterocigoto; 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. 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 *logarithm of odds*) 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):  $Z = \log [\text{pr}(\text{Lig})/\text{pr}(\text{Ind})]$ . Los

valores de Z pueden variar generalmente entre +3 y -3, y son considerados:

$Z = 3$  [Cociente  $\text{prob}(\text{lig})/\text{prob}(\text{indep.})] = 1.000$ : Ligamiento establecido  
 $Z = 2$  [cociente  $\text{prob}(\text{lig})/\text{prob}(\text{indep.})] = 100$ : Ligamiento muy probable  
 $Z = \text{entre } 1 \text{ y } 0$ : Ligamiento posible  
 $Z = \text{entre } 0 \text{ y } -1$ : Posible asociación al azar  
 $Z = -2$ : Asociación aleatoria establecida

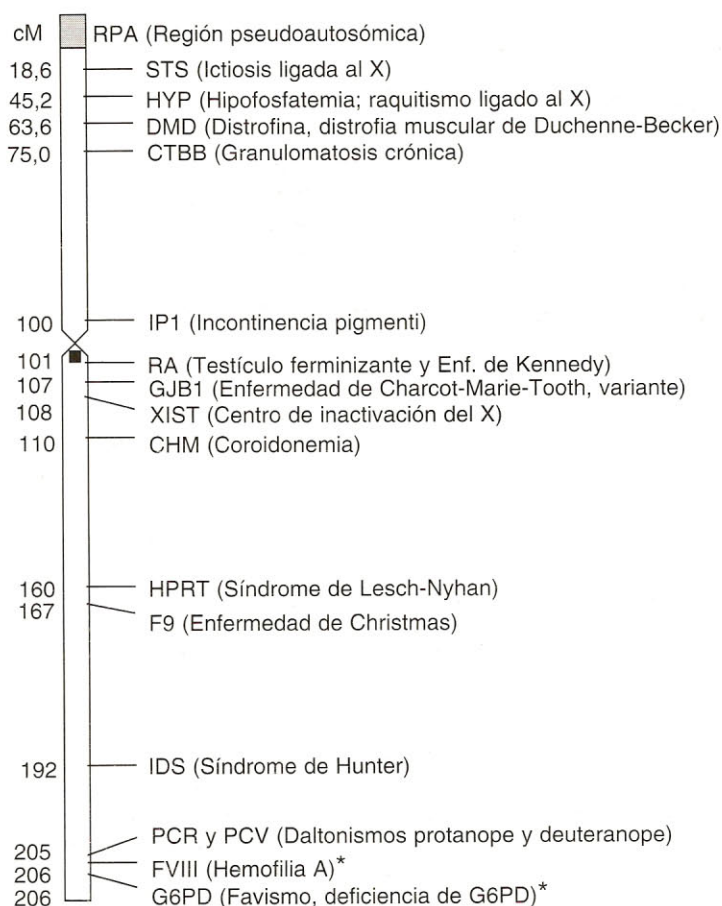
Los "lods" de los mismos pares de alelos en familias separadas se pueden sumar hasta llegar a un valor que permita definir la prueba de ligamiento o su falta.

### Utilidad de los desequilibrios de ligamiento

Cuando los haplotipos (véase antes) posibles, 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.





**Fig. 8-6.** Mapa parcial de ligamiento del cromosoma X humano. Se muestran algunos de los genes y las enfermedades citadas (y col., 1994). \* Posiciones muy próximas entre sí.

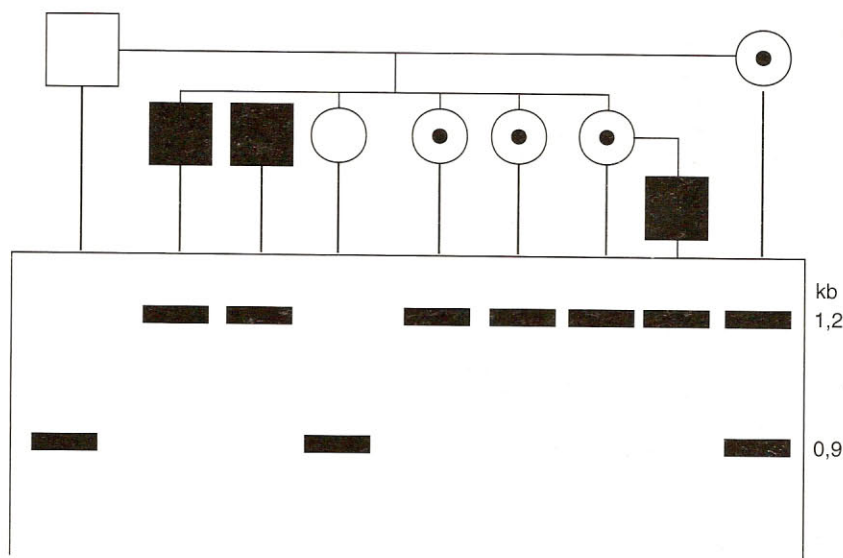
Tratándose de mutaciones relativamente nuevas, es de esperar disequilibrios de ligamiento con todos los segmentos cercanos de ADN, lo cual es útil para la localización de esos alelos mutados.

### Genes humanos ligados al sexo (al X) y enfermedades relacionadas

La figura 8-6 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 padecidas 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 *hemigótico* (hemi = mitad) respecto del X, es decir, po-

see un solo cromosoma X (y el Y, que salva la RPA no tiene genes homólogos al X, y cap. 7), todos los genes anormales del único X se expresan en el fenotipo, y se observa la enfermedad. Las mujeres pueden ser *portadoras* de un gen anormal en uno de sus dos cromosomas X; 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 la mutación (salvo que sea una mutación "de novo" originada 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 (pues que sólo le transmite un cromosoma Y). Hay unas pocas enfermedades con características dominantes ligadas al X, tales como el raquitismo (hipofosfatémico) resistente a la vitamina



**Fig. 8-7.** 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.<sup>7</sup> (Las bandas corresponden a improntas de Southern y los sitios de corte a la enzima Bcl-I; véase fig. 8-5, primer ejemplo.)

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 8-7.

### Gen de la distrofina y las distrofias musculares de Duchenne-Becker

Las distrofias musculares de Duchenne-Becker constituyen una de las enfermedades fatales más comunes ligadas al cromosoma X y afectan a 1 de cada 3.000 varones nacidos vivos.<sup>8</sup> Se distinguen dos variedades principales: la distrofia pseudohipertrofica 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 síntomas de la primera variedad son escasos en el lactante y hasta los 3 años, aunque los niños comienzan a caminar tardíamente y hay hipotonía; 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 mús-

culos 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<sup>9</sup> (luego de haberse aislado el ADNc correspondiente) y es el mayor hasta la fecha: se extiende por 2,4 megabases 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



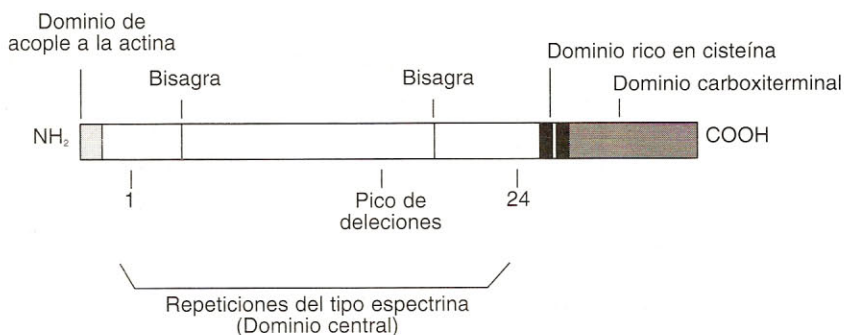


Fig. 8-8. Estructura de la distrofina, con sus cuatro dominios que ocupan sus casi 3.700 aminoácidos.<sup>11</sup>

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. 5). 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. 8-8).<sup>10</sup>

La distrofina tiene cuatro regiones o dominios característicos: el dominio aminoterminal, de 240 aa., es muy parecido al sector similar de las  $\alpha$ -actininas y puede unirse a la proteína esencial de las miofibrillas, 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 "bisa-gra" ricas en prolina; luego tiene un dominio rico en cisteína (similar al carboxiterminal de la  $\alpha$ -actinina) y un dominio muy específico, carboxiterminal, que es el que se une a glucoproteínas de membrana. Por consiguiente, la distrofina es una proteína alargada, con forma de cordón, que por su extremo NH<sub>2</sub> se conecta a la miofibrilla 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 en-

cuentra como dímeros (con los monómeros de polaridad opuesta).

A su vez, el enorme gen de la distrofina ha sido analizado en su espectro de mutaciones.<sup>12</sup> Se sabe que 2/3 de los pacientes de los tipos I y II (Duchenne y Becker) tienen deleciones (muchas veces grandes), comprobables con sondas de 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 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 en el sector final, el dominio carboxiterminal, que por consiguiente es esencial para la función de la distrofina, porque por esa región se asocia con la glucoproteína 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. 8-9).

Parece que la función de la distrofina es 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. 8-10).

El gen de la distrofina está activo (transcrito) no sólo en las células musculares o sus

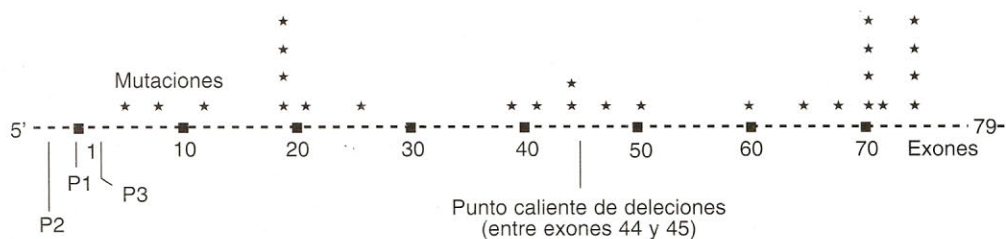
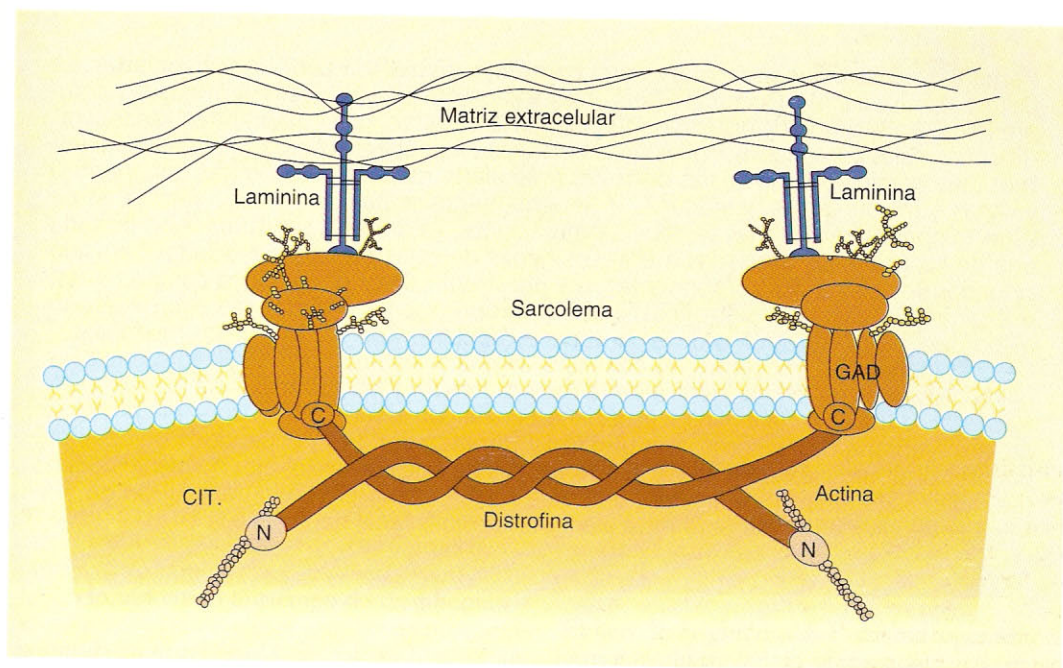


Fig. 8-9. Espectro de mutaciones puntuales sobre los exones del gen de la distrofina.<sup>11</sup> Los asteriscos señalan los genes mutados. P1-P3, promotores.



**Fig. 8-10.** 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 de la fibra muscular. CIT.: citoplasma de la célula muscular.

cursoras, sino también en neuronas y en astrocitos de la glia. El gen tiene 3 promotores, que están regulados en forma diferente (fig. 8-9). El promotor muscular es activo en células miogénicas y en la glia, 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 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 o de miofibrillas) 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.

La patogenia de la enfermedad de Duchenne (véase panel 8-1) 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 incapaces 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 de las células satélite, de mecanismo desconocido.

Finalmente, el diagnóstico y la detección de portadoras 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). Cerca del 80% de las portadoras pueden ser detectadas por estos métodos cuando el defecto es una delección o duplicación de tamaño moderado o grande; para las restantes, que son portadoras de mutaciones puntuales, se usan PLFR ligados a la mutación. Sin em-



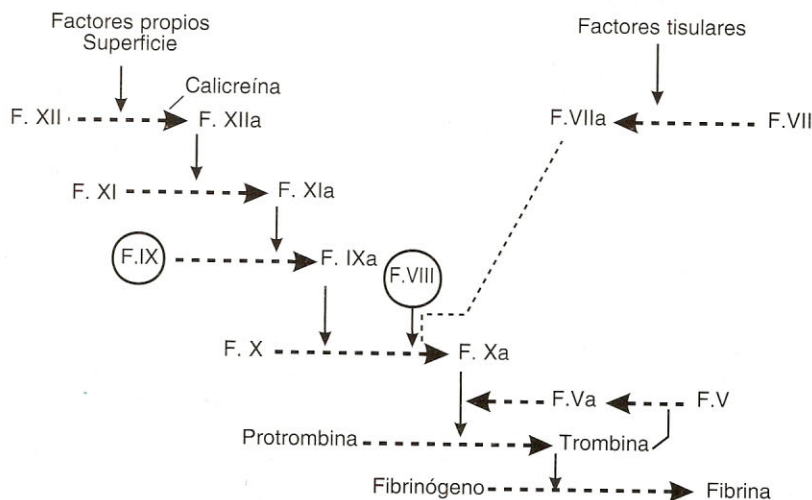
**Panel 8-1. Distrofias musculares y el complejo distrofina-proteínas asociadas.** La distrofia muscular de Duchenne-Becker es solamente una de las enfermedades comprendidas en el grupo de distrofias musculares hereditarias, que comprenden varias otras distrofias, tales como las distrofias de las cinturas escapulares y pelvianas y de los miembros (autosómicas recesivas), las distrofias musculares distales (autosómicas dominantes) y varias otras miopatías hereditarias.<sup>13</sup> 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,  $\alpha$  y  $\beta$  distroglicanas; de los cinco componentes,  $\alpha$ - $\epsilon$  sarcoglicanas, y las sintrofinas) y se comprobó que las distintas sarcoglicanas son responsables de las distrofias de las cinturas escapulares y pelvianas y de los miembros.<sup>13</sup> 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. 8-10). 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.

bargo, hay cierto grado de incertidumbre en el riesgo previsto para una mujer aparentemente sana, ya que hasta un 30% de las mutaciones pueden ser "de novo".

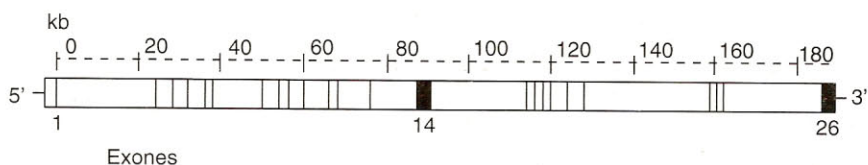
### El gen del factor VIII de la coagulación: hemofilia clásica (A). Factor IX y hemofilia B

La hemofilia A o clásica y la hemofilia B o enfermedad de Christmas (apellido del paciente original) son defectos genéticos ligados al cro-

mosoma X en lugares (loci) bastante distantes entre sí, pero ambos en el brazo largo del cromosoma (F9:Xq26 y F8:Xq28). 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. 8-11).



**Fig. 8-11.** Esquema simplificado de la cascada metabólica de la coagulación. Al faltar o ser afunccional el factor VIII, se interrumpe la cascada a nivel del factor X (hemofilia clásica). Si falla el factor IX, se produce la hemofilia B.



**Fig. 8-12.** Esquema del gen del factor VIII. Sus 26 exones se disponen en 186 kb; los exones mayores son el 14 y el 26.<sup>14</sup>

La hemofilia clásica A ocurre en 1 cada 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; sin embargo, la contaminación con virus de la hepatitis y el SIDA ha determinado en muchos casos decesos secundarios a estos virus. Actualmente, la vigilancia más estricta y el uso de concentrados de factor VIII calentados para inactivar el virus del SIDA reducen el riesgo, excepto para la hepatitis no A-no B.

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. 8-12). Se han descrito enfermos de hemofilia A en los que se constató la inserción de un elemento L1 o retroposón en la región del gen, aunque la mayor parte de los casos corresponden a mutaciones puntuales que afectan generalmente al dinucleótido CpG.

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 ( $4 \times 10^{-5}$ ), lo cual es-

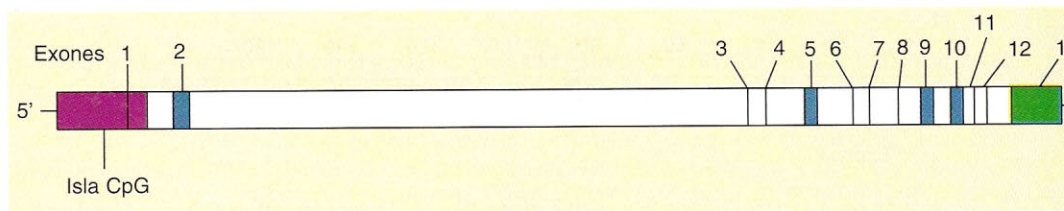
taría de acuerdo con su tamaño. También influyen ciertas secuencias homólogas en un intrón, que provocan frecuentemente, en la meiosis paterna, un mal apareamiento y finalmente una inversión del gen con pérdida de su actividad; por este mecanismo se originan alrededor del 50% de los casos graves. La mayor parte de las mutaciones son "de novo", de modo que pueden usarse PLFR para la detección de portadoras (fig. 8-7).

### 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 más de 300 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





**Fig. 8-13.** Gen de la G6PD. El segundo intrón ocupa prácticamente la mitad del gen. Las secuencias codificantes son solo 1.545 pb de las 18 kb del gen.<sup>15</sup>

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 ha calculado en 400 millones las personas que presentan deficiencias relativas de la G6PD, radicadas especialmente en África Central, el Mediterráneo, Extremo Oriente y Brasil.<sup>15</sup>

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. 8-13).

Como otros genes de mantenimiento, antes de la iniciación del marco de lectura del gen, hay una región muy rica en el dinucleótido CpG, que se extiende al primer intrón (isla CpG). Las 34 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 las lleva a 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 4 meses de vida media) se encuentra inerte 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 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 lyonización (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 sensible 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. 8-6). 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 y que contienen el pigmento "rodopsina" (cuyo gen está en el cromosoma 3), una minoría de 8 millones de conos, que a su vez son de tres tipos: los conos con pigmento



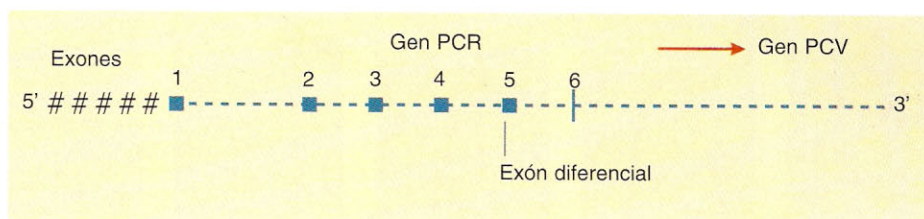


Fig. 8-14. Esquema del gen del pigmento para el color rojo en los conos retinianos.

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, porque requiere la mutación de ambos alelos en los dos homólogos. 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<sup>16</sup> y constan de sólo seis exones (fig. 8-14). 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 "protanopes" (de protos, primero, por considerar al rojo el primer color, de longitud de onda mayor) (son cerca del 1% de los varones) cuando la percepción del color rojo está muy disminuida; protanómalos, cuando la anomalía para el rojo es menor; y deuteranopes ("2º color"), cuando la sensibilidad al verde es 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. 8-15).

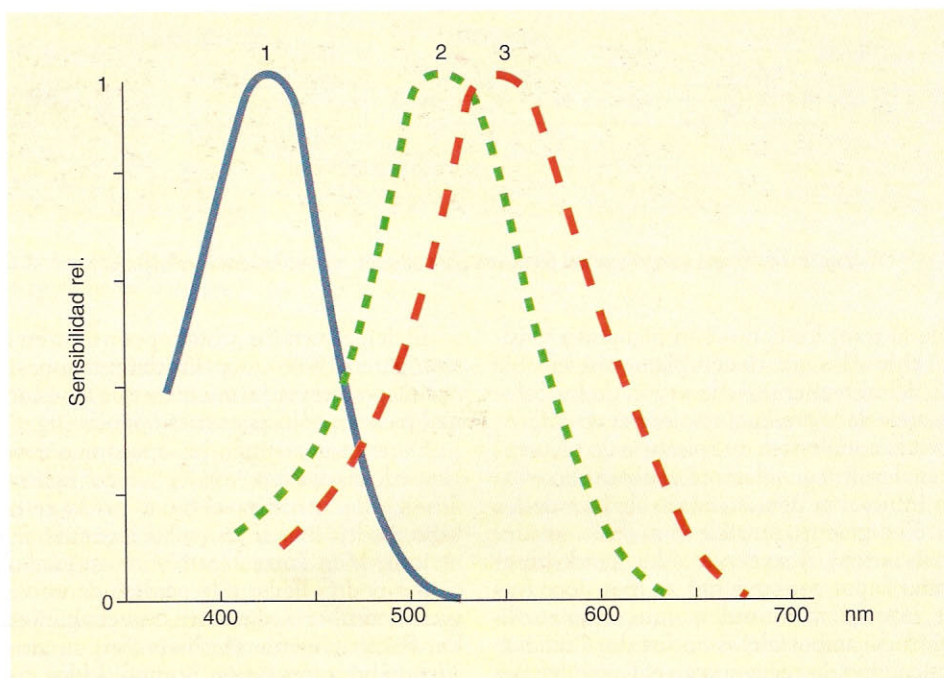
Durante un tiempo se supuso que como los genes de las opsinas "roja" y "verde" están seguidos uno del otro y poseen alto grado de homología, podría existir un mal apareamiento en la meiosis, y un entrecruzamiento en esas condiciones podría llevar a la pérdida de uno de los genes, con la consiguiente ceguera para un color. Recientemente 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. 8-16); 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, siendo lo más frecuente poseer 2 genes para la "verde". Además se comprobó la existencia de genes "híbridos" entre el PCR y el PCV, producidos por entrecruzamiento intragénico<sup>17</sup> (véase panel 8-2).

### 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).

El síndrome de Lesch-Nyhan (déficit grave de HPRT) ocurre con una frecuencia de 1 en 10.000 varones nacidos vivos, no posee tratamiento efectivo y lleva a la muerte del paciente en la segunda década de la vida luego de un gran sufrimiento. En el nacimiento no hay síntomas claros, pero a partir de los tres meses se





**Fig. 8-15.** 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.

observa hipotonía, retraso en el desarrollo de los movimientos, movimientos espásticos, temblor postural y otros síntomas de afectación del sistema nervioso, que a partir del año se hacen más claramente de tipo extrapiramidal, con hiperreflexia y movimientos coreoatéticos.

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

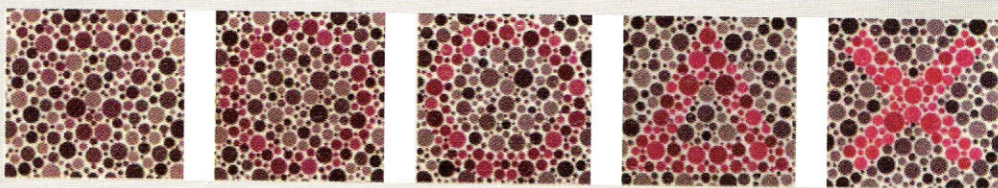
normal. La enzima HPRT está distribuida en todos los tejidos, pero su actividad más alta se encuentra en los núcleos basales del encéfalo y en el testículo. La enzima tiene 217 aminoácidos y se encuentra en forma activa como tetramero.

El gen HPRT humano ocupa 44 kb y consiste en 9 exones y 8 intrones cuyas secuencias limitantes están bien conservadas entre especies (el gen del ratón tiene los mismos exones) (fig. 8-17).<sup>20</sup>

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 pseudogenes 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 (fig. 8-17); 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



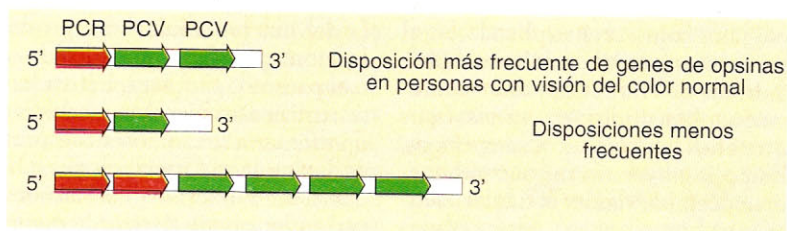


**Fig. 1.** Prueba para la percepción del color rojo (reproducido con autorización de Neitz, Neitz y Kainz, Science 1996; 274:802).

**Panel 8-2. Defectos hereditarios de la visión de los colores.** 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 mal 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.<sup>18</sup> De este modo, un test de percepción del color puede informar sobre las diferencias en el ADN (véase 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 una visión monocromática azul.<sup>19</sup>

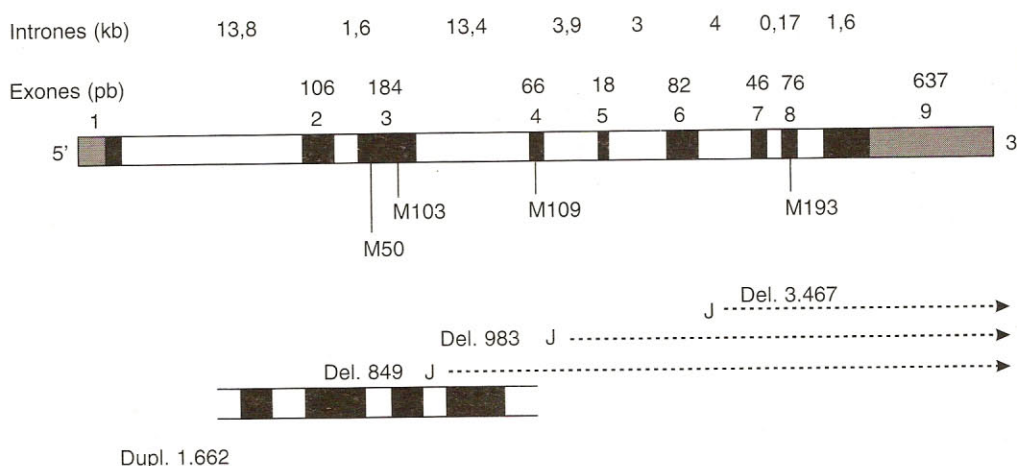
muchos son portadores de mutaciones de desecuada o sin sentido, y no pueden codificar una proteína (véase cap. 5); d) la enzima HPRT es reconocible en cultivos celulares y se presta a la

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.



**Fig. 8-16.** Disposiciones de los genes de opsinas en el cromosoma X.





**Fig. 8-17.** Gen HPRT. Los exones y los intrones están representados con escalas diferentes. Los exones 1 y 9 contienen regiones no traducidas (punteado). Más abajo del gen se señalan varias mutaciones puntuales (M), varias delecciones parciales y una duplicación parcial, que muestran la heterogeneidad mutacional en la enfermedad.<sup>20</sup>

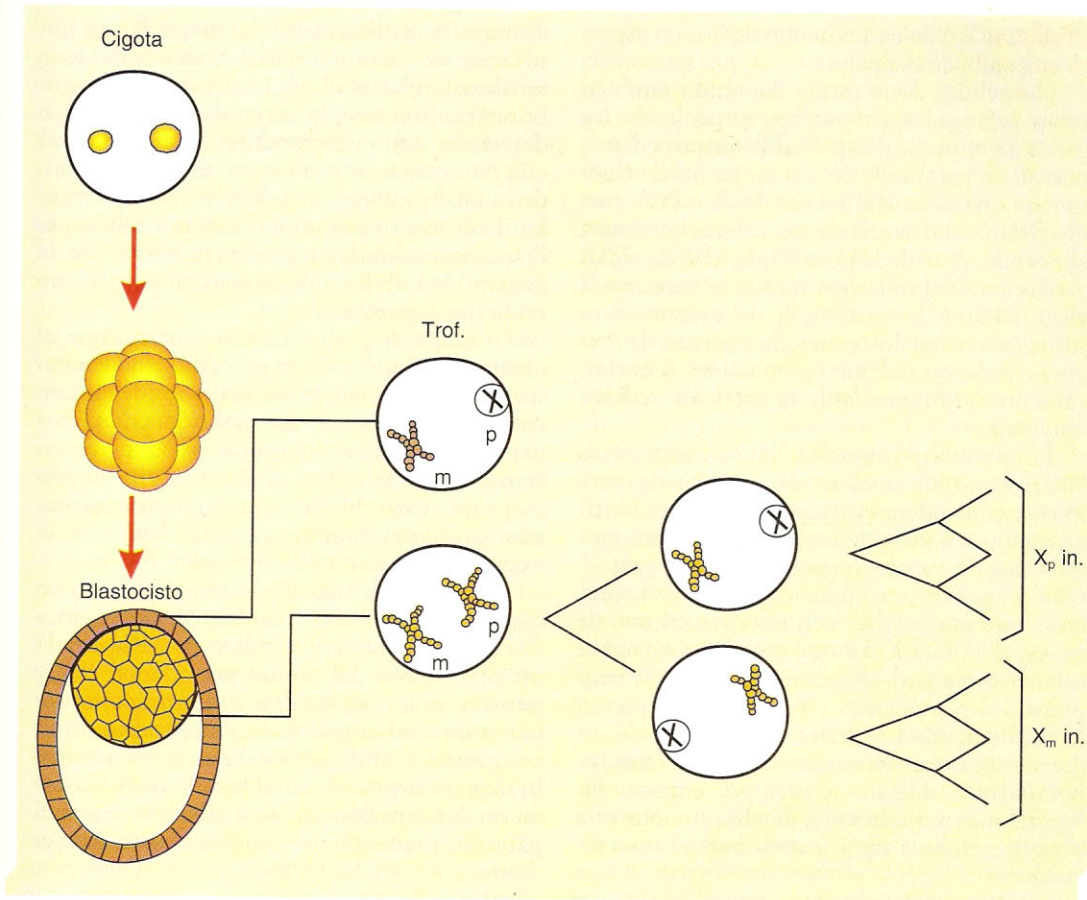
Un método de diagnóstico prenatal es el examen de vellosidades coriónicas (cultivo) para determinar la actividad de HPRT y la comparación de secuencias amplificadas mediante RCP con respecto a las del gen normal. La detección de mujeres portadoras puede realizarse en extractos de folículos pilosos, amplificación del ADN con RCP y comparación con las secuencias normales.

### Síndrome 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 iduronato-sulfatasa, y que es una típica enfermedad de almacenamiento patológico, como será explicado 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, hipertrichosis, 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 = XIT Inactivo, Transcrito Específico), recientemente aislado.<sup>21</sup> Este gen es responsable de la inactivación característica de uno de los cromosomas X de la mujer, que a su vez se manifiesta citológicamente por la formación del corpúsculo de Barr o cromatina sexual. Se lo propuso la genetista inglesa Mary F. Lyon en 1961, y se fue comprobando progresivamente hasta la actualidad, las mujeres (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 sus células somáticas (en los ovocitos se expresan los dos cromosomas X). Lyon puso un proceso especial, 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 se realiza esta elección, todas las células mantienen ese cromosoma específico inactivo, es decir que se forman clones o líneas celulares que tienen inactivo el cromosoma X paterno u otro clones que tienen de ese modo al X materno, de lo cual resulta un embrión (y un organismo, finalmente) que es un mosaico.



**Fig. 8-18.** Hipótesis de Lyon. Las células del macizo celular interno (del cual deriva el embrión propiamente dicho) efectúan un proceso por el cual el  $X_m$  o el  $X_p$  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  $X_p$ .

los cromosomas  $X_m$  (materno) y  $X_p$  (paterno) (fig. 8-18).

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, pudiendo ser el  $X_p$  o el  $X_m$ . 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  $X_m$  o  $X_p$  inactivo); cuando se toman células aisladas y a partir de cada una se hacen subculti-

vos, se observa que aproximadamente la mitad de ellos contiene activo el  $X_p$  y el resto contiene activo el  $X_m$ . La visibilidad del mosaicismo del X depende de varios factores: si se trata de células 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. El mismo gen en el ratón



(Tabby = Ta) da en los heterocigotos un aspecto emparchado del pelo.

Las células de la retina femenina también están segregadas en parches respecto de los genes de opsinas, y es probable que esta distribución en parches le dé a la mujer heterocigota para una delección del gen PCR o PCV una discriminación visual de los colores cercana a la normal; pero dada la multiplicidad de alelos generalmente presentes en cada cromosoma X (fig. 8-16) y la existencia de cruzamientos intragénicos en los genes de opsinas, la frecuencia de portadoras reconocibles fenotípicamente se diferencia de la teórica y se hace muy baja.

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 cromosomas X. La mujer es *funcionalmente* hemicigótica 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 hemicigoto obligado y siempre expresa las mutaciones perjudiciales; de allí proviene una ventaja genética significativa para el sexo femenino.

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 es llamado "*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.<sup>22</sup>

### 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. Es un *proceso de desarrollo*, que afecta al cromosoma X en etapas sucesivas, aún incompletamente conocidas.<sup>23,24</sup> Las etapas de este proceso se pueden clasificar en tres partes: a) etapa de *pre-lionización*, b) etapa de *lionización*, y

c) etapa de *poslionización*. La etapa de *pre-lionización* de los cromosomas X abarca desde fertilización hasta el día 14 del desarrollo embrionario humano; la etapa de *lionización* desarrolla aproximadamente el día 14 postconcepción 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 en la línea germinal.

La etapa de *pre-lionización* 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 no transcriben el gen Xist; al llegar a esta última etapa de cuatro blastómeras empieza a expresarse en forma diferencial el gen Xist: sólo uno expresa este gen en el cromosoma X<sub>p</sub>.<sup>23</sup>

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, ginogénesis, o ambos paternos, androgénesis) han mostrado que la expresión precoz, en el estado de 4 blastómeras del gen Xist está asociada con el origen paterno, precisamente porque el gen Xist se demetila en la profase meiótica paterna y continúa así en el espermatozoide y entra en la cigota preparado para una expresión precoz a diferencia del gen Xist de origen materno. 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. A más de su estado de hipometilación en el cigoto para expresarse, el gen Xist precisa un factor citoplasmático presente en el ovocito. Posteriormente, al formarse el trofoblasto (trofodermis), se produce *exclusivamente* en las células trofoblásticas la inactivación selectiva del X<sub>p</sub>; por consiguiente, esta inactivación 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 demetilación general del genoma de las células embrionarias, por eso se cree que ambos procesos están vinculados entre sí. Al mis-



tiempo, el factor de origen materno necesario para la expresión del *Xist*, que en apariencia se agota rápidamente en las células proliferantes del macizo y que corresponde 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 cromosoma 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 cromosomas X en la célula progenitora. Esta transmisión clonal parece invariable, salvo algunas pocas excepciones, en células en cultivo, células tumorales y células envejecidas. En la línea germinal, los pre-gonocitos sufren el proceso de lionización, pero lo revierten en los ovocitos, al comienzo de la profase meiótica, para llegar a ovocitos *deslionizados*, en los cuales se expresan ambos cromosomas X.

### Aspectos moleculares de la lionización

El gen *XIST*, localizado en Xq13 y estrechamente ligado al RPS4X (gen de la proteína ribosómica S4 del X) y al PHKA1,<sup>25</sup> 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 transcribe pero no se traduce en ningún polipéptido significativo. El producto del gen *XIST* es directamente un ARN que actúa sobre el propio cromosoma X (en "cis") mediante un mecanismo poco conocido, que parece ser la acumulación progresiva de este ARN sobre la región periférica al gen, lo cual

provoca un cambio de conformación de la cromatina que se va extendiendo y finalmente abarca todo el cromosoma, inhibiendo su actividad transcripcional. 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 proteína). El gen *XIST* consta de 8 exones y su producto de transcripción es mayor de 15 kb (fig. 8-19).

Con respecto al proceso de lionización, se consideran tres etapas: a) "reconocimiento" mutuo de los cromosomas X y consiguiente recuento del número de X, quedando uno de ellos "marcado" mediante el silenciamiento 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 metilación de las islas CpG de los genes en los X inactivos y transmisión clonal a las células hijas. En esta fase, los promotores metilados en los X inactivos probablemente estén asociados a "proteínas ligantes a ADN metilado" 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 cromosoma X inactivo, son resistentes al proceso de lionización y mantienen su actividad transcripcional. Estos genes son: a) los de la región pseudoautosómica, b) ciertos genes cercanos a la región pseudoautosómica 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*.

### 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

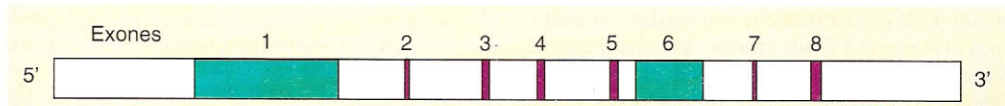


Fig. 8-19. Esquema del gen *XIST*. Los exones más largos son el 1 y el 6, pero no tienen el mismo sentido que en otros genes, puesto que no codifican polipéptidos.



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 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) y microsatélites, todos ellos altamente *polimórficos*, es decir, con numerosas variantes en la población humana. Los mapas de ligamiento actuales permiten tener, en promedio, un marcador cada 0,7 cM. 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 *hemicigotos* 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 *deutanope*; 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 células de la mujer. El proceso complejo de inactivación, o lionización del cromosoma fue propuesto y comprobado por Mary Lyon, y se produce alrededor del día 14 de desarrollo embrionario humano, con una lección independiente, en cada célula, cuál de los cromosomas X (el materno o el paterno) ha de ser inactivado.

## 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 theory for a revised chiasma map of man. *Human Genetics* 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. NIH/CEPH Collaborative Mapping Group: A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science*, October 2, 1992.
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. Phillips JA. Use of linkage and restriction fragment length polymorphisms to detect genetic disorders. En: Kaback MM, Shapiro LJ (Eds.): *Frontiers in Pediatric Medicine*, 92<sup>nd</sup>, Ross Conference on Pediatric Research, Ross Laboratories, Columbus (OH) 1987; 138-147.
8. Emery AE. Clinical and molecular studies in Duchenne muscular dystrophy. *Progr Clin Biol Res* 1989; 306:15-28.
9. Monaco AP, Walker AP, Millwood I, Larin Z, Lach 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 Opin Genet Dev* 1993; 3:484-491.
11. Mandel JL. Dystrophin. The gene and its product. *Nature* 1989; 339:584-586.
12. Rininsland F, Reiss J. Microlesions and polymorphisms in the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene. *Hum Genet* 1994; 94:111-116.
13. Brown RH. Dystrophin-associated proteins and muscular dystrophies. *Ann Rev Med* 1997; 48:446-466.
14. Gitschier J, Wood WI, Goralkas TM, Wion D, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lander RM. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312:326-337.
15. Vulliamy T, Mason P, Luzzatto L. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trends in Genet* 1992; 8:138-142.
16. Nathans J. The genes for color vision. *Sci Am* 1989; 261:42-49.
17. Neitz M, Neitz J. Numbers and ratios of visual pigment genes for normal red-green color vision. *Science* 1995; 267:1013-1016.

18. Neitz J, Neitz M, Kainz PM. Visual pigment gene structure and the severity of color vision defects. *Science* 1996; 274:801-804.
19. Ladekjaer-Mikkelsen AS, Rosenberg T, Jorgensen AL. A new mechanism in blue cone monochromatism. *Hum Genet* 1996; 98:403-408.
20. Stout JT, Caskey CT. The Lesch-Nyhan syndrome: clinical, molecular and genetic aspects. *Trends in Genet* 1988; 4:175-178.
21. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 1991; 349:38.
22. Solari AJ. Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. CRC Press, Boca Raton, 1993.
23. Kay GF, Barton SC, Surani MA, Rastan S. Imprinting and X chromosome counting mechanisms determine *Xist* expression in early mouse development. *Cell* 1994; 77:639-650.
24. Ballabio A, Willard HA. Mammalian X-chromosome inactivation and the *XIST* gene. *Current Opin Genet Develop* 1992; 2:439-447.
25. Lafreniere RG, Brown CJ, Rider S, Chelly J, Taillon-Miller P, Chinault AC, Monaco AP. 2,6 Mb YAC contig of the human X inactivation center region in Xq13: physical linkage of the *RPS4X*, *PHKA1*, *XIST* and *DX-S128E* genes. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1105-1115.



# Capítulo

# 9

## **MEIOSIS, RECOMBINACIÓN Y DISYUNCIÓN. GENÉTICA E INFERTILIDAD**

*La meiosis como proceso fundamental de la reproducción sexual. Complejos sinaptonémicos y cariotipos de complejos: citogenética ultraestructural. 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 aneuploidias. Genética de la infertilidad masculina. Impronta génica. Disomía uniparental y sus efectos patológicos.*

### **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 sexuales pueden adquirir combinaciones ventajosas de genes (fig. 9-1).

La capacidad de los organismos sexuales 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 en donde ocurre la meiosis.

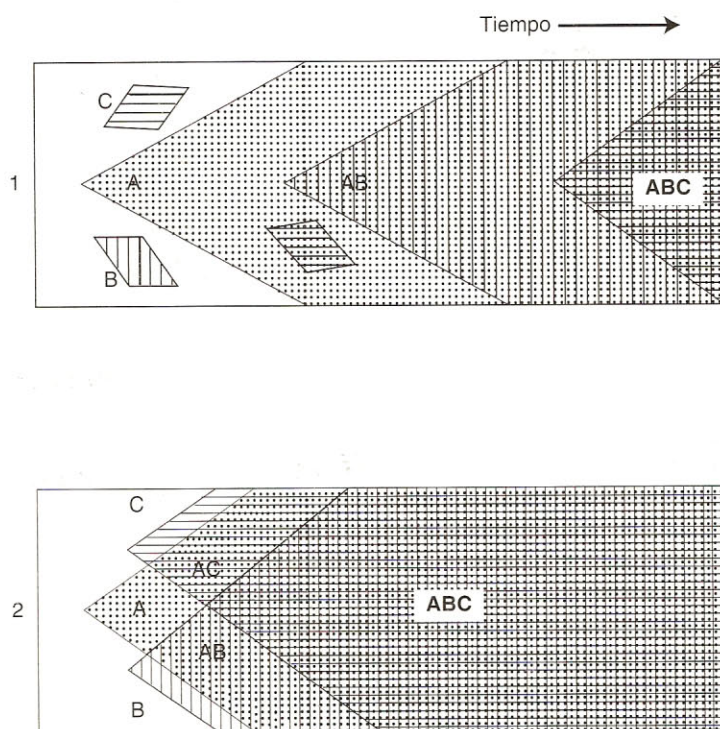
El otro aspecto esencial de la meiosis es más obvio: para que pueda ocurrir la singamia (fertilización) sin que se duplique el número de cromosomas, la meiosis debe reducir pre-

viamente ese número al número haploide (básico).

La meiosis es un proceso complejo, cuyos aspectos moleculares recién ahora están siendo descubiertos. 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, y se ha visto la relación entre los ejes meióticos y los filamentos intermedios de todas las células. Finalmente, la meiosis puede ser el marco de una aberración fuente de enfermedades cromosómicas: la no-disyunción. Además, cuando la meiosis está perturbada, es una importante fuente de esterilidad.<sup>2</sup>

### **Circunstancias temporales de la meiosis humana**

El momento de la meiosis difiere totalmente en los dos sexos. La meiosis humana femenina comienza en el feto, se prolonga extraordinaria-



**Fig. 9-1.** 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.<sup>1</sup>

mente, 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.<sup>3,4</sup> Esto ocurre en los ovocitos más internos y cefálicos 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 8<sup>vo</sup> 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.<sup>3,4</sup>

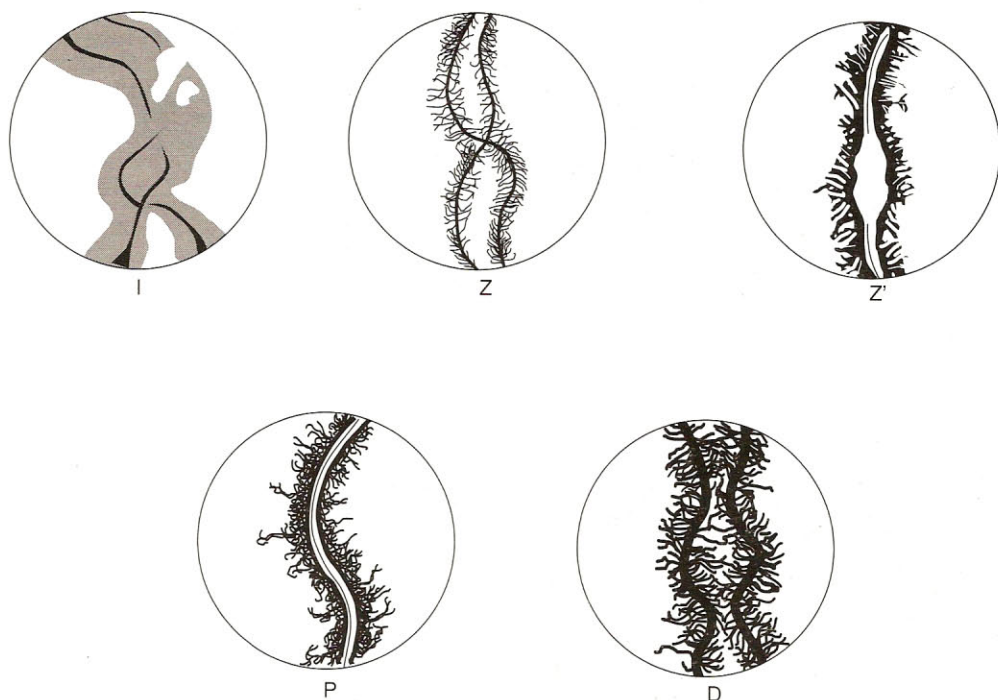
A su vez, el proceso meiótico, en sí mismo, tiene características diferentes en la mujer y en el varón. En la mujer los cromosomas están más elongados durante la primera profase y la tasa de recombinación es mayor que en el varón, por lo cual el mapa de ligamiento de la mujer es más largo (véase cap. 8).

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 espermatocito cumple todas las etapas de meiosis en alrededor de dos semanas,<sup>5</sup> luego de la cual se forma la gameta masculina.

### 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





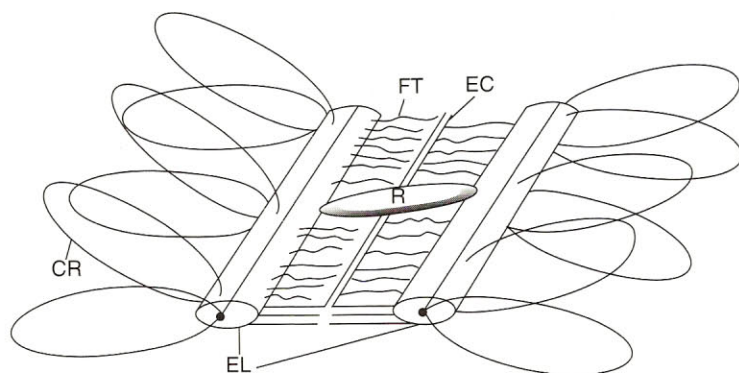
**Fig. 9-2.** Desarrollo de los ejes meióticos y complejos sinaptonémicos durante los estadios de la profase I. I, leptoteno; z,z', cigoteno; p, paquíteno; d, diploteno.

visión 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".<sup>6</sup>

Los fenómenos esenciales de la meiosis son tres (sinapsis, recombinación y disyunción o 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 interfase usual y sólo contiene el conjunto haploide de cromosomas.

La profase de la división I es la etapa más importante; en ella se distinguen los clásicos 5 estadios: leptoteno, cigoteno, paquíteno, diplo-

teno y diacinesis. Estos estadios han sido bien caracterizados por la microscopía 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 apareadas. 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 el apareamiento durante el cigoteno, de modo que se establece el conjunto totalmente apareado en el paquíteno. 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. 9-2) de una forma más definida por el desarrollo del aparato proteínico que por la descripción de los cromosomas vistos con el microscopio de luz.



**Fig. 9-3.** Esquema de la estructura del complejo sinaptonémico. CR: cromatina; EL, EC: elementos laterales y elemento central; FT: filamentos transversales; R: nódulo de recombinación.

El estadio leptoteno puede definirse como aquel en el que 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 a 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 produce 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; sólo quedan remanentes axiales en las regiones centroméricas y en las quiasmáticas.

### Estructura fina de los complejos sinaptonémicos

El complejo sinaptonémico tiene una estructura general muy conservada a lo largo de la evolución, con pocas variantes. El ancho del complejo es de  $2.100\text{\AA}$  (210 nm), con dos elementos laterales de aproximadamente 60 nm

de ancho y un espacio central de alrededor de 100 nm (fig. 9-3).<sup>7,8</sup>

Los elementos laterales están constituidos por un material amorfo y muy afín a las tinciones de plata y al ácido fosfotúngstico, características que dependen de su contenido de proteínas básicas.<sup>9</sup> En algunas especies y en circunstancias especiales, cada elemento lateral puede mostrar componentes lineales; sin embargo, esta subdivisión en filamentos (2 o más) no es permanente y, en especial, no se encuentra durante el diploteno ni durante el cigoteno, cuando los ejes están vinculados con los desplazamientos cromosómicos. Dado que los ejes simples no apareados de los cromosomas sexuales muchas veces se engruesan y dividen en subfilamentos, esta partición transitoria probablemente es el reflejo de cambios secundarios en los elementos laterales. Los elementos laterales conforman 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. Éstos están constituidos principalmente por proteínas, aunque existe ADN central en la base de los lazos de cromatina.

La región central del CS está constituida por elementos fibrilares de muy pequeño diámetro (1,6-2 nm),<sup>10,11</sup> los filamentos transversales, los cuales se ha sugerido que corresponden a dos  $\alpha$ -hélices proteínicas entrelazadas como en el caso de la tropomiosina.<sup>10</sup> Esto es apoyado por recientes observaciones de la proteína Syn1 (véase después). Estos filamentos son rectos e insensibles a la DNasa, pero digeribles por la tripsina; atraviesan 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



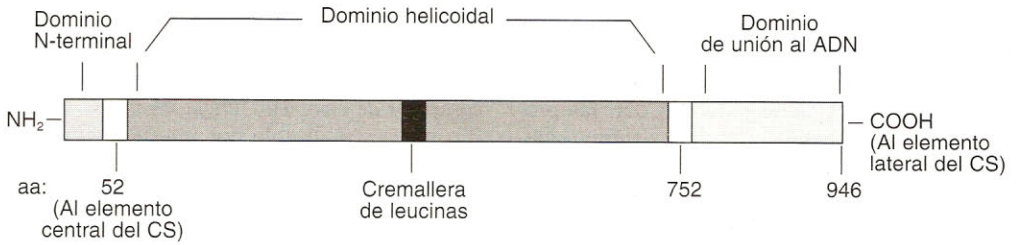


Fig. 9-4. Esquema de la proteína Syn1 (SCP1).

longitudinalmente (que son los que componen el *elemento central*). Los filamentos transversales son las unidades más pequeñas, pero se agrupan en haces de 3 o más filamentos colocados a la misma altura del elemento lateral. En cortes longitudinales, 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 los filamentos intermedios.

### Síntesis de los componentes del complejo sinaptonémico: proteína Syn1 (SCP1)

Recientemente se han decodificado, a partir de genotecas de ADNc, la proteína Cor1, componente de los elementos laterales, y la Syn1 (= SCP1), componente del espacio central (esta última probablemente representa los filamentos transversales del complejo sinaptonémico).<sup>12,13</sup>

La proteína Syn1 = SCP1 está conformada por 946 aminoácidos, 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  $\alpha$ -hélice y es probablemente una espiral enrollada; uno aminoterminal de 52 aa. que es de tipo ácido y con prolinas; y uno carboxi-terminal con características de afinidad por ADN y subdominios básicos (fig. 9-4).

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  $\alpha$ -hélices anfipáticas, las cuales se asocian por interacción hi-

drofóbica y tienen un patrón de repetición de siete aminoácidos (héptada), con el #1 y el #4 hidrofóbicos. Se calcula que este dominio central, filamentososo, tiene una longitud de 100 nm.

El extremo carboxilo presenta el "motivo" S/T-P-X-X (serina/treonina-prolina-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 ácido. El gen de Syn1 se transcribe como un ARN de 4,4 kb exclusivamente en el testículo en los varones y sólo durante los estadios cigoteno a diploteno,<sup>12</sup> sin que se acumule ARNm. Esto muestra que los componentes del CS no aparecen por una redistribución 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 bivalentes se muestra reactiva. Además hay evidencia de que la Syn1 se coloca con su extremo carboxilo dirigido 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 Cor1 y elementos laterales del complejo

La segunda proteína del CS es la Cor1, localizada en los elementos laterales.<sup>13</sup> Es una proteína predicha 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 tiene regiones con repeticiones de tipo héptadas, de modo que podría adoptar la forma espiralada y dimerica de este tipo de filamentos. Cor1 no es el único componente estructural de los elementos laterales; otra proteína, SCP2, de 190 kDa, también es un constituyente de estas estructuras, además de las proteínas "funcionales", con actividad propia, como la topoisomerasa II y la Rad51.

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 paquíteno, los ejes diploténicos y, finalmente, el material axial remanente posdiploténico y el filamento visible en la región centromérica en la metafase I.<sup>13</sup>

### Proteínas especiales del par XY

Recientemente se han observado ciertos componentes que aparecen especialmente en el par cromosómico XY (que se encuentra condensado, en la meiosis de los espermatoцитos de los mamíferos, formando el "cuerpo XY").<sup>14</sup> Uno de los componentes está localizado en los gruesos ejes diferenciados de las regiones diferenciales del cromosoma X y del Y. Esta proteína, denominada XY40, tiene un peso molecular de 40 kDa y un punto isoeléctrico de 5,7. Puede ser extraída de espermatoцитos homogeneizados en una solución de baja fuerza iónica y sin detergentes. Una segunda proteína, la p51, está distribuida homogéneamente en el cuerpo XY, pero también en la región centromérica de autosomas. Esta proteína tiene una movilidad relativa (Mr) de 51.000 pero no ha sido caracterizada.<sup>15</sup> Además, otra proteína (Xmr) se concentra preferencialmente en el cuerpo XY; esta proteína, de 25 kDa, pertenece al grupo de proteínas cuyos genes están ligados al cromosoma X y son regulados en los linfocitos.

### Cariotipos de complejos sinaptonémicos. Citogenética ultraestructural

Dado que un complejo sinaptonémico está asociado con cada par de cromosomas homólogos durante el paquíteno (como fue demostrado por Wettstein y Sorelo)<sup>16</sup> y que las longitudes

de los ejes (o de los elementos laterales) es relacionada con las longitudes de los cromosomas meióticos,<sup>17</sup> cabe la posibilidad de realizar *cariotipos de complejos sinaptonémicos*. En el hombre esto es realizable por una pequeña biopsia testicular y microextendidos de espermatoцитos.<sup>18</sup> El ordenamiento en el cariotipo se realiza por las longitudes relativas de los complejos respecto de la suma del total de las longitudes por la posición de los cinetocoros, que son visibles como densidades ovaladas colocadas en los elementos laterales (fig. 9-5).

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 las bandas G (véase cap. 14), que están algo subrepresentadas en los complejos.

La longitud del complemento de complejos es típica de la especie; en el varón mide 250 micrometros (en la mujer es significativamente menor), aunque varía durante los subestadios del paquíteno, y logra su mínimo durante el paquíteno medio.

### Utilidad y confiabilidad de los cariotipos de complejos sinaptonémicos

El grado de error (en la digitalización, en el muestreo y la calibración de longitudes) en los cariotipos de complejos no supera el 4%, es decir, la confiabilidad de sus medidas es superior al 95%. Las limitaciones de la realización de cariotipos de complejos están dadas por la necesidad de una biopsia (en la mujer, por ser el procedimiento propio de la época fetal, no es factible en necropsia). Además, el fenómeno de "distorsión sináptica" distorsiona la proporcionalidad entre los ejes y cromosomas mitóticos luego del paquíteno temprano. La utilidad mayor de esta técnica en cariotipos estriba en la detección de anomalías estructurales de los cromosomas y en la detección de anomalías de los procesos de la meiosis, que son particularmente útiles para investigar causas de infertilidad en varones. La detección de anomalías estructurales (que puede hacerse además por otros métodos, tales como ba-



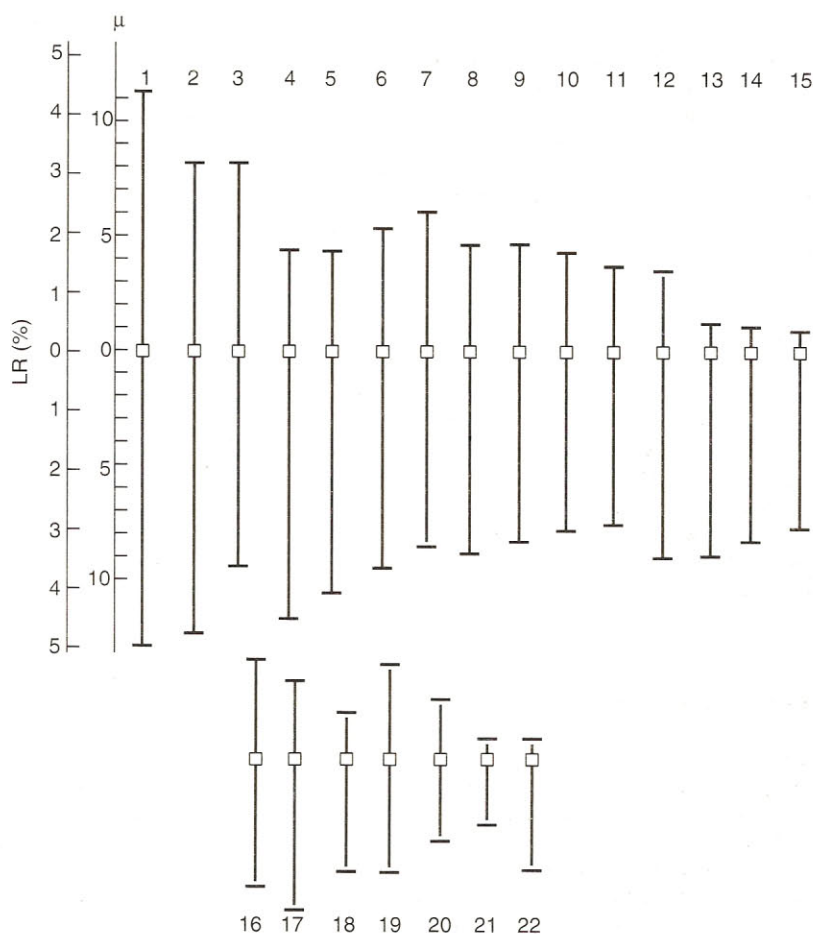


Fig. 9-5. Esquema del cariotipo de complejos sinaptonémicos humanos.<sup>18</sup> LR: longitud relativa (con respecto al total).

do G e hibridación, (véase cap. 14) se basa en que, durante la sinapsis, las regiones delecionadas o duplicadas forman lazos en uno de los elementos laterales, y en las translocaciones, se forman asociaciones de más de dos elementos laterales.

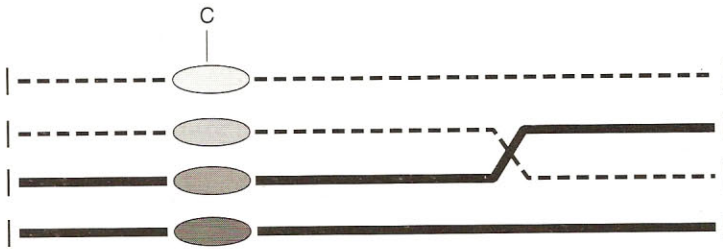
Las anomalías meióticas detectables son variadas: fallas de la sinapsis, fallas en los ejes, alteraciones en la localización y estructura de los nódulos de recombinación y fallas en la condensación cromosómica.

### Quiasmas. Conducta de los ejes durante el diploteno

Durante el paquíteno 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 cambios en las moléculas de ADN. Estos fenómenos de *recombinación recíproca* se visualizan con el microscopio de luz durante el diploteno y en estadios posteriores, hasta la metafase I, en la forma de “quiasmas” (cruz). 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 los 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. 9-6).

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 segregarse (ir a polos diferentes) en forma



**Fig. 9-6.** 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).

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. De los dos tipos de cambio descritos por la Citología clásica (rotación y terminalización) el único real es la rotación, puesto que la "terminalización" es sólo una apariencia de corrimiento del quiasma hacia un extremo cromosómico, producido por los cambios de condensación y acortamiento de los cromosomas. La rotación es una consecuencia de la progresiva separación de los dos cromosomas homólogos que formaban el bivalente en el paquiteno.

Cuando se observan los bivalentes del diploteno con microscopía electrónica, 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"<sup>19</sup> 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).<sup>19</sup> 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.<sup>19</sup> 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; aun más, se sugirió que los ejes sirven de cohesión entre las dos cromátidas hermanas, lo cual fue corroborado por observaciones posteriores (fig. 9-7).

De esta manera, se comprueba que los ejes meióticos son estructuras proteínicas depositadas a lo largo de segmentos no duplicados (des-

de un punto de vista funcional) de cada homólogo. Estos segmentos comunes a las dos cromátidas hermanas de cada homólogo no intervienen, aparentemente, en la recombinación que ocurre en los lazos de fibras de cromatina que se desprenden hacia afuera de los ejes. La estructura de los bivalentes, deducida de las observaciones de la microscopía electrónica, se asemeja a la estructura de los cromosomas "plumulados" que con la microscopía 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 el paquiteno.

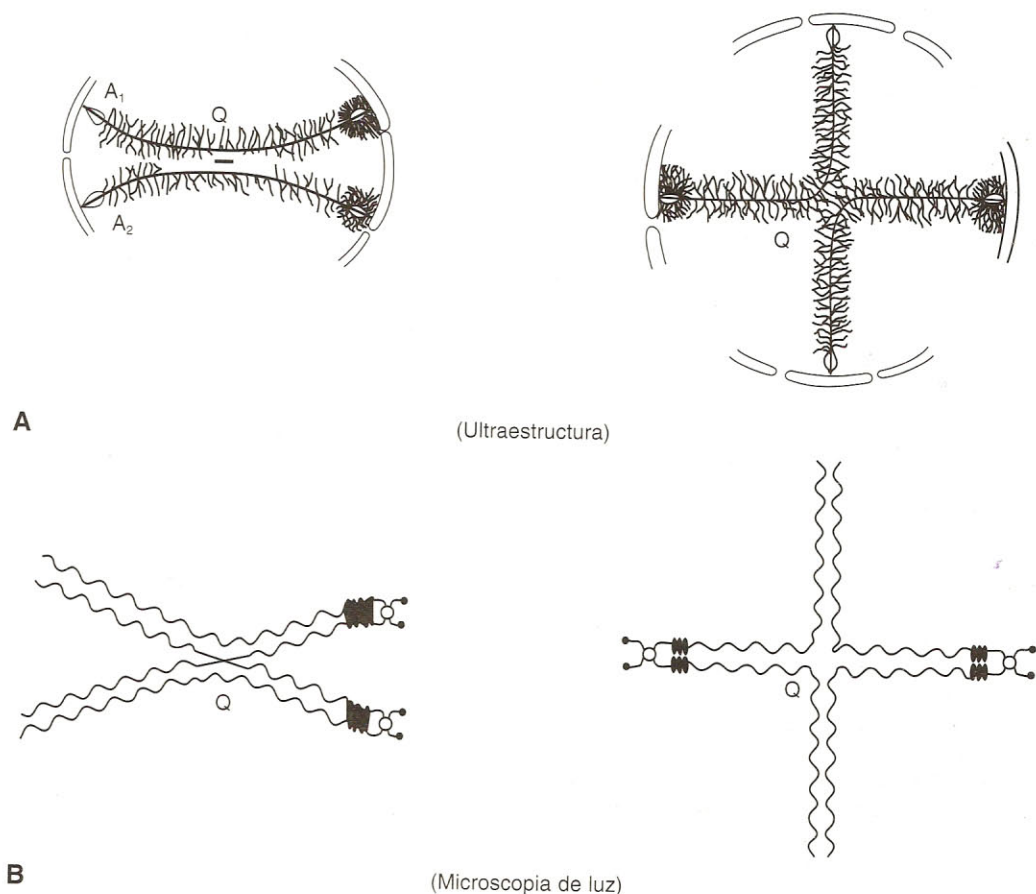
El número promedio de quiasmas en los espermatocitos humanos de personas normales oscila entre 45 y 51;<sup>20</sup> su localización a lo largo de un bivalente no es totalmente al azar, ya que hay preferencia por las zonas terminales y escasez en las centroméricas.

## 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 las moléculas que contienen partes intercambiadas.

La recombinación meiótica, por consiguiente, tiene una gran similitud con el proceso artificial de producción de ADNs mestizos mediante el uso de las enzimas de restricción (véase cap. 2). 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 son realizados de manera independiente en cada meiocito (espermatozoides u ovocitos).





**Fig. 9-7.** Estructura de un bivalente en diplotene temprano (izquierda) y en diplotene medio (derecha). **A.** Estructura visible al microscopio electrónico, **B.** Estructura visible al microscopio de luz. A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, 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 entre las cromátidas hermanas en **B** (en blanco).<sup>19</sup>

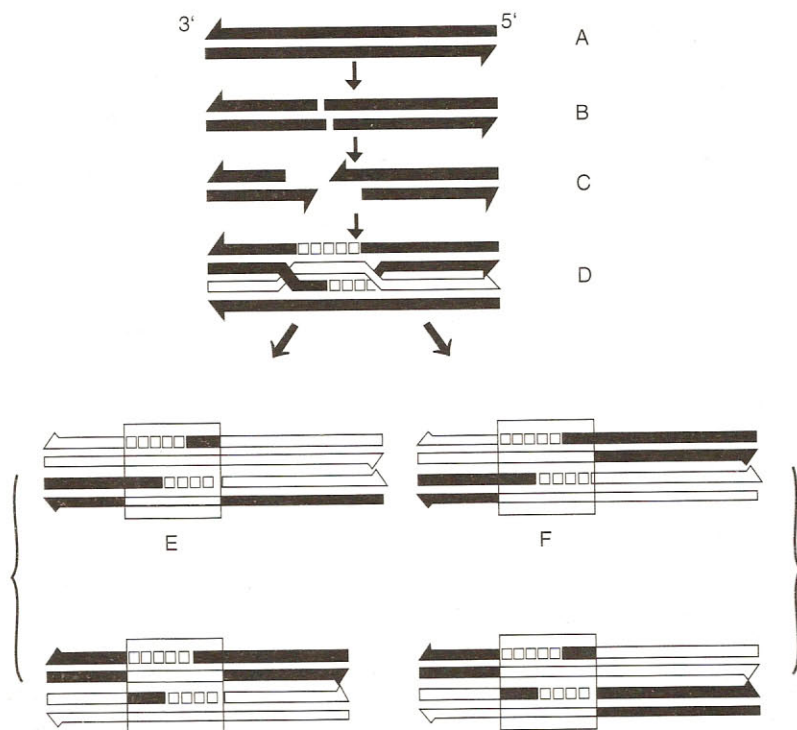
de modo que cada gameto producido llevará combinaciones diferentes de genes, lo cual determina las diferencias genéticas entre hermanos.

Los estudios moleculares de la recombinación meiótica son difíciles por ser un proceso que ocurre en células especializadas y difíciles de cultivar *in vitro*; por eso, la mayoría de los estudios bioquímicos se han llevado a cabo en procariontes y en la levadura, y muy pocos en mamíferos. Sin embargo, de estos estudios ha resultado el concepto de que las bases moleculares de la recombinación son similares en todos los organismos, procariontes y eucariontes. 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 cadena doble y reparación.<sup>21</sup>

### Modelo molecular de la 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



**Fig. 9-8.** 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 2 uniones de Holliday; **E.** Resolución sin intercambio (conversión génica); **F.** Resolución con recombinación recíproca.

la producción de dos moléculas que intercambiaban segmentos (entrecruzamiento o recombinación), 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 de reparación del daño al ADN; es decir que la meiosis está íntimamente relacionada con la reparación del ADN.

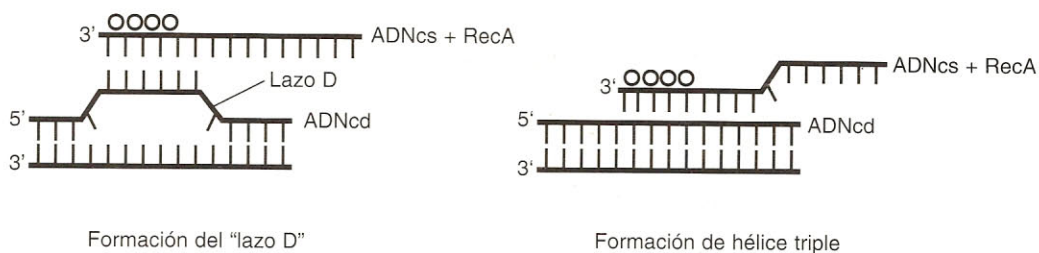
El orden hipotético de los fenómenos en el proceso de la recombinación sería el siguiente (fig. 9-8):

1. Alineamiento de las moléculas homólogas de ADN. Este alineamiento ocurre en la si-

napsis, sin la cual la tasa de recombinación disminuye grandemente.

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. 2). Éste es el mecanismo usado por la célula, y aunque no se han aislado endonucleasas de restricción meióticas, todo hace suponer su existencia.
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 complejo proteínico que mantiene unida la molécula "activa".





**Fig. 9-9.** 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.

- Producción de extremos "invasores" 3' recubiertos de la proteína RecA. En este paso es esencial la intervención de la proteína RecA (Recombinasa A) y de las proteínas que le son homólogas (Rad51 y otras). Una cadena simple de ADN asociada 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.<sup>22</sup>
- Desplazamiento de una cadena del ADN intacto por 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.
- Síntesis de ADN de tipo reparativo, en los extremos 3' de las cadenas rotas, usando las cadenas sanas como templado. Aquí se produce la "conversión génica" en pequeños segmentos.
- 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").
- 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 (Rad51) y RecBCD

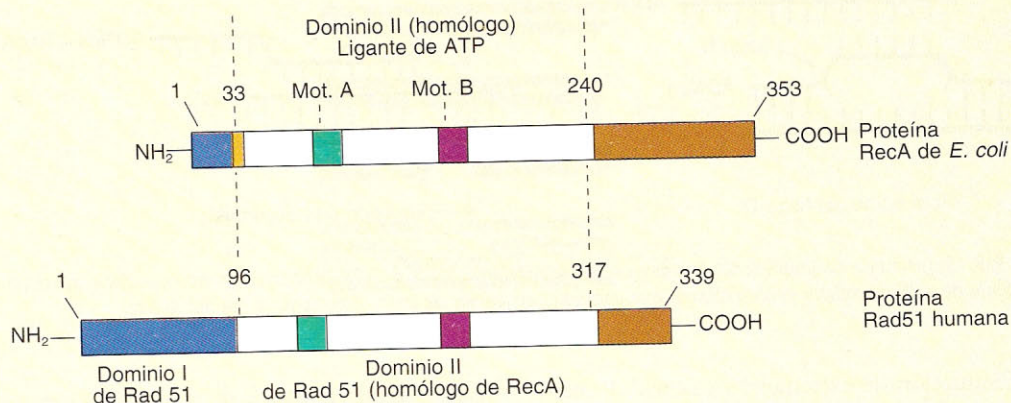
En los procariontes se han estudiado en detalle algunas proteínas que tienen un papel pro-

minente 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. 9-9) 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).<sup>22</sup>

La proteína RecA de *E. coli* ha resultado ser parte de una familia de proteínas muy conservadas 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. 9-10).<sup>23</sup>

La otra recombinasa principal de *E. coli* es la RecBCD; en la bacteria, tiene actividad de helicasa, y desenrolla las hélices del ADN a medida que "camina" por éste; cuando encuentra un octanucleótido "chi", corta la cadena. En mamíferos y en la especie humana no se ha caracterizado este tipo de recombinasa.



**Fig. 9-10.** Estructura de las proteínas RecA de *E. coli* y Rad51 humana. Ambas proteínas comparten el dominio II, los "motivos" A y B, de unión al ATP. El dominio I y el carboxiterminal son diferentes.

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 espermatoцитos, 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.<sup>18</sup>

Estos nódulos son estructuras asociadas con los complejos sinaptonémicos en el paquiteno, que presentan diversa morfología según las especies. Así, en los insectos son esféricos y muy visibles, mientras que en el ratón son poco visibles y más pequeños. 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 transversal a los ejes.<sup>18</sup> El número de nódulos tardíos por núcleo de espermatoцитo humano es en promedio de 45, muy parecido al número de quiasmas.<sup>18</sup> 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 (cerca de los telómeros).<sup>24</sup>

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 timina tritiada.

Los nódulos de recombinación tardíos probablemente la expresión morfológica de un complejo de proteínas, muchas de ellas con sus sustratos, concentrado en la región donde ocurre un fenómeno de recombinación génica. La identificación de estos nódulos como lugares de recombinación parece apoyarse fundamentalmente en la identidad de localización de los nódulos y la recombinación en las regiones pseudoautosómicas de pares de cromosomas sexuales.<sup>2</sup>



## 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 sí separan segmentos de cromátidas hermanas).

Esta diferencia entre la metafase I y la mitosis está basada precisamente en la existencia de un aparato proteínico (el complejo sinaptonémico) 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. La hipótesis enunciada en 1970 de que esta asociación servía además como un pegamiento entre las cromátidas hermanas ha recibido progresivos apoyos; uno de los más importantes es la observación de que en ciertos organismos en los cuales hay cromosomas que no forman ejes durante la profase meiótica, justamente esos cromosomas se comportan como en una mitosis, es decir, se separan las cromátidas hermanas en la anafase I.<sup>25</sup>

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).<sup>26</sup> 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.<sup>27</sup> Aunque la identificación bioquímica de este material no ha sido definida, al menos la proteína Cor1 (véase antes) 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, al menos, un quiasma 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

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 aneuploidia. La aneuploidia (presencia de un número cromosómico anormal, véase cap. 14) está presente en alrededor del 0,3% de los recién nacidos; en tales casos se presenta generalmente como cuadros graves de trisomía de un autósoma (#21, #13, #18) o como una anomalía numérica de los cromosomas sexuales (XXY, XO, XXX y otras). Sin embargo, la presencia de aneuploidia en el momento de la fertilización es mucho mayor, pero queda oculta por la inviabilidad de gran parte de los embriones; así, se observa que el 35% de los abortos espontáneos son aneuploides,<sup>28</sup> mientras que el 4% de todos los embarazos pueden serlo.



**Panel 9-1. Detección de aneuploidia en los espermatozoides humanos: aplicación de las técnicas de HISYF (FISH).** 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 extendido 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 aneuploidia en estos gametos. Los espermatozoides se tratan con ditiotreitolo 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 diploidia. 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.<sup>29</sup> 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 aneuploidia sexual,<sup>30</sup> lo cual ha sido plenamente corroborado por el estudio de complejos sinaptonémicos.<sup>31</sup>

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 aneuploidias (véase el panel 9-1). Esto se ha demostrado mediante el análisis de un gran número de espermatozoides mediante HISYF (= FISH, véase cap. 14): 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%).<sup>32</sup> 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 aneuploidia autosómica (#21, #13 y #18) y de la producción de trisómicos 47, XXX (90% del total es de origen materno),<sup>33</sup> 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 aneuploidia XXY.<sup>33</sup> Esta diferencia de la no-disyunción entre los sexos está relacionada con la presencia del par XY en el varón con una región pseudoautosómica corta que res



tinge la posibilidad de quiasmas y predispone a la no-disyunción de los cromosomas sexuales, sin tener relación alguna con la edad.

Del examen de un número de casos de aneuploidia de origen materno, se ha deducido que hay 5 tipos de mecanismos involucrados, 3 de los cuales dependen de una alteración previa de la recombinación meiótica: a) no-disyunción aquíasmática del par involucrado, b) con exceso de intercambios en la región centrométrica, c) normoquíasmática, d) no-disyunción 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.

### Conducta de los cromosomas X e Y en la meiosis masculina

En el hombre, al igual que en el resto de los mamíferos, los cromosomas sexuales desiguales, X e Y, no pueden aparearse durante la meiosis, excepto por una pequeña región, la región pseudoautosómica (véase cap. 7). Además de esta "sinapsis parcial", los cromosomas X e Y desarrollan durante el paquíteno una especial condensación de la cromatina que los compone, de tal forma que constituyen un corpúsculo especial, pegado a la cara interna de la carioteca del espermatocito, llamado cuerpo XY.<sup>14</sup> La formación del cuerpo XY está vinculada con la actividad del gen *XIST*, gen ubicado en el cromosoma X que determina la compactación de la cromatina de ese cromosoma; la compactación de la cromatina del Y parece ser secundaria a la del X. Desde el punto de vista funcional, ambos cromosomas sexuales quedan transcripcionalmente inactivos durante el paquíteno, excepto unos pocos genes que corresponden a la región pseudoautosómica y algunos otros que no sufren la influencia represora del producto *XIST*.

### 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 genéti-

co 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 anormalías tanto de cromosomas sexuales como autosómicos, cuyos efectos son observables mediante el análisis de la conducta de los complejos sinaptonémicos durante la meiosis.<sup>34</sup> Las aneuploidias, 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 desaparición 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 anti-mülleriana por parte de las células de Sertoli es perjudicial para las células germinales con XX o XXY; posteriormente, el desarrollo de espermatogonios no es normal para células con más de un cromosoma X, y 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 acarrear 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.

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. Recientemente se ha aislado el ADN de un presunto gen, AZF ("factor de azoospermia"), localizado en Yq11.23, que se presenta en copias repetidas de dos genes muy parecidos, el RBM1 y el RBM2 (o YRRM1 y YRRM2) (difieren en 7 sustituciones y 5 bases perdidas en el RBM2), los cuales codifican polipéptidos de 496 y de 419 aminoácidos, respectivamente. El nombre de estos genes proviene de una secuencia especial de reconocimiento para ARN ("motivo de reconocimiento de ribonucleico"). Por otra parte, se encuentran conservados en otros mamíferos y se presume que actúan en el procesamiento de ARN transcrito en las células germinales testiculares. Estas secuencias están alteradas o con deleciones en pacientes que presentan azoospermia, por lo cual se piensa que dichos genes son necesarios para la espermatogénesis normal; otros genes presentes en el cromosoma Y normal también están involucrados en este proceso.

### Impronta génica. Síndromes de Prader-Willi y de Angelman

Se ha visto en el capítulo 8 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 demetilado 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 demetilado 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 haploide 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 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.<sup>35</sup> Los síndromes de Prader-Willi y de Angelman parecían ser enfermedades hereditarias totalmente independientes hasta que se descubrieron sus mecanismos de impronta génica (cuadro 9-1).

La delección 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 de



**Cuadro 9-1.** 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 <i>paterno</i>	Con cariotipo anormal:	del (15q11-q13); alrededor 50%; el cromosoma es <i>materno</i>
Cariotipo normal:	Disomía uniparental, origen <i>materno</i>	Cariotipo normal:	Disomía uniparental, origen <i>materno</i>
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

cromosoma deleciónado: 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*: 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 probablemente la presencia de genes controladores del tipo de impronta, distintos para la espermatogénesis y la ovogénesis.<sup>35</sup>

## 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 leptoteno y los complejos sinaptonémicos durante el cigoteno y el paqui-

teno. 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 ADN axial y a los costados tienen amplios puentes de cromatina, que tienen su base de inserción en los propios EL. En el espacio central están los filamentos transversales muy finos (1,6-2 nm), proteínicos, que representan hélices. La proteína Syn1, de 946 aminoácidos y 111 kDa de peso molecular es el principal componente de los filamentos transversales; su dominio central es una  $\alpha$ -hélice capaz de formar asociaciones diméricas como en los filamentos intermedios; su extremo carboxilo se une a ADN y está orientado hacia el espacio central, mientras su extremo N-terminal está orientado hacia el elemento lateral central. La proteína Cor1, de 234 aa. y 30 kDa es el principal componente conocido de los filamentos laterales; además, se encuentran SCP2, de 190 kDa y otras proteínas "funcionales" como la topoisomerasa II y la Rad51. En los ejes engrosados del paquiteno se encuentra la proteína de 40 kDa, Xmr, también, en forma difusa, la proteína p100 (40 kDa) y la Xmr. Se pueden realizar cariotipos de CS sobre la base de su longitud relativa y la posición del cinetocoro; estos cariotipos son muy similares a los mitóticos; cada uno corresponde a un par cromosómico, son más pequeños que los cromosomas mitóticos y tienen una longitud total de 258  $\mu$ m. Estos cariotipos son útiles para detectar anomalías cromosómicas y meióticas. Los quiasmas son la visibilización con microscopio de luz, en el diploteno, de los fenómenos de recombinación recíproca; cada quiasma se entrecruzan dos cromátidos homólogos de las cuatro que forman un bivalente del diploteno. La ultraestructura de los quiasmas muestra que tienen dos fases: la fase de leptoteno muestran un segmento de CS en la región de convergencia de los ejes y la fase del paqui-



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. 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 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 4 cadenas en 2 moléculas bicatenarias requiere de las enzimas RuvA, B y C, así como de ligasas para ADN. La proteína RecA se une preferencialmente a ADN de cadena simple formando un filamento helicoidal de 10 nm de ancho y 9,3 nm de paso, que tiene afinidad y puede asociarse a moléculas de ADN de cadena doble. La asociación entre el filamento "invasor" y una molécula de ADN se hace en la forma de una triple hélice, en donde 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 homóloga 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 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 4 cinetocoros se comporten funcionalmente sólo como 2, 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 remanente de los ejes meióticos, localizado en los centrómeros, visible como un filamento centromérico e identificable como 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 aneuploidia 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,YYY 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), con los genes RBM1 y RBM2, que presentan deleciones o se hallan o alterados 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 en el cromosoma 15 (Prader-Willi) o de la materna (Angelman) en el mismo cromosoma.

## REFERENCIAS

1. Maynard Smith J. The evolution of sex. Cambridge, University Press, Cambridge, 1978.
2. Solari AJ. Sex chromosome pairing and fertility in the heterogametic sex of mammals and birds. En: Gillies, C.D. (editor), Chromosome pairing and fertility, CRC Press, Boca Raton, 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. Stern H. Initiation of meiosis in lily and mouse: some molecular considerations. *Arch Anat Micr Morphol Exp* 1985; 74:10-13.
7. Westergaard M, von Wettstein D. The synaptonemal complex. *Ann Rev Genet* 1972; 6:71-110.



8. von Wettstein D, Rasmussen SW, Holm PB. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Ann Rev Genet* 1984; 18:331-413.
9. Tandler CJ, Solari AJ. Methanol-acetyl anhydride: an efficient blocking agent for electron microscope cytochemistry. Its application to mouse testis and other tissues. *Histochemistry* 1982; 76:351-361.
10. 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.
11. 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.
12. Meuwissen RLJ, Offenbergh 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.
13. Dobson MJ, Pearlman RE, Karaiskakis A, Spyropoulos B, Moens PB. Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* 1994; 107:2749-2760.
14. Solari AJ. The behaviour of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol* 1974; 38:273-317.
15. Smith A, Benavente R. An Mr 51.000 protein of mammalian spermatogenic cells that is common to the whole XY body and centromeric heterochromatin of autosomes. *Chromosoma* 1995; 103:591-596.
16. Wettstein R, Sotelo JR. Electron microscope serial reconstruction of the spermatocyte I nuclei at pachytene. *J Microscop* 1967; 6:557-576.
17. Solari AJ. The spatial relationship of the X and Y chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 1970; 29:217-230.
18. Solari AJ. Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 1980; 81:315-337.
19. Solari AJ. The behavior of chromosomal axes during male meiotic prophase. En: *The Regulation of Mammalian Reproduction* (Segal SJ, Crozier R, Corfman PA, Condliffe PG, ed.). Springfield: C Thomas Publisher 1973; pp. 91-99.
20. Fang JS, Jagiello GM. An analysis of the chromomere map and chiasmata characteristics of human diplotene spermatocytes. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 47:52-57.
21. Stahl FW. The Holliday junction on its thirtieth anniversary. *Genetics* 1994; 138:241-246.
22. 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.
23. Heyer WD. The search for the right partner: homologous pairing and DNA strand exchange proteins in eukaryotes. *Experientia* 1994; 50:223-233.
24. Solari AJ. Recombination bars in human synaptonemal complexes spread with sodium dodecyl sulphate. *Micr Electrón Biol Cel* 1983; 7:1-11.
25. Solari AJ. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae; Hemiptera). *Chromosoma* 1979; 72:225-240.
26. Miyazaki WY, Orr-Weaver TL. Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. *Ann Rev Genet* 1994; 28:167-187.
27. Solari AJ, Tandler CJ. Presence of a centromeric filament during meiosis. *Genome* 1991; 34:888-894.
28. Hassold TJ. Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends in Genet* 1986; 2:105-110.
29. Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: The use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction. *Amer J Hum Genet* 1996; 58:356-362.
30. Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R, Sele B. Meiotic behaviour of sex chromosomes investigated by three-colour FISH on 35.142 sperm nuclei from two 47,YYY males. *Hum Genet* 1997; 99:407-412.
31. Solari AJ, Rey Valzacchi G. Prevalence of a YY synaptonemal complex over XY pairing in an XYY man with exclusive XYY spermatocytes. *Chromosome Res* 1997; 5:467-474.
32. Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: results of two- and three-color fluorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X and Y. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71:47-53.
33. MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE, Jacobs P. The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Human Mol Genet* 1994; 3:1365-1371.
34. Solari AJ. Genética en la infertilidad masculina. *Bolet Soc Arg Andrología* 1994; 3:67-77.
35. Nicholls RD. New insights reveal complex mechanisms involved in genomic imprinting. *Am J Hum Genet* 1994; 54:733-740.

# Capítulo

# 10

## **ENFERMEDADES DE HERENCIA MULTIFACTORIAL 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. Diabetes mellitus. Hipertensión arterial: formas mendelianas y forma esencial. Malformaciones. 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. 10-1 A). 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. 10-1 B). De ese modo, las curvas de distribución de intensidad de un rasgo métrico pueden dar una

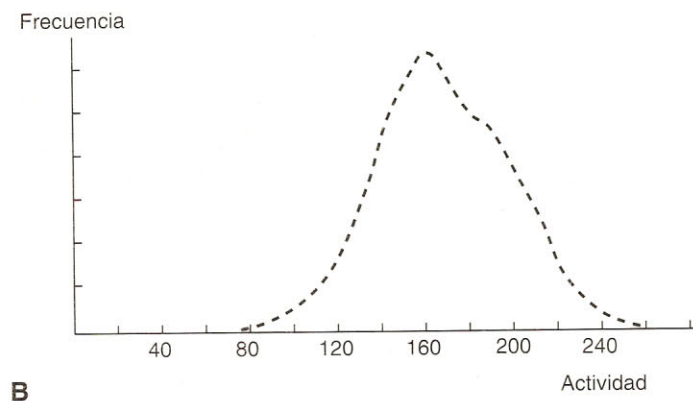
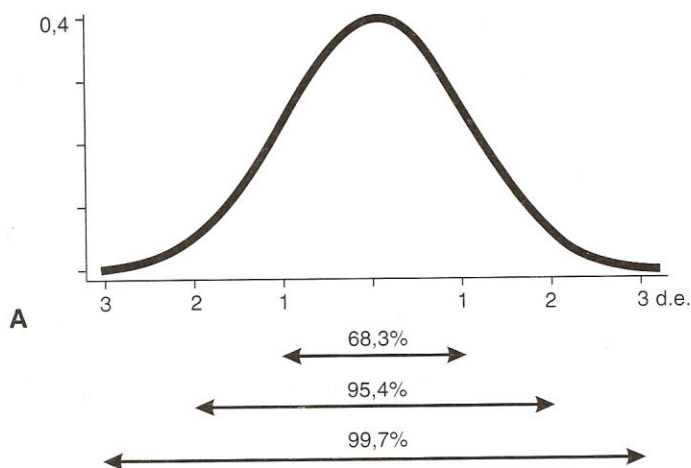
indicación inmediata del tipo de factor genético implicado en ese rasgo.

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 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 mendelia-





no 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 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. 1). 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 recuento de crestas dérmicas en cada miembro de la pareja permite inferir cuál es el grado de similitud genómica entre parientes (p. ej., el

**Cuadro 10-1.** Coeficiente de correlación entre parientes, medido en el recuento total de crestas dérmicas<sup>1</sup>

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

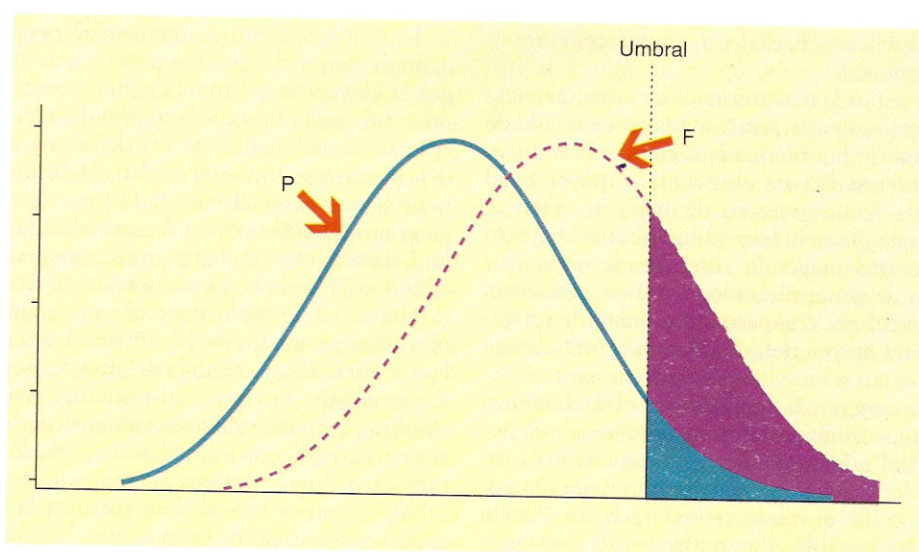
grado de similitud de los genomas de los hijos respecto de los padres). Para ello se utiliza el "coeficiente de correlación" entre las medidas de padres y de hijos. De esta manera se ha medido la similitud genómica entre parientes (cuadro 10-1). Esta similitud medida se asemeja muy estrechamente a la 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 10-1 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 discontinuidad: 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 extremo, luego de un umbral de compromiso, se encuentran los afectados por la enfermedad (fig. 10-2).<sup>2,3</sup>

Un ejemplo demostrativo de enfermedad multifactorial es el paladar hendido. Esta malformación se debe a la falta de cierre de los pro-



**Fig. 10-2.** 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.



cesos 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 que inducen la falta de cierre en animales de experimentación (como los corticoides), de tal modo que este cierre se halla expuesto a errores genéticos y a factores ambientales que lo alteran. En la especie humana, la heredabilidad del paladar hendido completo (labio y paladar) se estima en alrededor del 70%, 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 un grado de severidad mayor 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.

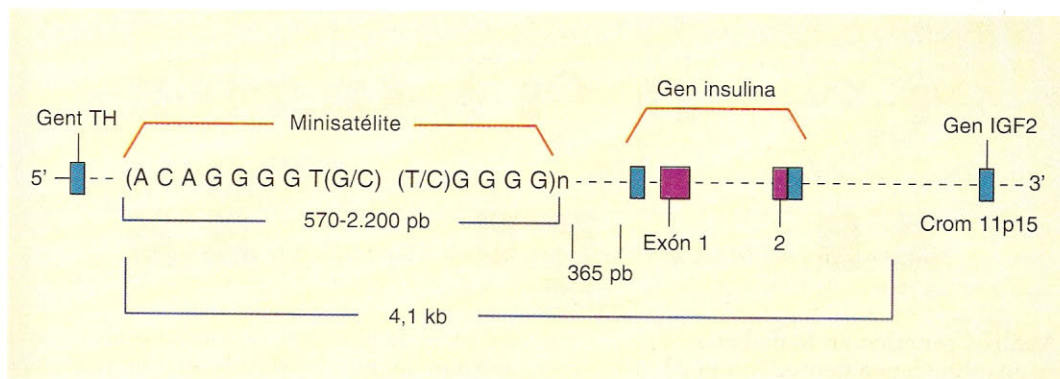
Estas reglas tienen un valor relativo en la práctica, pero han servido para definir cuáles podrían ser las enfermedades multifactoriales. En la actualidad, la investigación de estas enfermedades se centra en identificar los genes responsables de la "intensidad de compromiso" definida con anterioridad.

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.

### "Diseccción genética" en la diabetes mellitus: forma 1, insulino dependiente

La diabetes mellitus (azucarada) es en realidad un grupo de enfermedades caracterizadas por la elevación del nivel de glucosa en la sangre y por un conjunto de anomalías metabólicas acompañadas de un deterioro general del organismo, con arteriosclerosis, retinopatía, neuropatías, alteraciones de la función renal y glucosuria. Se distinguen dos grandes grupos en la diabetes: 1) la diabetes insulino dependiente (DID) y 2) la diabetes no insulino dependiente (DNID). La primera aparece precozmente, a una edad promedio de 12 años, sin obesidad y con tendencia a la pérdida de peso, a la acidosis y con peligro de coma; los pacientes requieren insulina, y la mayoría presenta anticuerpos antipáncreáticos, por lo cual se la considera una enfermedad autoinmune. La segunda (forma 2, DNID) aparece más tardíamente, en la madurez; es más frecuente (la padecen 1 de cada 20 personas), se presenta generalmente en obesos, con un significativo factor nutricional, y se medica sin requerir insulina. Esta forma 2 a su vez





**Fig. 10-3.** 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 tirosina-hidroxilasa; IGF2: comienzo del gen del factor de crecimiento pseudoinulínico. El sector de 4,1 kb comprende el gen de la insulina y la región previa que contiene el minisatélite regulador.

es heterogénea, ya que se distingue una forma de diabetes con aparición en la transición de la juventud a la madurez.

La forma 1 (DID) es la más analizada desde el punto de vista genético. Esta forma de diabetes es poligénica; por lo menos, presenta los siguientes genes contribuyentes a su susceptibilidad: 1) el componente del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), localizado en el cromosoma 6p21 (IDDM1), 2) el locus de susceptibilidad vecino al gen de la insulina en el cromosoma 11p15 (IDDM2), y 3) componentes génicos menores en 15q (IDDM3), en 11q (IDDM4), en 6q (IDDM5) y en 2q (IDDM7).

El factor génico IDDM2 ha sido identificado recientemente como un "ADN minisatélite" (véase cap. 3) localizado en la región previa al comienzo del gen de la insulina, por lo que resulta ser una repetición en tándem de número variable (RTNV = VNTR) (véase cap. 8) (fig. 10-3).<sup>4,5</sup> El reconocimiento de que el "gen" de susceptibilidad a la diabetes 1 IDDM2 es en realidad una secuencia repetida, un minisatélite, asigna por primera vez una función concreta a este tipo de secuencias. El minisatélite está colocado en la región previa al gen, más concretamente en la región proximal (5') del promotor del gen de la insulina, a 365 pb del lugar de comienzo del transcrito primario.<sup>5</sup> El minisatélite consta de una unidad de repetición de 14 nucleótidos con gran riqueza de guanina, que pueden repetirse hasta 157 veces. Este minisatélite es polimórfico en la población humana, porque el número de repeticiones es variable; las distintas clases del minisatélite se clasifican por su longitud: clase I, en promedio 570 pb; clase II, en promedio 1.200 pb,

y clase III, en promedio 2.200 pb. La observación relevante es que las distintas clases se acompañan, tanto de diferente nivel de transcripción del gen de la insulina, como de diferente grado de susceptibilidad a la diabetes 1: en general, cuanto mayor es la longitud del minisatélite, menor es la transcripción del gen de la insulina *in vivo*;<sup>4</sup> cuanto más largo el minisatélite, mayor es la susceptibilidad. El mecanismo de acción de esta secuencia minisatélite está en discusión. Por un lado, se ha observado que esta secuencia tiene afinidad por una proteína, el factor de transcripción *Pur-1*, que a su vez puede inducir una variación en la tasa de transcripción del gen de la insulina; es posible que las variaciones en la longitud del minisatélite se traduzcan en variaciones de la afinidad para el factor de transcripción citado. Por otro lado, esta secuencia, muy rica en G, tiene varias peculiaridades: puede adoptar una conformación especial, de tipo tetracatenaria, y tiene tendencia a sufrir "impronta génica" y, posiblemente, metilación. Se postula que las variaciones en esta secuencia pueden interferir en el aparato transcripcional del gen de la insulina. En cuanto al mecanismo por el cual estas variaciones de transcripción del gen de la insulina estén finalmente vinculadas a un daño autoinmune de las células  $\beta$  del islote, aún no se ha avanzado significativamente.

Otro factor de susceptibilidad a la DID, ya mencionado, se encuentra en la región del CMH (también llamada HLA = ALH, Antígeno Leucocitario Humano), ubicada en el cromosoma 6p. La susceptibilidad a la DID está ligada a DR3 y DR4 en esta región, pero no se conoce su mecanismo de acción.<sup>6</sup>



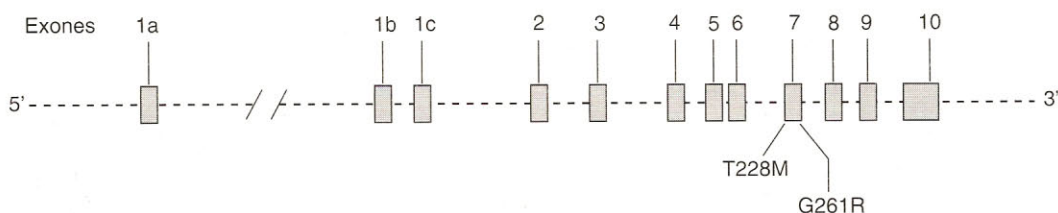


Fig. 10-4. Esquema del gen de la glucoquinasa humana (GCK) y algunas de sus mutaciones.

### Análisis genético en la diabetes no insulín dependiente (forma 2)

Esta forma de diabetes es aun más heterogénea, pues tiene un significativo factor nutricional (ambiental). Recientemente, ha cobrado importancia el papel del gen de la glucoquinasa en la DNID. La glucoquinasa es una enzima del hígado y de los islotes de Langerhans (células  $\beta$ ) que fosforila la glucosa a glucosa-6-fosfato y que tiene un papel relevante en el control del nivel de glucosa en la sangre; en el hígado, esta enzima mantiene un flujo de glucosa desde la sangre al interior de los hepatocitos; en las células  $\beta$  del islote la enzima interviene en un mecanismo de retroalimentación para el control de la glucemia por la insulina. El gen de la glucoquinasa se encuentra en el cromosoma 7p y consta de 12 exones (fig. 10-4).<sup>7</sup>

El gen humano produce transcriptos primarios alternativos, usando promotores y empalmes alternativos. En las células  $\beta$  del páncreas, los exones 1a y 2-10 codifican la glucoquinasa de células  $\beta$ , mientras que en el hepatocito se usan los exones 1b o 1c y 2-10 para las glucoquinasas hepáticas; por eso las proteínas pueden tener 464, 465 o 466 aminoácidos. Se han identificado al menos 20 mutaciones en este gen,<sup>8</sup> que incluyen las de cambio de sentido T228M y G261R, ubicadas en el exón 7 y que corresponden al dominio catalítico de la enzima. Estas mutaciones se han encontrado en la diabetes (forma 2) que comienza en la transición de la juventud a la madurez (tipo "MODY") y no en controles.

El papel de las mutaciones en este gen probablemente es el siguiente: las mutaciones disminuyen la actividad de la enzima (y en ciertos casos la anulan para ese alelo), por lo cual queda insuficiente actividad enzimática provista por el alelo sano (insuficiencia haploide). Si bien la glucosa es fosforilada, hay menor afinidad de la enzima para unirse a la glucosa, de modo que será necesaria una mayor concentración de glucosa sanguínea para que la enzima continúe actuando; de esta manera, el control

del nivel de glucemia se instala en un escalón más alto. Es muy probable la relevancia de estas mutaciones en la forma "MODY" de la diabetes 2. Aunque en otras formas clínicas esta enzima puede estar indemne, hay indicios de que contribuye a la susceptibilidad a la diabetes (forma 2) en la población general, junto con otros factores genéticos, y al exceso de ingesta de hidratos de carbono.

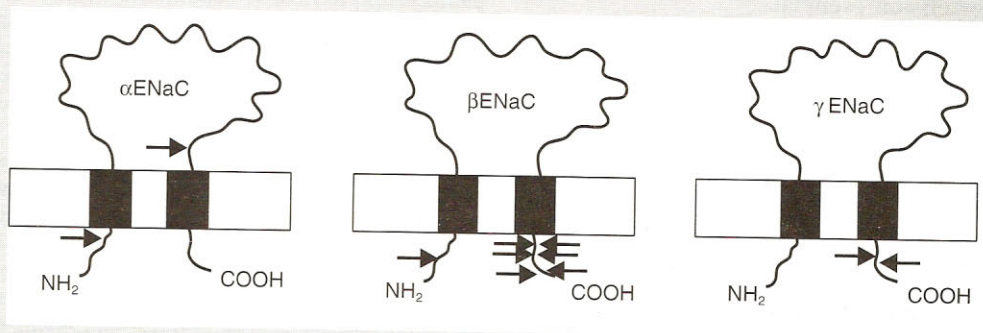
### Diseción genética de la hipertensión esencial

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.<sup>9</sup> 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 (véase panel 10-1)

Este síndrome se hereda con características de autosómico dominante. El síndrome de





**Fig. 1.** Subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del canal epitelial de sodio del túbulo contorneado distal (ENaC). Las flechas señalan la ubicación de los defectos en el síndrome de Liddle.

### **Panel 10-1. 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, por defectos genéticos del canal epitelial de sodio, que afectan ya sea a la subunidad  $\beta$  o a la subunidad  $\gamma$ , como se ha demostrado recientemente.<sup>10</sup> Este canal de la membrana de las células epiteliales del túbulo contorneado distal consta de tres subunidades de estructura similar, la  $\alpha$ , la  $\beta$  y la  $\gamma$  (véase 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 intramembranas, 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.<sup>10,11</sup> Por otra parte, mutaciones en las subunidades  $\alpha$  o  $\beta$ , pero en otra región muy distinta, cerca del extremo amino, causan un síndrome opuesto, de hipotensión congénita, hereditaria y recesiva, el pseudohipoaldosteronismo de tipo "I".<sup>11</sup> Otro tipo mendeliano de hipertensión, el aldosteronismo remediable por glucocorticoides (autosómico dominante) también ha sido esclarecido.<sup>11</sup>

Liddle (o pseudoaldosteronismo) 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 recientemente, con el análisis del gen del canal de sodio del epitelio tubular, denominado subunidad  $\beta$  del canal epitelial de sodio (" $\beta$ -ENaC").<sup>12</sup> Este gen está localizado en el cromosoma 16p. En los enfermos de este síndrome se encontró en el codón Arginina-564 una mutación C  $\rightarrow$  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 tres 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  $\beta$  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.<sup>12</sup>

Liddle (o pseudoaldosteronismo) 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 recientemente, con el análisis del gen del canal de sodio del epitelio tubular, denominado subunidad  $\beta$  del canal epitelial de sodio (" $\beta$ -ENaC").<sup>12</sup> Este gen está localizado en el cromosoma 16p. En los enfermos de este síndrome se encontró en el codón Arginina-564 una mutación C  $\rightarrow$  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 tres 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  $\beta$  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.<sup>12</sup>



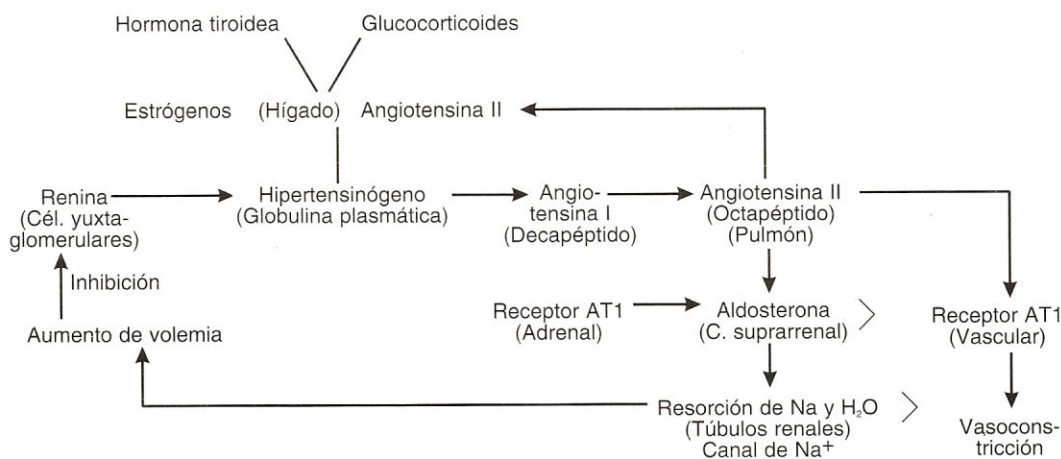
## Hipertensión esencial. Papel del gen del angiotensinógeno

La hipertensión primaria o esencial comprende alrededor del 95% de los pacientes con hipertensión y se cataloga como una enfermedad 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. 10-5). 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 pa-

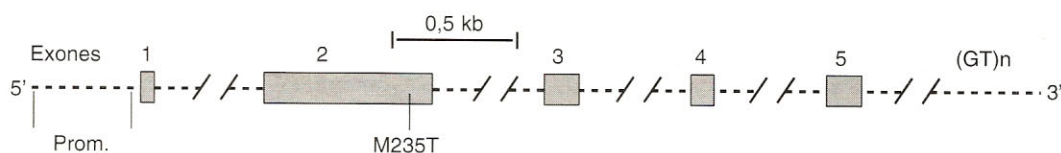
cientes hipertensos; 3) el aumento de la presión luego de la administración de angiotensinógeno, y su disminución, luego de la administración de anticuerpos anti-angiotensinógeno; 4) el nivel incrementado de angiotensinógeno en hijos de hipertensos con presión elevada, y 5) las experiencias con animales 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.<sup>13</sup>

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. 10-6).<sup>13,14</sup>

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 mostraron 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



**Fig. 10-5.** Esquema del sistema renina-angiotensina de homeostasis del tono vascular y del nivel de agua y sal. Hipertensinógeno = Angiotensinógeno.



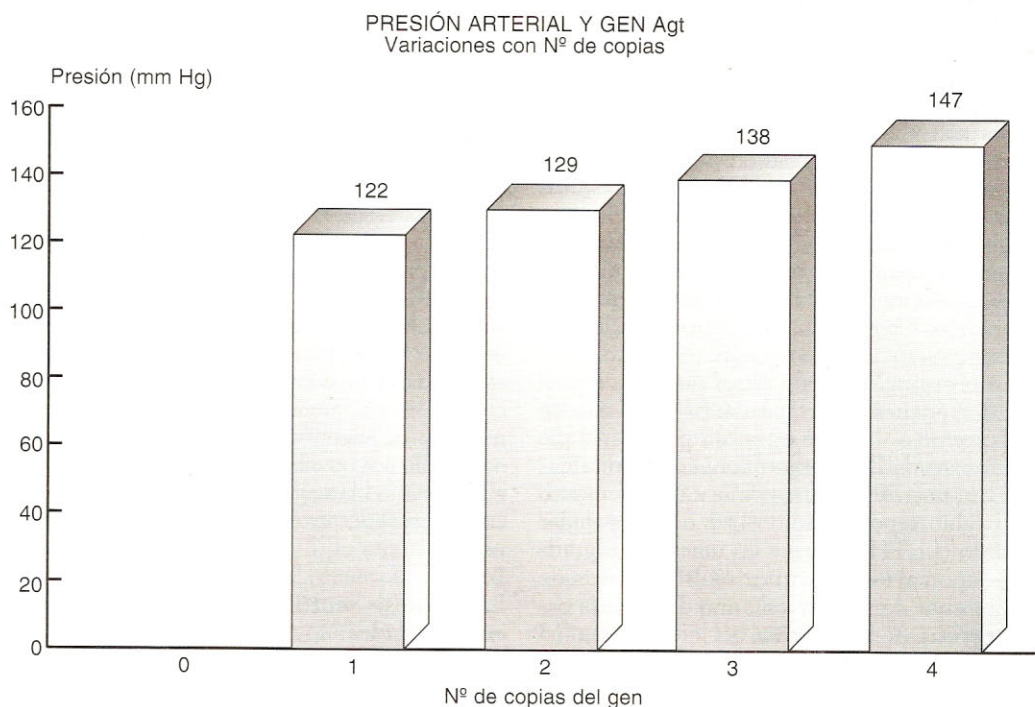
**Fig. 10-6.** Esquema del gen del angiotensinógeno humano (AGT). Prom: región promotora compleja, con 13 sitios de reconocimiento; M235T: variante mutacional ligada a hipertensión. (GT)<sub>n</sub>: repetición de denucleótido.

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 recientes 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.<sup>15</sup> 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. 10-7).

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.<sup>16</sup>

### 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



**Fig. 10-7.** Gráfico de la relación entre presión arterial (media) y número de copias del gen del angiotensinógeno (Agt). (Datos de Smithies y Maeda).<sup>15</sup>



involucrados. Sin embargo, es posible separar las malformaciones en dos grupos: a) aquellas en las cuales el factor genético no es claramente el prevaiente 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 a 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;<sup>17</sup> 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. 14), 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 mal-

formación 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 a 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.<sup>3</sup> 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 bebé 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, siendo blancos probables los genes involucrados en el desarrollo de los arcos branquiales.

### La hipótesis multifactorial en otras enfermedades

Los datos de incidencia en gemelos monogóticos y las estadísticas de frecuencia intrafamiliar han sugerido que un número de importantes enfermedades psiquiátricas, como la es-



quizofrenia y la enfermedad bipolar (maníaco-depresiva), tienen un importante componente genético. Sin embargo, los intentos de individualizar genes responsables de estas enfermedades han sido frustrantes y contradictorios,<sup>18</sup> 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<sup>19</sup> 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 en la diabetes o en 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,  $\beta$ -amiloides.<sup>20</sup>

### 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  $\beta$ -amiloides. 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  $\beta$ -amiloides 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  $\beta$ -amiloides. 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 enrollados 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  $\tau$  ("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



**Cuadro 10-2.** 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 $\beta$ -amiloides)	< 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%

$\tau$  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  $\tau$  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.<sup>20</sup> La desorganización microtubular, con liberación de la proteína  $\tau$ , 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  $\beta$ -amiloides 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  $\beta$ -amiloides, de modo que esta última no puede acumularse. Sin embargo, si la PPA entra en los lisosomas, es cortada de tal manera que libera  $\beta$ -amiloides, de modo que los cambios en la secuencia de la PPA o en su transporte normal pueden ocasionar un aumento de formación de  $\beta$ -amiloides, 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 10-2).<sup>21</sup>

El primero de los genes relacionados con la enfermedad fue el de la proteína precursora de la  $\beta$ -amiloides (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. 14). 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  $\beta$ -amiloides; 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 los pacientes de las formas familiares (mendelianas) (véase panel 10-2). 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 intramembranas). Estas proteínas de membrana tienen 8 segmentos intramembranosos, un dominio  $\text{NH}_2$  y uno  $\text{COOH}$  citoplasmático, con lazos fuera y dentro de la célula, y alrededor de 450 aminoácidos en total (fig. 10-8).<sup>24</sup>

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  $\beta$ -amiloides, se supone que estas mutaciones actúan por medio de tal mecanismo, posiblemente alterando el transporte de la proteína precursora (PPA).

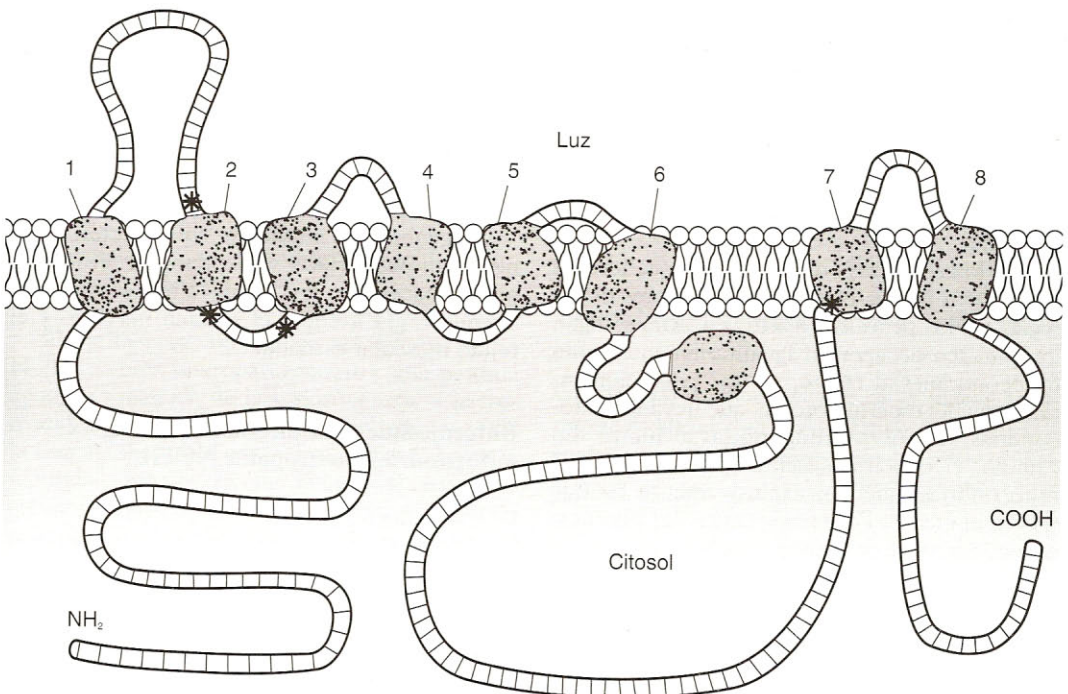
### Forma esporádica de la enfermedad de Alzheimer

Si bien los avances en el conocimiento de las formas familiares de esta enfermedad han si-



**Panel 10-2. Papel de las presenilinas en las formas mendelianas de la enfermedad de Alzheimer.**

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 8 dominios intramembranosos y los extremos amino y carboxilo están del lado citoplasmático (citósol), 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 que es a través de esta función que se relacionan con la enfermedad de Alzheimer. 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 intramembranasas o cerca de ellas. Por otro lado, la reducción experimental de la expresión de PS1 lleva a un incremento en la producción de  $\beta$ -amiloide, en particular la forma de 42 aa., que es la más propiamente 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 tal manera que esta proteína cuando está plegada de manera incorrecta, en vez de ser destruida en la forma habitual, es cortada erróneamente, liberando  $\beta$ -amiloide de 42 aa., y este polipéptido se deposita e inicia la formación de placas.<sup>22,23</sup>



**Fig. 10-8.** Esquema de la proteína PS1 en la membrana celular. Asteriscos: localización de mutaciones encontradas en pacientes con enfermedad de Alzheimer.



do 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.<sup>20</sup> El alelo E4 se encuentra aumentado en un 150% entre los pacientes de Alzheimer, comparado con la población no afectada.<sup>20</sup> 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  $\tau$  en las neuronas y predispone a una falla en los microtúbulos que desencadenaría la enfermedad.

### 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 or-

ganismo 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.

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 trece polipéptidos (fig. 10-9). Estos polipéptidos forman una parte de las proteínas de la cadena respiratoria (cuadro 10-3), 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 NOHL

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).

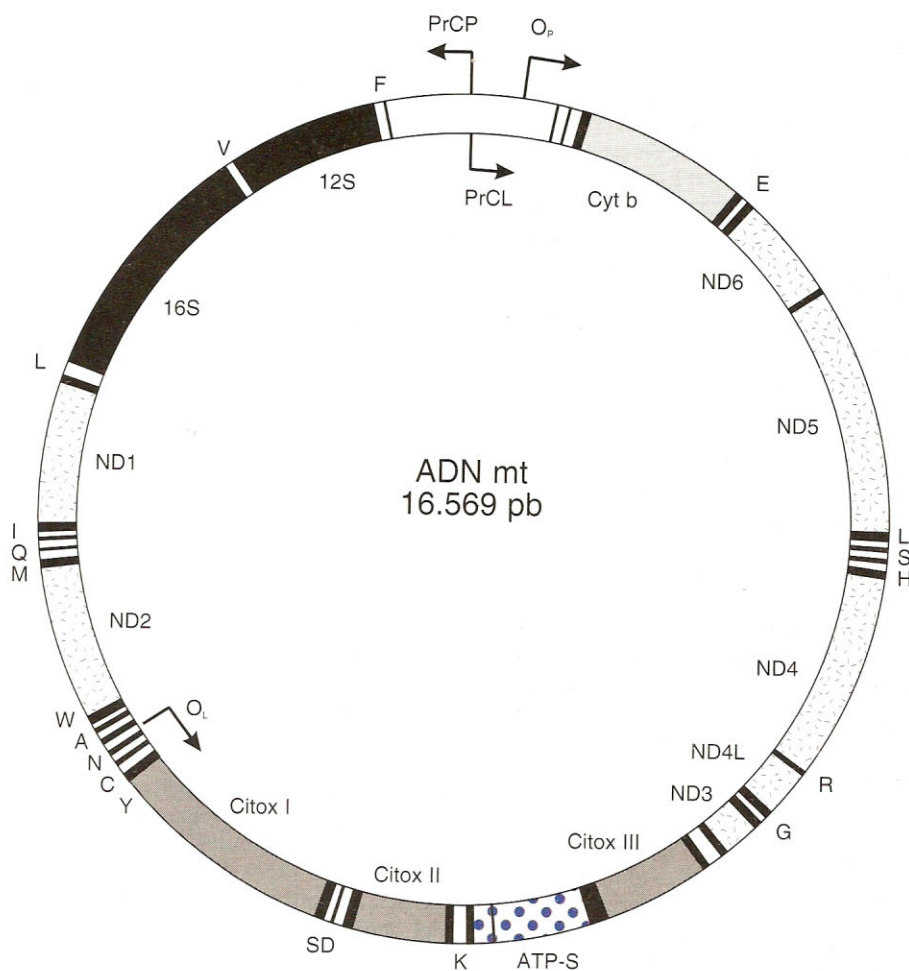


Fig. 10-9. ADN mitocondrial humano con algunos de sus genes.

4. Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y apoplejía.

De ellas, la mejor caracterizada es la NOHL.<sup>25</sup> 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 nu-

cleótidos 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).

### Cuadro 10-3. Componentes de la cadena respiratoria codificados en el ADN mitocondrial

Polipéptido	Pertenencia a complejo
Subunidad 1	I, NADH deshidrogenasa
Subunidad 2	
Subunidad 3	
Subunidad 4L	
Subunidad 4	
Subunidad 5	
Subunidad 6	
1 subunidad	III, complejo b-c <sub>1</sub>
3 subunidades	IV, citocromo c-oxidasa
2 subunidades	V, ATP sintetasa



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.

## 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, determina 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 similitud 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.

Para la forma insulino dependiente de la diabetes mellitus hay dos genes mayores involucra-

dos y algunos genes menores; los mayores son: a) parte del complejo mayor de histocompatibilidad (gen IDDM1 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. En la diabetes no insulino dependiente (forma MODY), el gen de la glucoquinasa alterado es importante; 20 mutaciones de este gen, en especial en el exón 7, se asocian con esta enfermedad. La acción se produce mediante una disminución de la actividad de la enzima, que perturba el control del nivel normal de glucosa en la sangre. Las mutaciones predisponen a la diabetes, que se desencadena al actuar también factores ambientales (exceso de ingesta de hidratos de carbono).

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 basales 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 maniaco-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 mayo-



cantidad de  $\beta$ -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.

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

- Holt SB. Quantitative genetics of finger-print patterns. *Brit Med Bull* 1961; 17:247-250.
- Fraser FC. Evolution of a palatable multifactorial threshold model. *Am J Hum Genet*, 1980; 32:796.
- Farrell M, Holder S. Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. *Am J Hum Genet* 1992; 50:270-277.
- Bennett ST, Lucassen AM, Gough SCL, et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nature Genet*, 1995; 9:284-292.
- Kennedy GC, German MS, Rutter WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nature Genet* 1995; 9:293-298.
- Sheely MJ. HLA and insulin dependent diabetes. *Diabetes* 1992; 41:123-129.
- Stoffel M, Froguel PH, Takeda J, et al. Human glucokinase gene: Isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7698-7702.
- Bell JI. Polygenic disease. *Curr Opin Genetics & Development* 1993; 3:466-469.
- Thibonnier M, Schork NJ. The genetics of hypertension. *Curr Opin Genet & Develop* 1995; 5:362-370.
- Hansson JH, Williams CN, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel  $\gamma$  subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nature Genet* 1995; 11:76-82.
- Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996; 272:676-680.
- Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the  $\beta$  subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994; 79:407-414.
- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charu A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel J-M, Corvol P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71:169-180.
- Gaillard I, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA* 1989; 8:87-99.
- Kim H-S, Kregge JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgins JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda M, Smithies O. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92:2735-2739.
- Smithies O, Maeda N. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: Atherosclerosis and essential hypertension. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92:5266-5272.
- Elwood JH, Elwood JM. Epidemiology of anencephalus and spina bifida. Oxford, Oxford University Press, 1980.
- McInnes A, Freimer NB. Mapping genes for psychiatric disorders and behavioral traits. *Current Opin Genet & Develop* 1995; 5:376-381.
- Wordsworth P. Genes and arthritis. *Brit Med Bull* 1995; 51:249-266.
- Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92:4725-4727.
- Barinaga M. New Alzheimer's gene found. *Science* 1995; 268:1845-1846.
- Hardy J. The Alzheimer family of diseases: Many etiologies, one pathogenesis? *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94:2095-2097.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: Genotypes, phenotype, and treatments. *Science* 1997; 275:630-631.
- 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.
- Howell H. Mitochondrial gene mutations and human disease: a prolegomenon. *Amer J Hum Genet* 1994; 55:219-224.



## **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. Síndrome adrenogenital.*

### **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.

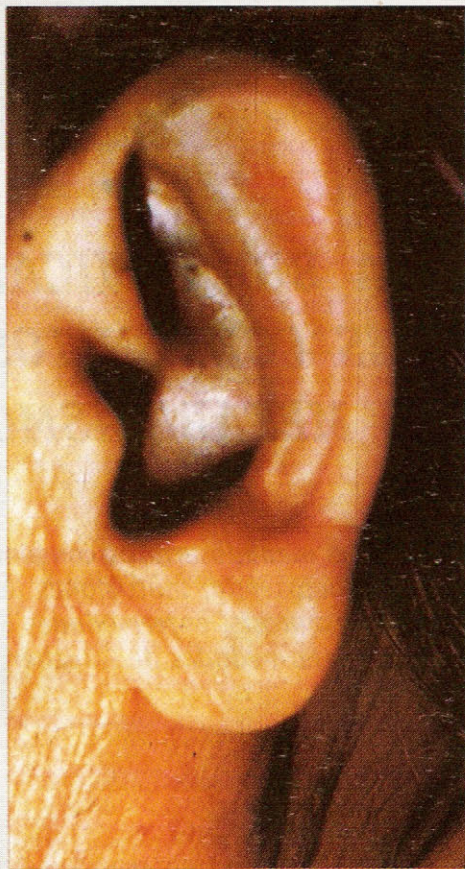
Es posible entonces considerar que cada paso en todo camino metabólico posee al menos una regulación génica, y a menudo más de un producto génico está involucrado en cada paso. La vinculación entre caminos metabólicos y genes fue propuesta por el médico inglés Archibald Garrod a principios del siglo 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 experi-

mentalmente la relación entre genes y proteínas, pero los detalles de estas relaciones sólo se están dilucidando actualmente mediante los métodos de la Genética Molecular (véase panel 11-1).

En principio, cada camino metabólico puede ser interrumpido, alterado o desviado en cualquiera de sus puntos a causa de mutaciones génicas (fig. 11-1). 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 cami-



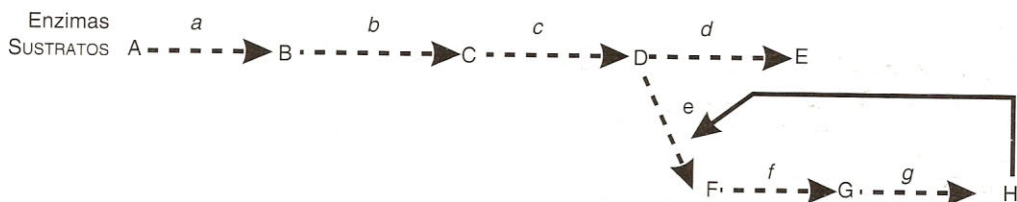


**Fig. 1.** Ocronosis (coloración azul negruzca) del cartilago auricular. Los alcaptonúricos desarrollan ocronosis con el paso del tiempo, al igual que artropatías por depósitos de derivados del ácido homogentísico. (Cortesía de los doctores Cordero AA, Cobreros MS, Allevato MA y Donatti L: *Manifestaciones Cutáneas de las Enfermedades Sistémicas*. Atlas color y texto, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1997, con autorización de la editorial.)

**Panel 11-1. La alcaptonuria: el descubrimiento de los errores congénitos del metabolismo (1902).**

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 ser el papel de la enzima y presentó la hipótesis de que debía 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 fluido, 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 (véase fig. 1), de la esclerótica y de otros tejidos conectivos, y también se producen artropatías causadas por el depósito pigmentado en los cartílagos articulares. Recientemente Fernández Cañón y col. han aislado el gen HGO, cuya mutación causa la alcaptonuria.<sup>1</sup> 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.<sup>1</sup>





**Fig. 11-1.** 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.

nos 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 será estudiado separadamente.

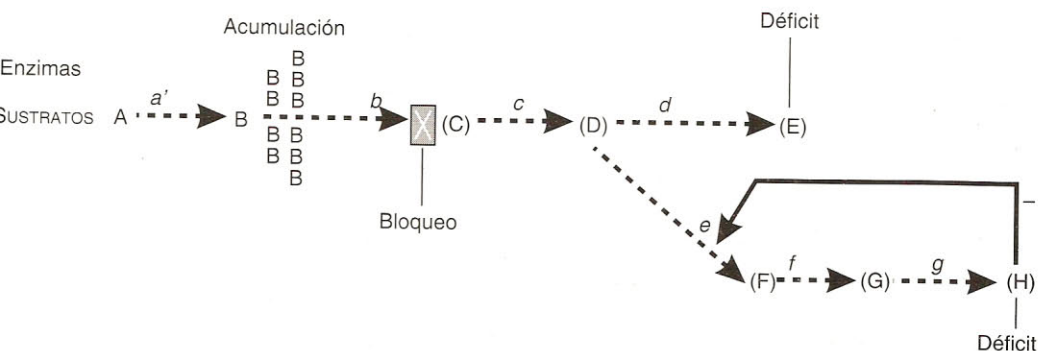
## Mecanismos patogénicos de los errores congénitos del metabolismo

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 trunca (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 transcrito, 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. 11-2).
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. 11-2).
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.



**Fig. 11-2.** 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.

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.

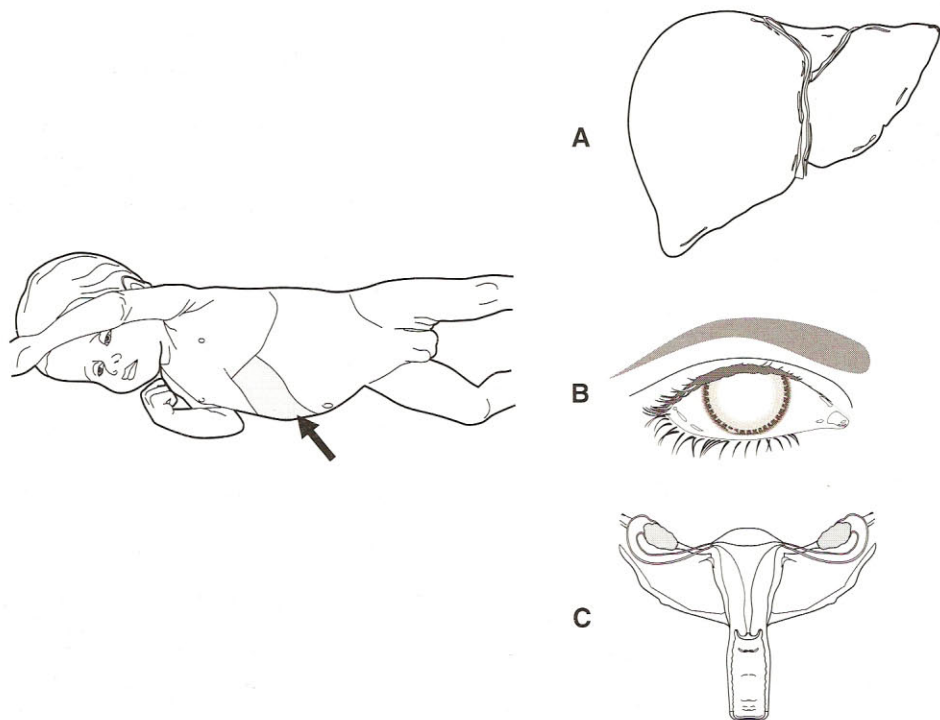
### Galactosemia: prototipo de enfermedad hereditaria con terapéutica exitosa

La galactosemia clásica (defecto de galactosa-uridil-transferasa = GALT) es una enfermedad hereditaria que sirve de prototipo en varios 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.

Al nacer, un bebé galactosémico no muestra signos de enfermedad, pero a las semanas, o aun a los pocos días de empezar su lactancia materna o la alimentación con leche de vaca,

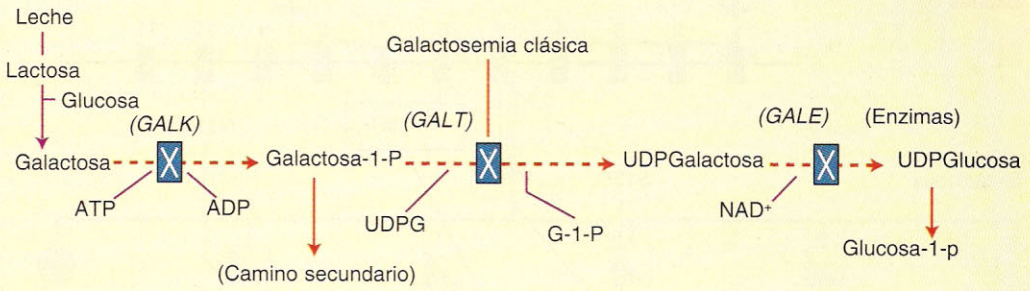
comienza a desmejorar, no aumenta de peso, vomita, demuestra malestar, comienza a mostrar ictericia (de 4 a 10 días después), hipotonía muscular y sopor; todo esto se complica con la susceptibilidad muy aumentada para infecciones por *E. coli*, que pueden llevar a un deceso rápido hasta al 50% de los bebés galactosémicos que, por falta de diagnóstico, no reciben dieta especial en las primeras dos semanas<sup>2</sup> (fig. 11-3).

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 bebés, 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 precoz. 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



**Fig. 11-3.** Signos de galactosemia clásica. Izquierda: bebé galactosémico con hepatomegalia (flecha) y desnutrición. Derecha: A. Cirrosis hepática. B. Cataratas. C. Displasia ovárica.





**Fig. 11-4.** Camino metabólico de la galactosa. Los tres tipos de bloqueo están señalados por **X**; el bloqueo del segundo paso corresponde a la galactosemia clásica.

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

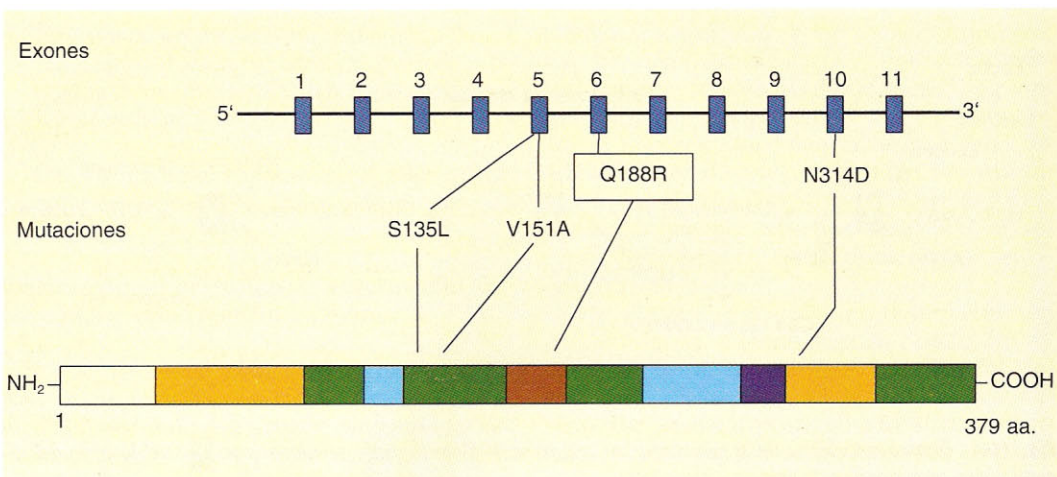
Dos mecanismos diferentes constituyen el origen de la mayoría de las manifestaciones de esta enfermedad: 1) por un lado, el bloqueo del camino metabólico de la galactosa (véase más adelante) produce una acumulación del metabolito previo, *galactosa-1-fosfato*, y esta sustancia, en concentraciones altas, 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 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.<sup>3</sup>

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 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; GALK) y el ATP, produciendo galactosa-1-fosfato (fig. 11-4). 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



**Fig. 11-5.** Localización de mutaciones en el gen *GALT* y la proteína respectiva, uridiltransferasa (proteína *GALT*). Los exones e intrones están representados con longitudes arbitrarias. La mutación más frecuente está señalada con un recuadro.

(GAL-E; GALE) y  $\text{NAD}^+$ ; 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;<sup>4</sup> el marco abierto de lectura es de 1.140 pb, que codifican una proteína de 43 kDa compuesta por 379 aminoácidos (fig. 11-5), 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).<sup>5</sup> Se conocen al menos 32 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 arginina original, en una glutamina en el mutante. Esta mutación,

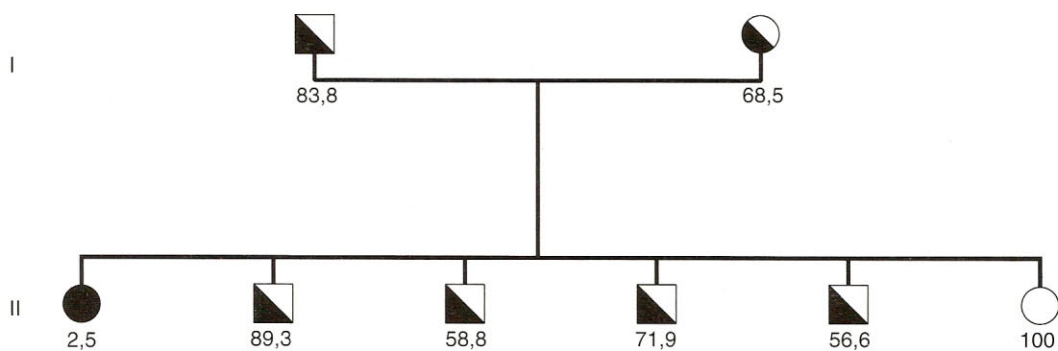
que ocurre en el codón 188, dentro del exón 6, es una transición adenina a guanina, la cual tiene una prevalencia del 70% entre enfermos de raza caucásica.<sup>6</sup>

Otra mutación frecuente es la N314D, que da lugar a la variante “Duarte”; también es una transición  $\text{A} \rightarrow \text{G}$  que determina el cambio de asparagina en vez de 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 es funcional como un dímero, se predice la constitución de proteínas “mixtas”, o heterodímeros, en un heterocigoto, con un nivel de actividad de la enzima intermedio al de controles y al de los homocigotos para la mutación. Además, la constitución de heterocigotos para dos mutaciones diferentes permite prever disminuciones severas de la actividad enzimática aun no siendo homocigotos 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 heterocigotos fue demostrada desde hace varias décadas, en especial por los dosajes de la actividad enzimática en los miembros de la familia (fig. 11-6).





**Fig. 11-6.** Genealogía de una familia con un paciente galactosémico. Las cifras corresponden a valores de actividad de GALT relativos a controles normales (100%).<sup>3</sup>

El relevamiento de heterocigotos 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 heterocigotos, generalmente éstos manifiestan una disminución significativa de la actividad de GALT. Los enfermos presentan casi nula esta actividad (fig. 11-6). En la actualidad se detectan los “heterocigotos 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 precoz, 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, la displasia ovárica y los trastornos de aprendizaje son refractarios al tratamiento dietético.

### Fenilcetonuria: bloqueo en el camino de la fenilalanina

La fenilcetonuria (idiotia 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.

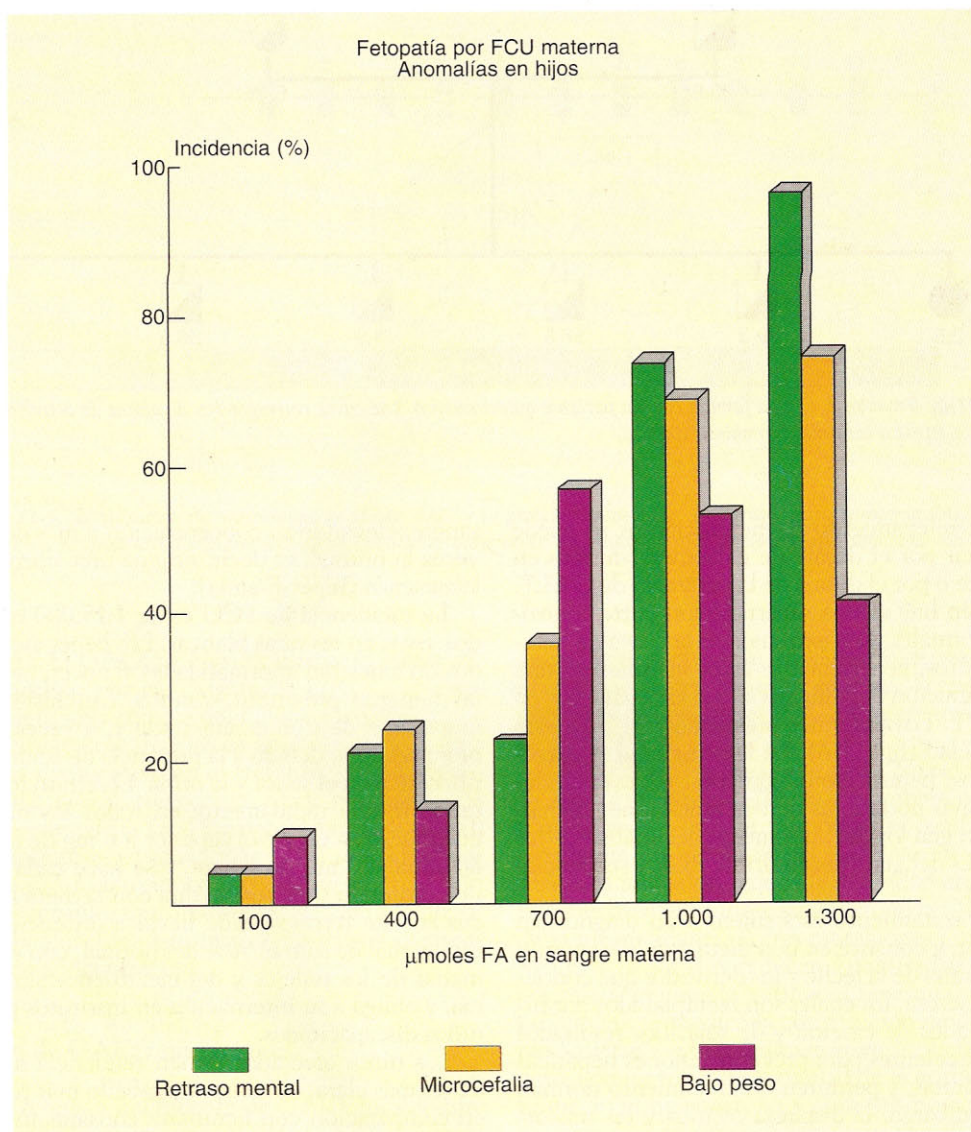
La fenilcetonuria (FCU) es un bloqueo del metabolismo de la *fenilalanina*, uno de los aminoácidos esenciales en la dieta; y este bloqueo provoca una acumulación del aminoácido en la

sangre, elevando su concentración a más de 10 veces la normal, es decir, origina una *hiperfenilalaninemia* (hiper-F-emia).

La incidencia de FCU es de 1:15.000 nacidos vivos en las razas blancas. Los bebés 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.

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<sup>7</sup> 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 los niveles de



**Fig. 11-7.** Consecuencias en el feto por la elevación del nivel de fenilalanina en el plasma materno de pacientes con fenilcetonuria.<sup>7</sup>

fenilalanina materna durante el embarazo (fig. 11-7).

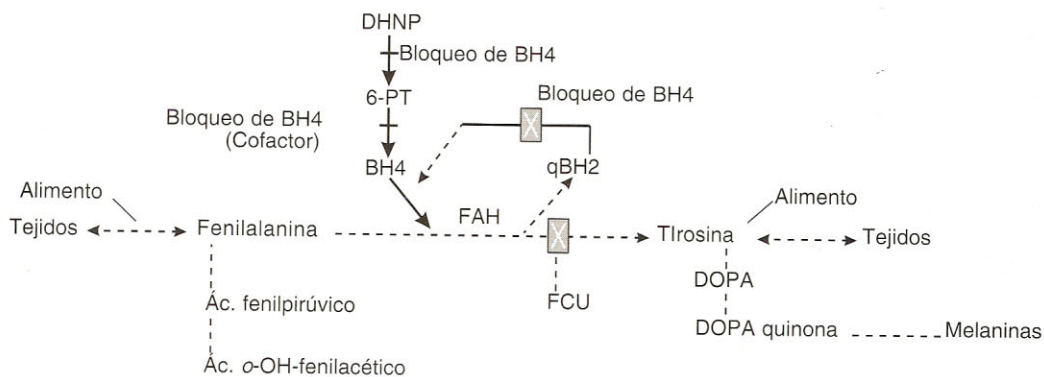
### Camino metabólico y bloqueos

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 catbolitos que aparecen en la orina de los enfermos y no en la de los que tienen una vía catabólica normal (aparecen el ácido fenilpirúvico y el orto-hidroxi-fenilacético) (fig. 11-8).

Además de la FCU clásica por mutación de la FAH, con mucho menor frecuencia (1 en  $10^6$ ) existen bloqueos por ausencia del cofactor *tetra-*





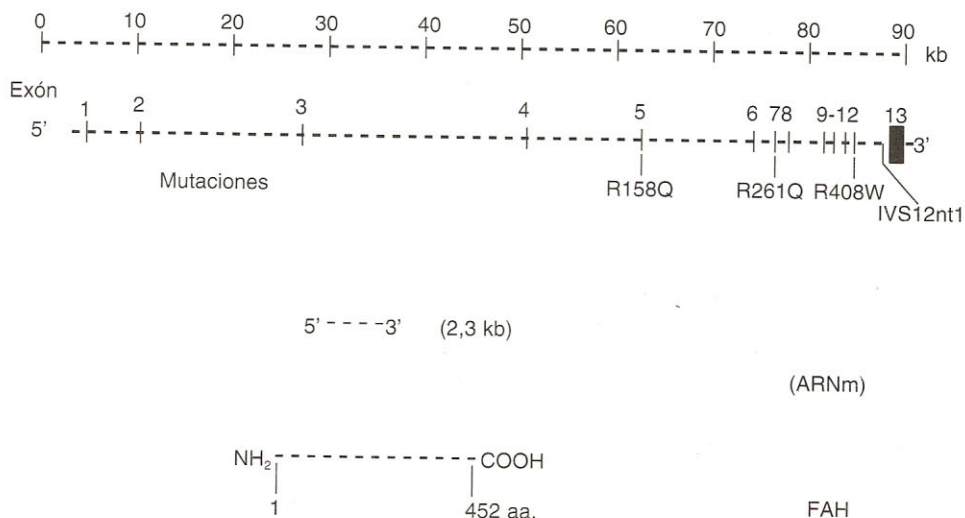
**Fig. 11-8.** Camino metabólico de la fenilalanina. La conversión de fenilalanina en tirosina requiere la acción de la enzima fenilalanina-hidroxilasa (FAH) y además el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4). A su vez, este cofactor BH4 puede verse bloqueada su síntesis en tres puntos (señalados). El bloqueo, 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.

hidrobiopterina (BH4), que también dan hiper-F emia pero cuya repercusión neurológica es aun más grave, ya que la BH4 es necesaria también para la hidroxilación de la tirosina y el triptófano en el cerebro.<sup>8</sup>

### 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 cro-

mosoma 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).<sup>9</sup> 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. 11-9).



**Fig. 11-9.** Gen de la FAH, su ARNm y localización de 4 mutaciones usuales. Los exones, muy pequeños (salvo el #13), están representados por líneas verticales.

Han sido informadas más de 250 mutaciones del gen FAH, 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.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 3/4 de los enfermos de FCU son heterocigotos *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 el PLFR, de modo que estas mutaciones han podido ser rastreadas a su posible origen (hace cientos o miles de años) en grupos étnicos europeos.

### Patogenia y tratamiento de la fenilcetonuria

A pesar de un detallado conocimiento de su patogenia, 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 cuestionable relación entre tasas altas de fenilalanina en el plasma sanguíneo y retraso mental (fig. 11-7), 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, precoz 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 0.5 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 feto-patía 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 precoz se basa en la imposibilidad del relevamiento general de recién naci-

dos, para un pequeño grupo de errores metabólicos, que incluyen FCU y galactosemia. La detección se realiza mediante la recolección de gotas de sangre sobre papel de filtro, que luego son analizadas por un método microbiológico simple,<sup>10</sup> el cual puede ser complementado con análisis de ADN.

### 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  $\alpha$  de la hexosaminidasa A), la enfermedad de Sandhoff (déficit de la subunidad  $\beta$  de las hexosaminidasas B y A); la enfermedad de Gaucher (déficit de glucocerebrosidasa) y muchas otras (cuadro 11-1).

### Enfermedad de Tay-Sachs: gangliosidosis de tipo G(M2) (idiocia amaurotica)

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 circunscriptas, 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 heterocigotos sea efectivo, 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 diagnós-



**Cuadro 11-1. Enfermedades hereditarias por déficit de enzimas lisosómicas**

Enfermedad	Enzima deficiente	Sustancia acumulada
E. de Tay-Sachs	Hexosaminidasa A ( $\alpha$ )	Gangliósido G(M2)
E. de Sandhoff	Hexosaminidasa B, A ( $\beta$ )	Gangliósido G(M2)
Gangliosidosis generalizada	$\beta$ -Galactosidasa-1	Gangliósido G(M1)
E. de Gaucher	Glucocerebrosidasa	Glucocerebrósido
E. de Fabry	$\alpha$ -Galactosidasa A	Trihexósido de ceramida
E. de Niemann-Pick	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Fucosidosis	$\alpha$ -1-Fucosidasa	Glucolípidos
Síndrome de Hurler	$\alpha$ -1-Iduronidasa	Mucopolisacárido
Síndrome de Hunter	Iduronato-2-sulfatasa	Mucopolisacárido
Síndrome de Sly	$\beta$ -Glucuronidasa	Glucosaminoglucanos
Enf. de Pompe	$\alpha$ -Glucosidasa	Glucógeno

ático 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. 11-10), 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.

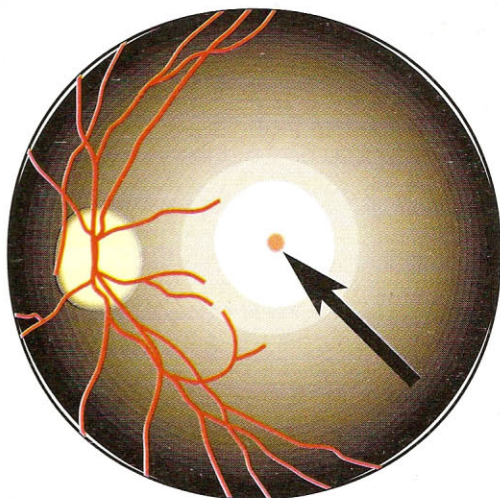
### Patogenia de la enfermedad de Tay-Sachs: deficiencia de hexosaminidasa A (subunidad $\alpha$ )

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 circunscripta a un grupo racial, es producida por el déficit de las dos hexosaminidasas, A y B (por carencia de la subunidad  $\beta$ ). En ambas enfermedades la patogenia es igual; el gangliósido 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 glia.

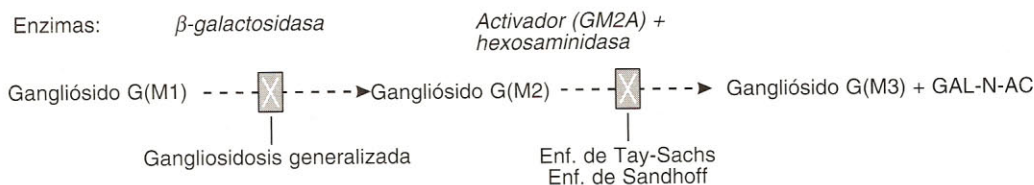
El bloqueo metabólico se produce en el segundo paso del catabolismo de los gangliósidos (fig. 11-11) (véase panel 11-2).

### Gen de la hexosaminidasas A (HEXA) y su mutación más frecuente

Las dos enzimas, hexosaminidasas A y B, difieren en una subunidad: mientras la hexosaminidasa A está formada por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , la hexosaminidasa B está formada por dos subunidades  $\beta$ . En la enfermedad de Tay-Sachs está alterada la subunidad  $\alpha$  y, por consiguiente,



**Fig. 11-10. 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. 11-11.** Bloqueo metabólico en las enfermedades de Tay-Sachs y de Sandhoff. GM2A: proteína activadora; GAL-N-AC: N-acetil galactosamina.

te, la enzima A. La subunidad  $\alpha$  está codificada por el gen HEXA, localizado en el brazo largo del cromosoma 15 (15q23), mientras que la subunidad  $\beta$  está codificada por el gen HEXB en el cromosoma 5 (5q13).<sup>12</sup>

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. 11-12).<sup>12</sup> Una mutación, consistente en una inserción de 4 pb, constituye el 80% de los alelos mutados en los heterocigotos judíos asquenazíes.<sup>13</sup> Esta inserción, por cambio del marco de lectura, determina la producción de un codón de terminación a 9 bases de la inserción, en el exón 11, que vuelve inestable al ARN transcrito, el cual se degrada poco después del proceso de corte y empalme,<sup>13</sup> y finalmente provoca la ausencia práctica de la subunidad  $\alpha$ , por lo cual no puede constituirse la hexosaminidasa A ( $\alpha$ - $\beta$ ).

## 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 heterocigotos. Éstos tienen una sustancial reducción de la actividad HEXA en el suero, y pueden ser detectados con razonable seguridad.<sup>14</sup> Las medidas preventivas han llevado a una disminución muy grande del número de afectados.

**Panel 11-2. La enfermedad de Sandhoff en la Argentina.** La enfermedad de Sandhoff es una tesaurosis grave íntimamente vinculada a la enfermedad de Tay-Sachs: ambas son tesaurosis del gangliósido G(M2), y en ambas la actividad enzimática de la hexosaminidasa A está disminuida o ausente; pero es en la enfermedad de Sandhoff que la subunidad  $\beta$  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 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.<sup>11</sup> La mutación más frecuente es IVS-2 +1 G $\rightarrow$ 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.<sup>11</sup>



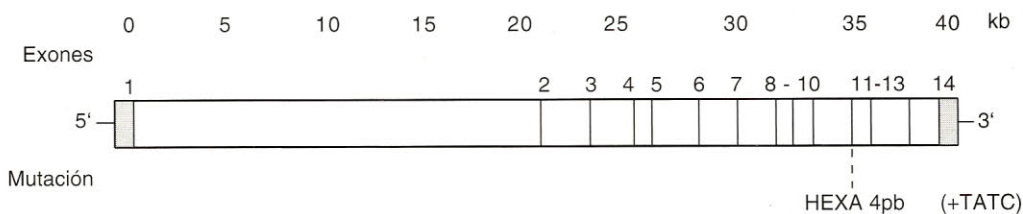


Fig. 11-12. Gen HEXA y localización de la mutación más frecuente en el exón 11.

## 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 ( $\beta$ -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 desarrolla 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 recién 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  $\beta$ -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 pseudogén con gran homología, originado en una duplicación del gen, y que no es funcional por carecer de un marco de lectura abier-

to de suficiente longitud.<sup>15</sup> Mediante el análisis del ADN se han descrito 24 mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, y 6 mutaciones por entrecruzamiento entre el gen y el pseudogén.<sup>15</sup> Las mutaciones se distribuyen en forma muy diferente entre las poblaciones judías y las no judías (fig. 11-13).

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 heterocigotos; a ello se suma la dificultad para separar con certeza los heterocigotos 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.

Por otra parte, el tratamiento de esta enfermedad suscita, en la actualidad, un problema económico. La terapéutica más efectiva es la

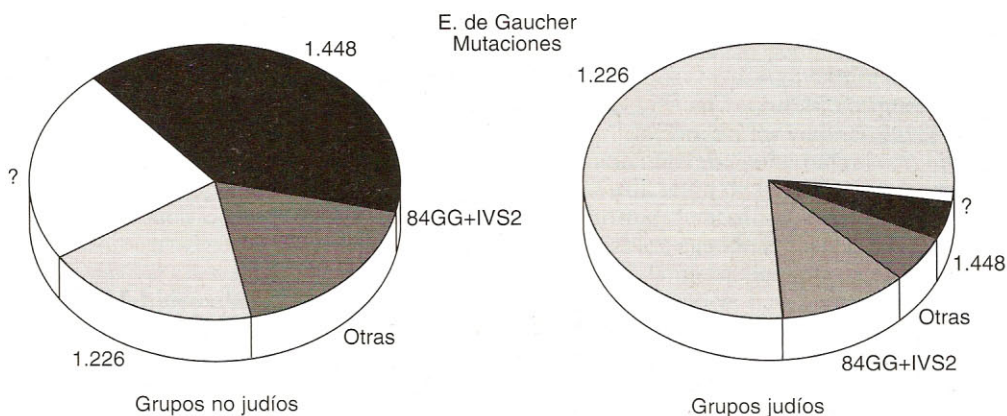


Fig. 11-13. Distribución de las principales mutaciones en la enfermedad de Gaucher, en poblaciones judías y no judías.<sup>15</sup> Las mutaciones más comunes son la 1.226 y la 1.448.

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.

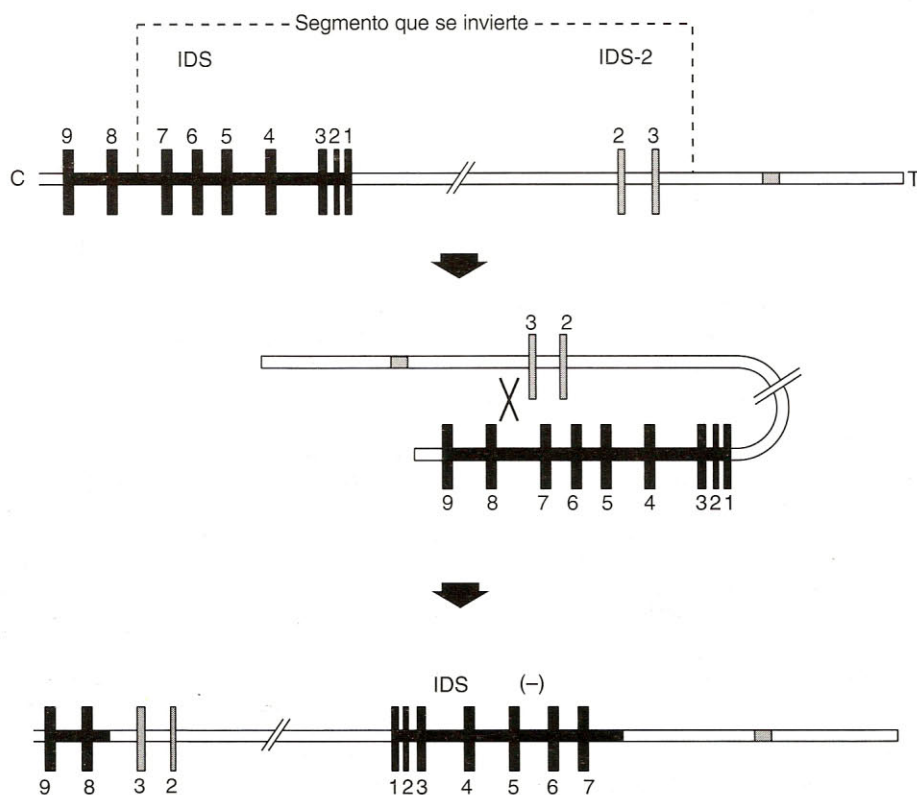
### Síndrome de Hunter: tesaurosia por mutación puntual o recombinación ilegítima

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.<sup>16</sup> 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.<sup>16</sup> El gen propiamente dicho contiene 9 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<sup>16</sup> (fig. 11-14).

El origen de este síndrome es, por consiguiente, doble: por un lado, hay mutaciones



**Fig. 11-14.** 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).



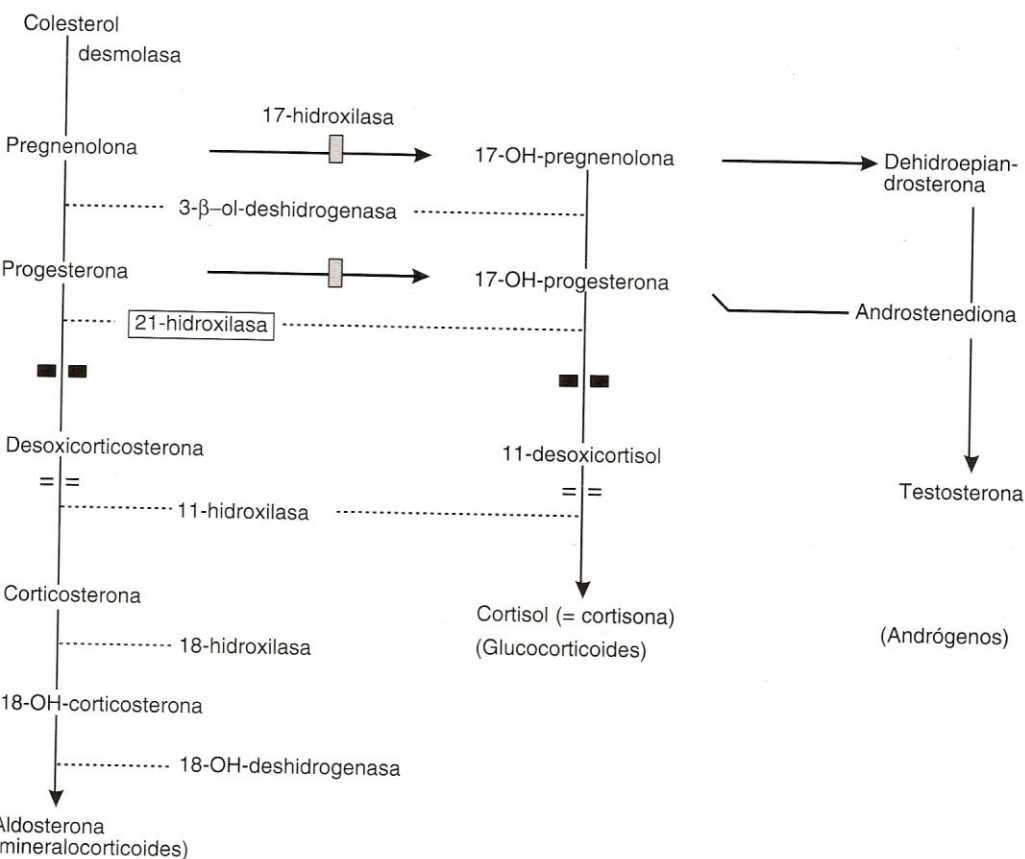


Fig. 11-15. Camino metabólico de las hormonas esteroideas y tres de sus bloques principales (■, ■ y ■).

mutuales que provocan la ausencia de la enzima activa; por otro, la recombinación homólogo-pero ilegítima entre el gen IDS y el locus S-2 produce la fragmentación del gen y la pérdida de la enzima. Hay indicios de que esta combinación ilegítima e intracromosómica ocurre sólo en la meiosis masculina. Esto es de esperar, dado que en la meiosis espermatocítica, el extremo del brazo largo del X está libre de apareamiento (excepto la diminuta segunda región pseudoautosómica, véase cap. respectivo) y es factible un autoapareamiento como el postulado para producir este reordenamiento.

### Déficit de 21-hidroxilasa pseudohermadroitismo femenino

El camino metabólico de las hormonas esteroideas es un ejemplo de los bloqueos genéticos en cada paso (fig. 11-15). De todos los bloqueos genéticos, el de mayor importancia por su frecuencia es el déficit de la 21-hidroxilasa, deter-

minante de la principal forma de hiperplasia adrenal congénita, con la consiguiente virilización en las niñas.

Esta hiperplasia adrenal 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 (pseudohermadroitismo 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 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 hipernatremia e hipercloremia. En la san-

Cuadro 11-2. 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)	$\alpha$ -1-4-Glucosidasa lisosómica	No efectivo
Glucogenosis III (dextrinosis)	Amilo-1-6-glucosidasa	Dietético
Glucogenosis IV	Enzima ramificante	No efectivo
Glucogenosis V (enf. de McArdle)	Fosforilasa del músculo	No efectivo
Glucogenosis VI (enf. de Hers)	Fosforilasa hepática	No efectivo
Tirosinemia	Fumaril-acetoacetato hidroxilasa	No efectivo
Alcaptonuria	Oxidasa del ácido homogentísico	Innecesario
Albinismo (tipo tirosinasa neg.)	Tirosinasa	No posee
Leucinosis	Descarboxilasa	Dietético (pobre)
Homocistinuria	Cistationina- $\beta$ -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
Sínd. de Maroteaux-Lamy	Aril-sulfatasa B	No posee

gre 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 adrenocorticotrópica (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.

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 histocompatibilidad" = 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.<sup>17,18</sup> 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 pseudogén. La importancia de este pseudogén es que da lugar a una parte significativa de los errores génicos causantes del déficit de la 21-hidroxilasa. Estos errores son: deleciones del gen funcional (CYP21B), productos de recombinación desigual, conversiones génicas, por copia a partir del pseudogén, 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 (ver panel 11-1). 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 11-2).



## 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 anomalía 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 precozmente). 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 heterocigotos 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 32 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 efectivo, 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 250 mutaciones, de las cuales 4 son más comunes en la raza blanca. Cada muta-

ción 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 tesaurosos ocurren generalmente por bloqueos de enzimas lisosómicas. La *enfermedad de Tay-Sachs* es una tesaurosos 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  $\alpha$  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 heterocigotos, con medidas preventivas eficientes. En la *enfermedad de Gaucher*, tesaurosos de glucocerebrósido por déficit de glucocerebrósidas, no ha sido posible el relevamiento por la heterogeneidad de formas clínicas y por la inseguridad de detección de los heterocigotos. 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 tesaurosos de mucopolisacáridos por déficit de la enzima iduronato-2-sulfatasa. El gen IDS se localiza en Xq28, tiene 9 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 delecciones y cambios de secuencias responsables de una parte significativa del síndrome de Hunter. El déficit de la 21-hidroxilasa esteroidea es la causa principal de los *síndromes adrenogenitales*, en los cuales 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 delecciones y cambios responsables de este déficit.

## REFERENCIAS

1. Fernández Cañón JM, Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, Renedo M, Fernández-Ruiz E, Peñalva MA, Rodríguez de Córdoba S. The molecular basis of alkaptonuria. *Nature Genet* 1996; 14:19-24.

2. Levy HL, Sepe SJ, Shi VE, et al. Sepsis due to *Escherichia coli* in neonates with galactosemia. *N Engl J Med* 1977; 297:823.
3. Holzel A. Galactosemia. *Brit Med Bull* 1961; 17:213-216.
4. 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.
5. 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.
6. Elsas LJ, Langley S, Steele E, Evinger J, Fridovich-Keil JL, Brown A, Singh R, Fernhoff P, Hjelm LM, Dembure PP. Galactosemia: a strategy to identify new biochemical phenotypes and molecular genotypes. *Amer J Hum Genet* 1995; 56:630-639.
7. Levy HL. Newborn screening and dietary treatments: lessons and update. En: Kaback MM, Shapiro LJ (eds.) *Frontiers in Genetic Medicine*. Columbus, Ohio: Ross Laboratories 1987.
8. Scriver CR, Eisensmith RC, Woo SLC, Kaufman S. The hyperphenylalaninemias of man and mouse. *Ann Rev Genet* 1994; 28:141-165.
9. 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.
10. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32:338.
11. 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.
12. Proia RL, Soravia E. Organization of the gene encoding the human  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$ -chain. *J Biol Chem* 1987; 262:5677-5681.
13. 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; 56:716-721.
14. Lowden JA. Carrier detection in the control of genetic disease. En: Kaback MM, Shapiro LJ (eds.) *Frontiers in Genetic Medicine*. Columbus, Ohio: Ross Laboratories, 1987.
15. Beutler E. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science* 1992; 256:794-799.
16. Bondeson M-L, Dahl N, Malmgren H, Kleijer WJ, Tønnesen T, Carlberg B-M, Pettersson U. Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of Hunter syndrome. *Human Mol Genet* 1995; 4:615-621.
17. Strachan T. Molecular pathology of 21-hydroxylase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1994; 17:430-441.
18. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5111-5115.

#### BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

- Scriver CR, Sly W, Beaudet A, Valle D (eds.). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 7ª ed. New York: McGraw-Hill, 1994.



## ANOMALÍAS GENÉTICAS DE 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. 11), numerosas proteínas que tienen básicamente una función estructural, tales como el colágeno, pueden ser afectadas por mutaciones de sus genes codificantes. En el caso de los errores metabólicos, las mutaciones son 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 epidermolísis ampollar); b) de proteínas estructurales extracelulares, como el colágeno, cuyas muta-

ciones 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 no son imprescindibles, ya que hay células que no los muestran (como los oligodendrocitos y algunas líneas celulares).<sup>1</sup> Al ser estructuras especializadas y prescindibles (salvo las láminas) en las células básicas, son el origen

Cuadro 12-1. Tipos de filamentos intermedios y sus proteínas

Tipo	Filamento	Localización	Proteína	Nº de proteínas
I	Queratinas ácidas	Epitelios	Q9-Q20, y queratinas tricócíticas de las uñas y los pelos Hal-4	16
II	Queratinas neutras	Epitelios	Q1-Q8, Hb1-b4 y bx	13
III	Vimentinas	Mesénquima, músculo, etc.	Vimentina, desmina, periferina, proteína fibrilar glial	4
IV	Neurofilamentos	Neuronas	NFL, M, H, nestina, $\alpha$ -internexina	5
V	Láminas (lamino-proteínas)	Células (todas)	Láminas A, C, B1, B2	4

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 es probable que se detecten más en el futuro próximo.

Los filamentos intermedios pueden ser de cinco tipos (cuadro 12-1).<sup>2</sup>

### Organización de las queratinas

Entre las proteínas de los filamentos intermedios predominan las queratinas por su número (cerca de 30), pero prácticamente todas tienen la misma organización.

Las 50 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. 12-1).<sup>2</sup>

El dominio central en estas proteínas es constante, y sus cuatro segmentos largos de  $\alpha$ -hélice son típicos, así como las regiones peptídicas limitantes del dominio central, los "motivos" inicial y terminal de la hélice (fig. 12-1), 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 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

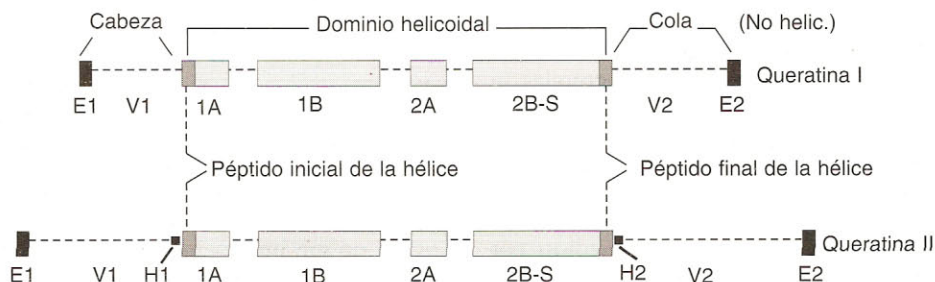
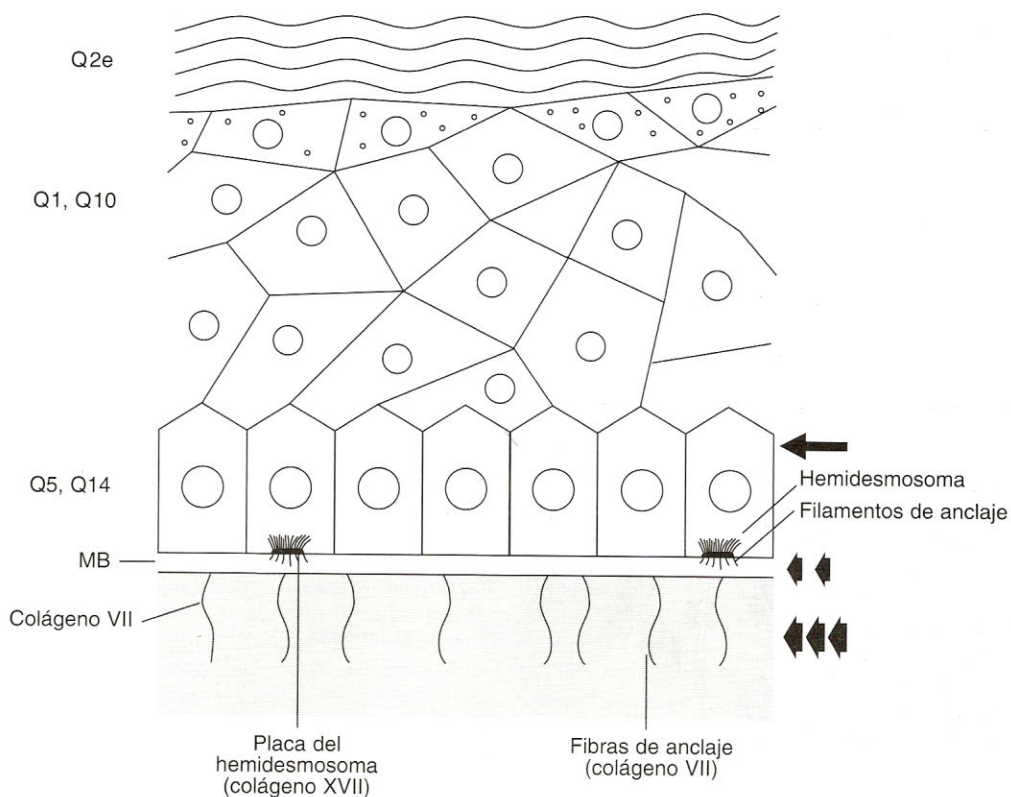


Fig. 12-1. Esquema general de las queratinas de tipos I y II, con sus dominios de cabeza y cola no helicoidales y el dominio central en forma de hélice.





**Fig. 12-2.** Esquema de la distribución de las queratinas (Q) en la epidermis **general**. La flecha única señala las células basales, las flechas indican la membrana basal y las flechas señalan la región de las fibras de anclaje en la dermis.

un total de 30 queratinas entre ambos tipos, la cantidad de heterodímeros de queratina (y por consiguiente, de filamentos) es muy grande. 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, para formar un filamento). Las queratinas se ordenan 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. 12-2).

### Función normal de las queratinas

La gran variedad de los filamentos de queratina les otorgan una amplia versatilidad pa-

ra 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 *tricócicas* (cuadro 12-1). 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

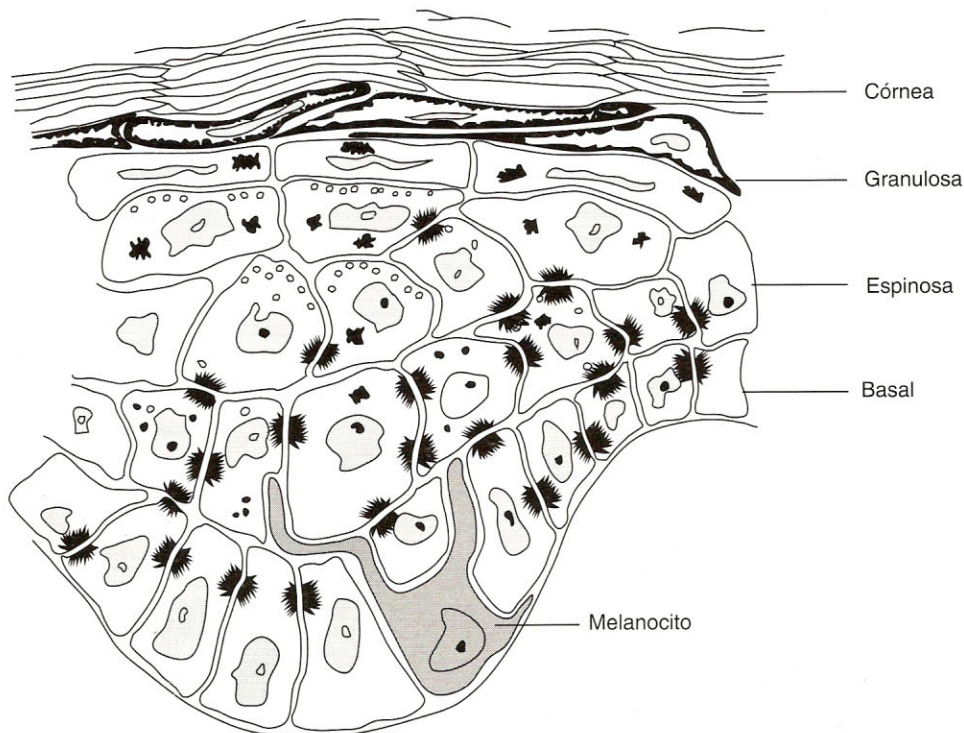


Fig. 12-3. Esquema de la epidermis con las diferenciaciones de sus capas.

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. 12-3) posee células de dos tipos: las células troncales, caracterizadas por expresar altos niveles de integrinas de la familia  $\beta 1^3$  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, 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 esteroideal relacionada con la descamación normal de las láminas córneas.

### Mutaciones de los genes de queratinas. Epidermólisis ampollar simple

Hay dos 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 (17q12);<sup>4</sup> la otra familia (II) contiene genes de queratina de tipo II y está localizada en el brazo largo del cromosoma 12. Se han detectado 17 mutaciones asociadas con la epidermólisis ampollar simple (véase más adelante) y 27 mutaciones asociadas con otras enfermedades de la piel.<sup>5</sup> Las cuatro enfermedades asociadas con las mutaciones de queratina (cuadro 12-2) 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.<sup>6</sup>

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.



**Cuadro 12-2.** Dermatitis 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
Queratoderma 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 $\alpha 6\beta 4$ y laminina V	—	Letal
Epidermólisis ampollar distrófica	Todo el cuerpo	(Colágeno VII)	—	Grave
Paquioniquia congénita	Uñas	Q16 y Q17	—	Benigno

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 (fig. 12-2).

### Anomalías genéticas del colágeno y de otras proteínas estructurales extracelulares

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 colágenos presentar una exquisita flexibilidad para constituir muy diversas matrices extracelulares en distintos tejidos y dentro del mismo tejido, en diversas regiones del organismo. Actualmente, están bien definidos 19 tipos de colágeno, designados con números romanos en el orden cronológico de su descubrimiento.<sup>7</sup>

Los colágenos están compuestos por tres cadenas polipeptídicas (cadenas  $\alpha$ ) que pueden ser idénticas o diferentes; cada cadena diferente se designa por un número arábigo y como las cadenas  $\alpha$  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:  $\alpha 1(I)$  y  $\alpha 2(I)$ . 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 12-3).<sup>8</sup>

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. 12-4). Esta fibrilla elemental de colágeno, tan regular, es el producto de la constitución de la triple hélice muy regular de las tres cadenas  $\alpha$ ; 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 carboxilo-terminal (para formar la triple hélice), esta región es particularmente sensible a los cambios mutacionales.<sup>8</sup>

### Genes de colágeno y sus proteínas

Los genes COL están dispersos por muchas regiones del genoma humano (cuadro 12-3), sin formar un cúmulo definido; sin embargo, poseen una organización con muchas similitudes, que son constantes en los exones correspondientes al dominio helicoidal central, don-

**Cuadro 12-3.** Tipos de colágeno y sus genes (con localización conocida o no) (primeros diez tipos)\*

Tipo	Fórmula	Cadenas $\alpha$	Gen	Localización cromosómica	Distribución tisular
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	$\alpha 1(I)$ $\alpha 2(I)$	COL1A1 COL1A2	17q21.3 7q22	T. conectivo, general
II	$[\alpha 1(II)]_3$	$\alpha 1(II)$	COL2A1	12q13	Cartílago, humor vítreo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	$\alpha 1(III)$	COL3A1	2q24	T. conectivo extensible: piel, vasos
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ (+ otras < >)	$\alpha 1(IV)$ $\alpha 2(IV)$	COL4A1 COL4A2	13q34 13q34	Membranas basales
V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$	$\alpha 1(V)$ $\alpha 2(V)$	COL5A1 COL5A2	9q34 2q24	Igual al tipo I, formas menores
VI	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	$\alpha 1(VI)$ $\alpha 2(VI)$ $\alpha 3(VI)$	COL6A1 COL6A2 COL6A3	21q22 21q22 2q37	T. conectivos (fibrillas de 110 nm, no escalonadas)
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	$\alpha 1(VII)$	COL7A1	3p21	Fibras de anclaje en membranas basales
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	$\alpha 1(VIII)$ $\alpha 2(VIII)$	COL8A1 COL8A2	3q12 1p32	Membrana de Descemet y endotelios
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	$\alpha 1(IX)$ $\alpha 2(IX)$ $\alpha 3(IX)$	COL9A1 COL9A2 COL9A3	6q12 1p32 -	Igual al tipo II, componente menor
X	$[\alpha 1(X)]_3$	$\alpha 1(X)$	COL10A1	6q21	Zona hipertrófica del cartílago metafisario

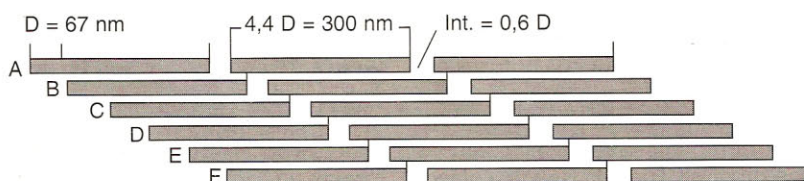
\* Los tipos XI-XVI son componentes minoritarios asociados con los colágenos I o II; el XVII está asociado con los hemidesmosomas.

de éstos son siempre pequeños, de un múltiplo de 9 pb, que puede ser: 54 pb (el más frecuente), 45, 99, 108 y 162 pb. Estos exones codifican respectivamente (en unidades peptídicas de triplete  $Gli-X-Y$ ) 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.<sup>8</sup>

El gen de la cadena pro- $\alpha 1(I)$  (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.12-5).

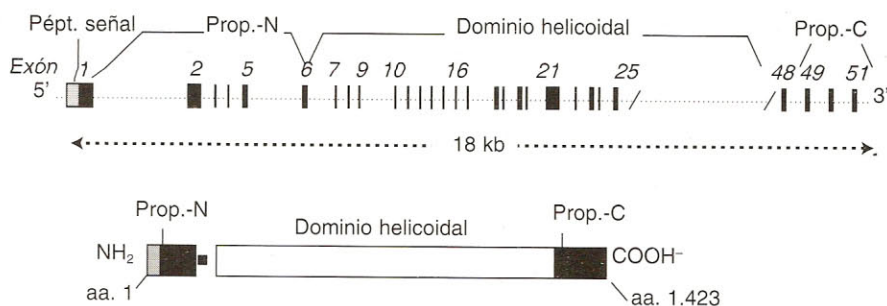
### Mutaciones de los genes COL: el "suicidio proteínico"

Más de 80 mutaciones se han encontrado solamente para el procolágeno I, asociadas con el grupo de enfermedades denominado "osteogénesis imperfecta" y, adicionalmente, con el síndrome de Ehler-Danlos, condrodisplasias y epidermolisis ampollar distrófica. 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  $\alpha$  comienzan a unirse por esa



**Fig. 12-4.** Esquema de la disposición de las moléculas de tropocolágeno (trímeros) en la fibrilla típica de periodicidad  $D = 67$  nm.





**Fig. 12-5.** 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.<sup>9</sup>

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  $\alpha$ , lo cual lleva a que se exageren las modificaciones posttraduccionales (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 2 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 fibrillogénesis 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.<sup>10</sup>

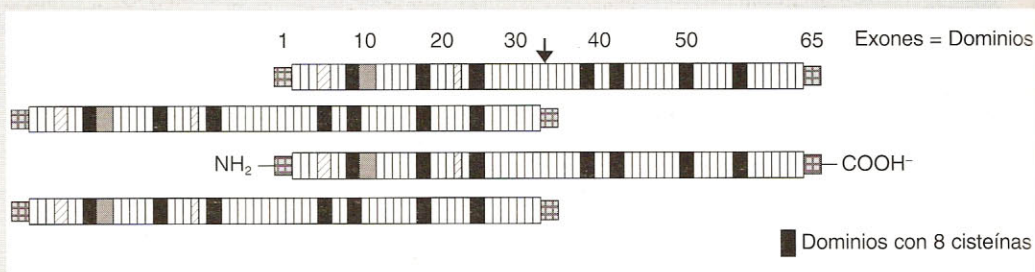
### Osteogénesis imperfecta (OI)

Las mutaciones que afectan el colágeno causan principalmente las osteogénesis imperfec-

tas, un grupo de enfermedades relacionadas con defectos del tejido conectivo, que se expresan principalmente en problemas óseos. 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





**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.

### Panel 12-1. El síndrome de Marfan (aracnodactilia) y el defecto de la proteína fibrilina.

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 (véase 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.<sup>12,13</sup>

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.<sup>11</sup>

### Mutaciones del gen de la fibrilina y síndrome de Marfan (véase panel 12-1)

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 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.

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  $\text{Ca}^{++}$ . El gen, además, contiene siete "motivos" de 70 aa. (incluyendo ocho cisteínas cada uno), similares a una parte de la proteína ligadora al factor de crecimiento y transformación  $\beta 1$ .

El gen principal de la fibrilina se encuentra en el cromosoma 15 (15q21) y se han demostrado más de 15 mutaciones de este gen asociadas con el síndrome de Marfan.<sup>14</sup> 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.

### Mutaciones de receptores de membrana: el receptor de lipoproteínas de baja densidad (R-LBD)

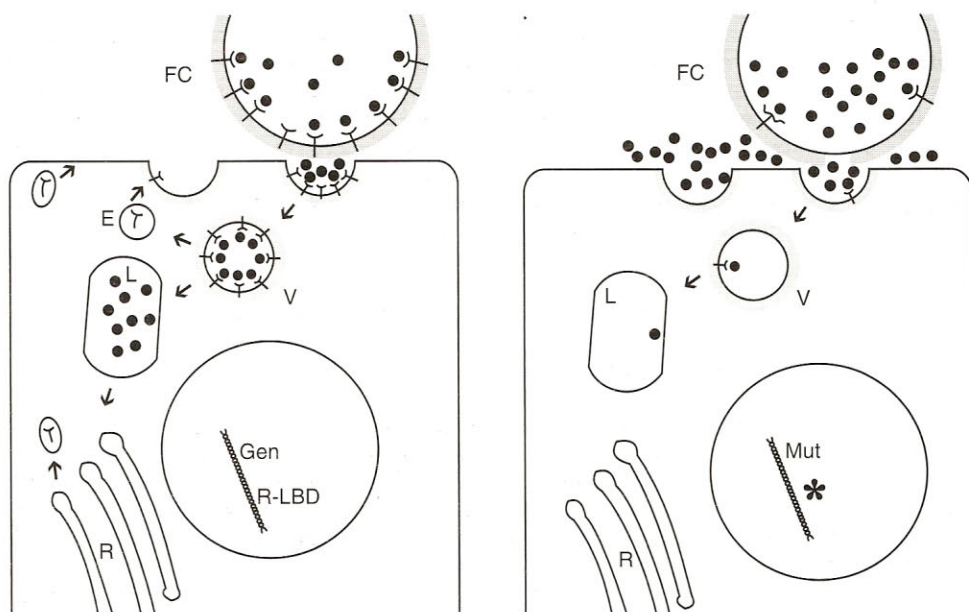
Los receptores de la membrana citoplasmática son proteínas grandes y complejas que cumplen varias funciones. Dado que estas proteínas atraviesan la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática, deben poseer uno o varios dominios "transmembranosos", de carácter intensamente hidrofóbico, que contactan 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. 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. 12-6).

### Gen del receptor de LBD y proteína receptora

El gen de este receptor está localizado en el cromosoma 19 (19p13), tiene 45 kb y contiene 18 exones;<sup>15</sup> los grupos de exones se corresponden con los dominios de la proteína (fig. 12-7). 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.<sup>15</sup> 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 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

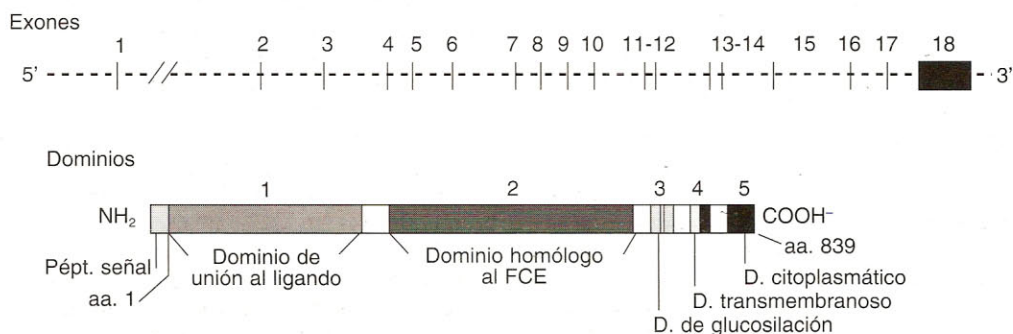


**Fig. 12-6.** Esquema de la captación y el transporte intracelular de LBD con colesterol. A la izquierda, célula con el gen normal del receptor de LBD; a la derecha, célula con mutación del gen del R-LBD. FC: fosita con cubierta; V: vesícula con cubierta; L: lisosoma; R: retículo endoplasmático y aparato 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).

48 aa., donde 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 6 exones pueden determinar una proteína truncada no funcional, ya sea por-



**Fig. 12-7.** Gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (R-LBD) y su proteína.



que 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.

### 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; en los heterocigotos lleva a una anticipación de 25 años en la posibilidad de infartos cardíacos comparada con la población no afectada, mientras que los homocigotos 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 heterocigotos; en los homocigotos esta cifra se duplica (600 a 1.200 mg/100 mL).

La presencia de xantomas (tumorações causadas por el cúmulo 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 coles-

terol 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 heterocigotos es posible una cierta reducción del nivel plasmático de colesterol (hasta un 30%) mediante medidas dietéticas; sin embargo, en los homocigotos las dietas son inefectivas.

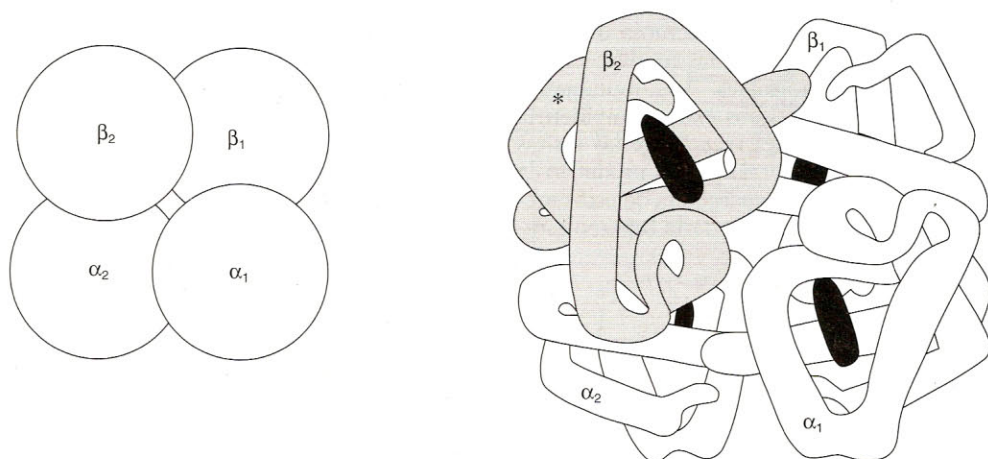
### Proteínas transportadoras. Las hemoglobinas (Hbs)

Las hemoglobinas son proteínas tetraméricas, compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de un tipo y las otras dos de otro (en la hemoglobina A, dos cadenas  $\alpha$  y dos  $\beta$ ); 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. 12-8). Cada globina es parecida a la mioglobina del músculo, y las distintas globinas son parecidas entre sí, aunque no idénticas; la globina  $\alpha$  tiene 141 aa. y la globina  $\beta$ , 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 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





**Fig. 12-8.** 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.<sup>16</sup> La cadena sombreada (asterisco) se detalla en la figura 12-9.

proteína, es necesario considerar algún detalle de esta estructura molecular.<sup>16,17</sup> 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  $\alpha$ -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  $\beta$  esta estructura terciaria está compuesta por los ocho segmentos A-H), y finalmente, la estructura *cuaternaria* es la disposición de las subunidades (las cuatro globinas) que conforman la Hb completa (fig. 12-8). 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. 12-9). La nomenclatura basada en los segmentos helicoidales permite distinguir claramente el lugar donde está ubicada cada anomalía (p. ej., un aminoácido cambiado) en una de las cadenas; esto último es muy útil, puesto que existen más de 500 variedades 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 12-4 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 hemoglobinas embrionarias están formadas por cadenas polipeptídicas que no se encuentran en el adulto (las cadenas  $\zeta$ ,  $\epsilon$  y  $\gamma$ ); 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  $\zeta$  y  $\epsilon$  dejan de sintetizarse aceleradamente, mientras las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$  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  $\gamma$  declina y aumenta la cadena  $\beta$ , hasta reemplazar totalmente a la  $\gamma$  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 A<sub>2</sub>, que está constituida por 2 cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\delta$  (este último tipo de cadena se sintetiza poco en relación con las otras cadenas) (fig. 12-10).

Las transiciones de las hemoglobinas durante el desarrollo plantean un problema importante: investigar cuál es el mecanismo por el



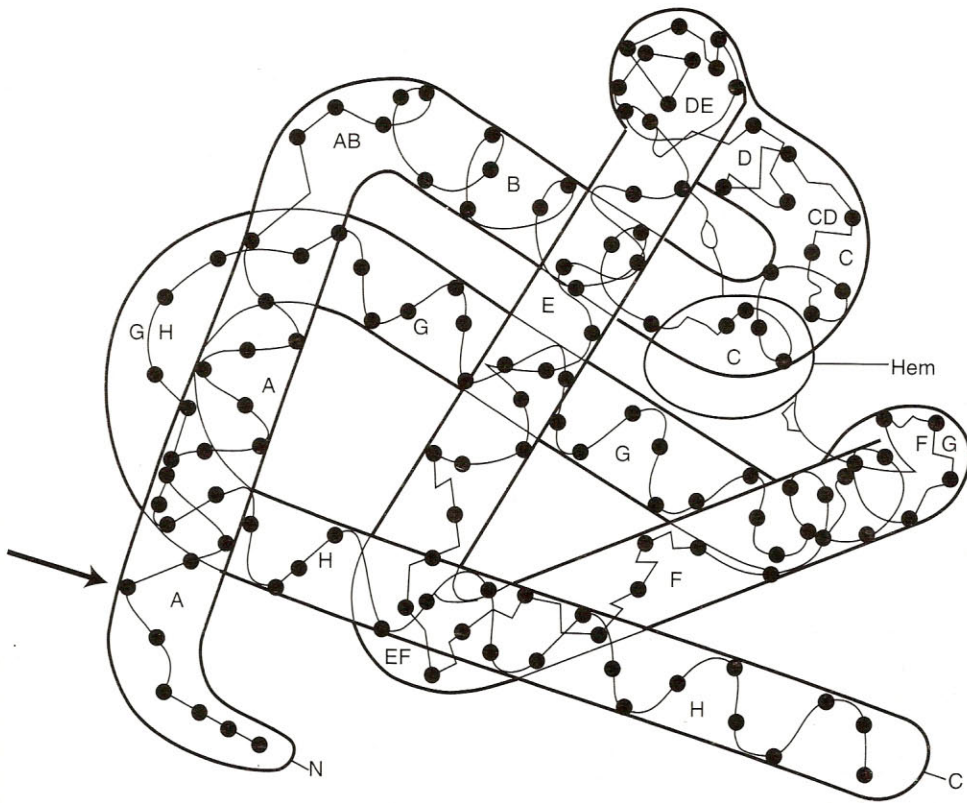


Fig. 12-9. Esquema de las estructuras secundaria y terciaria de la globina  $\beta$ . Esta cadena se corresponde con la señalada con el asterisco en la figura 12-8. Cada residuo aminoacídico está representado por un círculo negro. La flecha señala la posición del aminoácido cambiado en la Hb S de la anemia falciforme.

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.

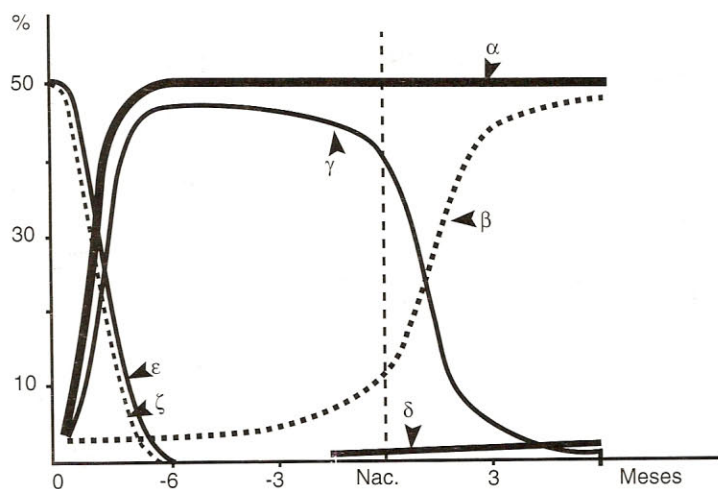
### Familias génicas de las globinas. Familia génica $\alpha$

Los genes de las globinas se constituyen en dos familias: la  $\alpha$  y la  $\beta$ , que abarcan varios genes y pseudogenes cada una y se localizan en cromosomas diferentes (la  $\alpha$  en la región termi-

Cuadro 12-4. 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	$\alpha_2^A\gamma_2^F$		Hemoglobina fetal (2 <sup>da</sup> mitad del embarazo)
Hb A2	$\alpha_2^A\delta_2$		Hemoglobina menor del adulto (2%)
Hb Gower I	$\zeta_2\varepsilon_1$		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	$\gamma_4$		Encontrada en la $\alpha$ -talasemia 1
Hb H	$\beta_4$		Propia de $\alpha$ -talasemias heterocigotas
Hb Constant Spring	$\alpha_1^{CS}\beta_2$		Cadenas $\alpha$ anormalmente prolongadas
Hb Lepore	$\alpha_2\delta\beta_2$		Cadena mixta $\delta\beta$ por recombinación anormal
Hb Köln	$\alpha_2\beta_2^{98\text{ Val-Met}}$		Presente en una anemia hemolítica

\*Se conocen alrededor de 500 variantes de cadenas de globinas.



**Fig. 12-10.** 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 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ ).

nal del brazo corto del cromosoma 16; la familia  $\beta$  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  $\alpha$  contiene tres genes funcionales:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\zeta$ , que se expresan en diferentes períodos, puesto que el gen zeta ( $\zeta$ ) se expresa al inicio de la hemopoyesis embrionaria y disminuye hacia el tercer mes, mientras avanzan los  $\alpha$ , que se mantienen activos de allí en adelante. Hay además tres pseudogenes:  $\psi\alpha_1$ ,  $\psi\alpha_2$  y  $\psi\zeta$ ; además de un gen  $\theta$ , cuya expresión es menor y poco conocida (fig. 12-11).

### Familia génica de las $\beta$ globinas

La familia génica  $\beta$  se extiende por más de 50 kb y contiene cinco genes y dos pseudogenes (fig. 12-12). 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 ( $\epsilon$ ), que es el primero en el sentido 5', es el que se activa inicialmente en el embrión temprano; los genes gamma ( $\gamma$  y  $\gamma$ ) difieren sólo en la codificación del aminoácido 136 (alanina en  $\gamma$  y glicina en  $\gamma$ )

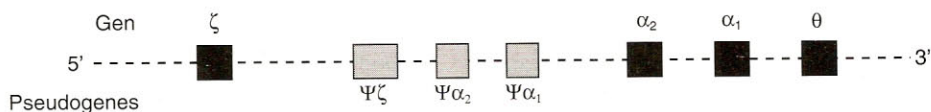
y se activan intensamente en la segunda mitad del embarazo, para formar parte de la Hb fetal; por último, el gen  $\beta$  (y en pequeña escala el gen  $\delta$ ) son activos durante toda la vida adulta. Todos estos genes son pequeños (también lo son los de la familia  $\alpha$ ), con una extensión de aproximadamente 1,6 kb (los  $\alpha$  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. 12-13).

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 transcrito.

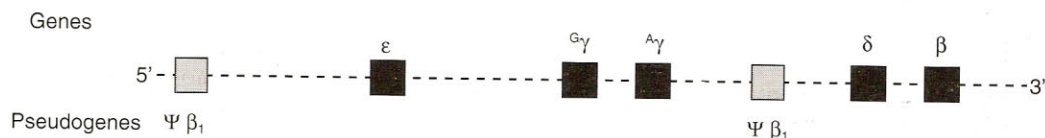
### Regulación génica en la familia $\beta$ de globinas

La expresión sucesiva de los genes  $\epsilon$  (épsilon), luego de los dos  $\gamma$  y después de los  $\delta$  y  $\beta$ , depende de una región situada "arriba" (en dirección 5') en esta familia, a unas 11 kb de su inicio. Este segmento se denomina "región controladora de locus" (RCL).<sup>18</sup> Una región contro-



**Fig. 12-11.** Familia génica de las globinas  $\alpha$ . Los genes funcionales se representan en color negro; los pseudogenes  $\psi$  en punteado.





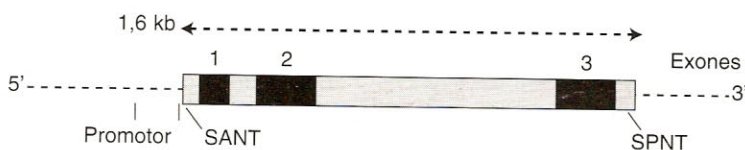
**Fig. 12-12.** Familia génica de las globinas de tipo  $\beta$ . Los genes funcionales se representan en color negro; los pseudogenes, en punteado.

ladora similar se encuentra también antes de la familia génica  $\alpha$ . 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. 4). 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  $\gamma$  y  $\beta$ , el gen  $\beta$  se expresa precozmente, mientras el gen  $\gamma$  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. 12-14).

### 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 enferme-

dad es una anemia grave en los homocigotos (patrón de herencia recesivo); en los heterocigotos, en condiciones ambientales normales, generalmente es asintomática y se denomina el "rasgo de células falciformes". Sin embargo, en ciertas condiciones los heterocigotos pueden sufrir "crisis" con síntomas parecidos a los del homocigoto, pero pasajeros. Hay además "heterocigotos compuestos", es decir, heterocigotos 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 deformados, 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" (heterocigotos) 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;<sup>19</sup> 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 en-



**Fig. 12-13.** Estructura de un gen de la familia  $\beta$  de las globinas. Los exones se representan en negro; las regiones no traducidas (SANT, SPNT) y los intrones en punteado.

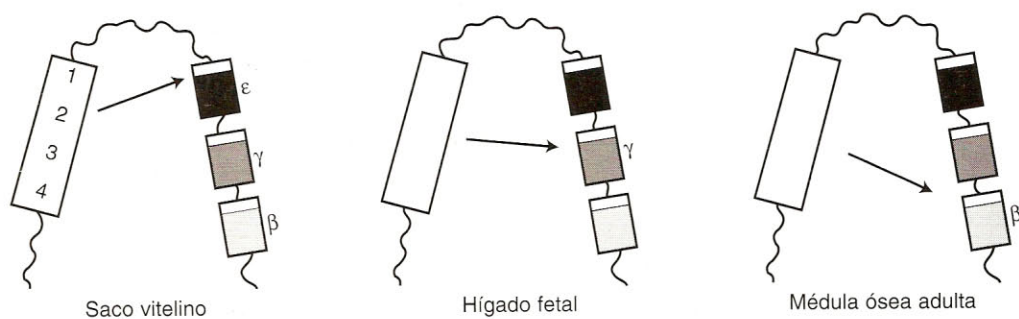


Fig. 12-14. Interacción sucesiva de la región controladora (RCL) con los genes de la familia  $\beta$ .

fermedad es una mutación puntual ( $\beta 6A3 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$ ) en el primer exón de la globina  $\beta$ , consistente en la transversión de una base (timina) por otra (adenina), que lleva a cambiar la codificación del sexto aminoácido de la globina  $\beta$  (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. 12-15).

Las crisis sintomáticas en los heterocigotos, y los síntomas agudos en los homocigotos, 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 ho-

mocigoto 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. 1).

### Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (PHHF)

En esta anomalía, la hemoglobina fetal Hb F (fórmula  $\alpha_2\gamma_2$ ) 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  $\beta$  y  $\delta$ . Las causas de esta anomalía son múltiples y se agrupan en dos clases: 1) PHHF por delección  $\delta\text{-}\beta$ , y 2) PHHF por mutaciones de punto; de esta última hay dos subclases, según se incremente la expresión del gen  $\gamma$  o el  $\delta\gamma$ . Las mutaciones de punto recaen sobre la región promotora de los genes  $\gamma$ . La PHHF no produce efectos patológicos, porque la Hb F funciona con efectividad en el organismo adulto.

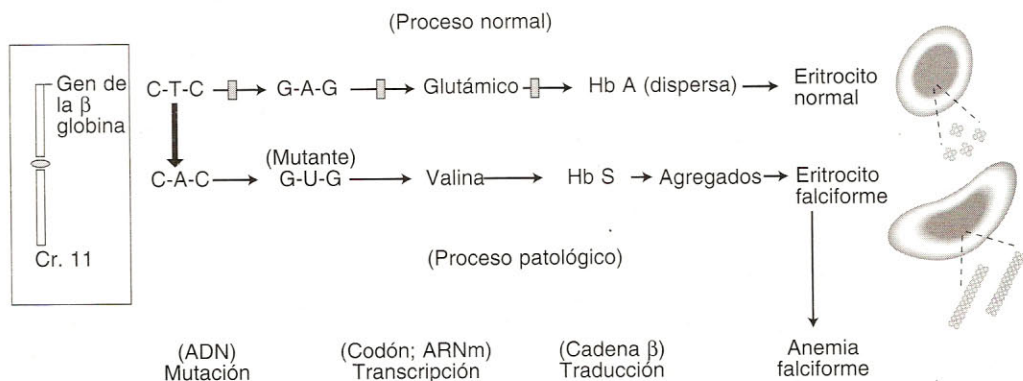


Fig. 12-15. Patogenia molecular de la formación de eritrocitos falciformes.



## Talasemias

Las talasemias son un grupo variado de enfermedades caracterizadas por un defecto en la producción de cadenas  $\alpha$  o  $\beta$ , 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  $\alpha$ -talasemias y las  $\beta$ -talasemias. Hay más de 75 anomalías moleculares que dan lugar a talasemias; estas anomalías incluyen: delecciones parciales o totales de genes de globinas; mutaciones en las regiones promotoras de esos genes; mutaciones que producen corte y empalme anormal del ARN transcrito; 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.<sup>20</sup> Las delecciones predominan en las talasemias  $\alpha$ , mientras que las mutaciones puntuales predominan en las talasemias  $\beta$ .

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  $\alpha$  o  $\beta$ , y ese déficit se acompaña con un exceso de producción de cadenas no involucradas en el defecto molecular (muchas veces la  $\gamma$ ). En ciertas  $\alpha$ -talasemias hay hemoglobinas anormales, sin ninguna cadena de tipo  $\alpha$ , tales como la Hb Barts ( $\gamma_4$ ) y la Hb H ( $\beta_4$ ). 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  $\alpha$ -talasemias (se entiende que hay un defecto molecular en la familia  $\alpha$ ) presentan una gradación creciente de gravedad según el número de genes afectados (dado que hay dos genes,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , por cromosoma, hay en total cuatro genes  $\alpha$  en el individuo). Se distinguen:  $\alpha^0$ , cuando es alelo nulo (no hay síntesis), y  $\alpha^+$ , cuando la síntesis está disminuida. La forma más severa

ocurre cuando los cuatro genes  $\alpha$  están afectados (-,-,-,-); no hay globina  $\alpha$ , ni se forma Hb A ni Hb F; sólo se forma Hb Barts ( $\gamma_4$ ) y hay hidropesía fetal, edema, hepatoesplenomegalia e insuficiencia cardíaca. Cuando hay sólo uno o dos genes  $\alpha$  afectados, es asintomática.

Las  $\beta$ -talasemias también son heterogéneas aun en mayor grado; se distingue como  $\beta^0$  el tipo que no produce cadena  $\beta$ , y como  $\beta^+$  el tipo con disminución de las cadenas  $\beta$ . Los llamados "homocigotos  $\beta^0$ " son generalmente heterocigotos compuestos de dos mutaciones diferentes; estos pacientes tienen una anemia hemolítica grave.

El tratamiento de las talasemias graves no ha sido muy efectivo. 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<sup>-</sup> 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) prescindibles en células indiferenciadas; dado que las mutaciones de sus genes no afectan la viabilidad del organismo, éstas son más fáciles de detectar. Hay más de 30 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



epidermolisis 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 19 tipos de colágeno, formados por tres cadenas  $\alpha$  helicoidales. Los genes COL (1 para cada tipo de cadena  $\alpha$ ) 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 80 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. Las mutaciones del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LBD) determinan la 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 heterocigotos tienen 300-570 mg/100 mL de colesterol y los homocigotos 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 efectiva en los homocigotos. Las hemoglobinas (Hbs) son proteínas tetraméricas formadas por 2 dímeros; la HbA del adulto es  $\alpha_2\beta_2$ . 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 Hbs anormales o variantes. Hay dos procesos de cambio de Hbs: uno alrededor del tercer mes del desarrollo embrionario y otro en el período posnatal. La familia génica  $\alpha$ , en el cromosoma 16p, contiene tres genes funcionales:  $\zeta$ ,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , y tres pseudogenes; la familia génica  $\beta$  contiene cinco genes ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$ ) y dos pseudogenes. El orden de los genes tiene significación funcional. Cada gen es pequeño (1,6 kb el  $\beta$ ; 0,8 kb el  $\alpha$ ) 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,  $\beta_6A3 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$ , 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  $\alpha$ -talasemias (cuya gravedad se incrementa con el número de genes  $\alpha$  afectados) y  $\beta$ -talasemias (más graves en los "homocigotos" para alelos nulos,  $\beta^0$ ).

## 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. Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 1995; 80:83-93.
4. Rosenberg M, Ray Chaudhury A, Shows T, Le Beau MM, Fuchs E. A group of type I keratin genes on human chromosome 17; characterization and expression. *Mol Cell Biol* 1988; 8:722-736.
5. Lane EB. Keratin diseases. *Current Opinion in Genetics and Develop* 1994; 4:412-418.
6. Epstein EH. Molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Science* 1992; 256:799-804.
7. Hulmes DJS. The collagen superfamily - diverse structures and assemblies. En: Tipton KF (ed.). *Essays in Biochemistry*, vol. 27 London: Portland Press, 1992; 49-65.
8. Vuorio E, de Crombrughe B. The family of collagen genes. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:837-872.
9. D'Alessio M, Bernard M, Pretorius PJ, de Wet W, Ramírez F. Complete nucleotide sequence of the region encompassing the first twenty-five exons of the human pro $\alpha 1(I)$  collagen gene (COL1A1). *Gene* 1988; 67:105-115.
10. Deak SB, Scholz PM, Ament PS, Constantinou CD, Levi Minzi SA, González-Lavin L, Mackenzie JW. The substitution of arginine for glycine 85 of the  $\alpha 1(I)$  procollagen chain results in mild osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* 1991; 266:21827-21832.



11. 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.
12. 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.
13. Liu W, Qian C, Comeau K, Brenn T, Furthmayr H, Francke U. Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domains disrupt microfibril assembly and cause severe Marfan syndrome. *Hum Molec Genet* 1996; 5:1581-1587.
14. McInnes RR, Byers PH. Biochemical genetics: examples of life after cloning. *Current Opinion in Genet and Develop* 1993; 3:475-483.
15. Südhof TC, Goldstein JS, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 1985; 228:815-822.
16. Dickerson RE, Geis I. The structure and action of proteins. New York: Harper & Row, 1969.
17. Collins FS, Weissman SM. The molecular genetics of human hemoglobins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1985; 31:315-462.
18. Crossley M, Orkin SH. Regulation of the  $\beta$ -globin locus. *Current Opin Genetics and Develop* 1993; 3:232-237.
19. Murayama M. Molecular mechanism of red cell "sickling". *Science* 1966; 153:145-149.
20. Orkin SH, Kazazian HH. The mutation and polymorphisms of the human  $\beta$ -globin gene and its surrounding DNA. *Ann Rev Genet* 1984; 18:131-171.

## GENÉTICA DEL DESARROLLO NORMAL Y DEL DESARROLLO DE LOS TUMORES

*Cascadas y genes regulatorios. Proteínas ligadoras de ADN. Genes HOX. Genes PAX. Genética del desarrollo de los miembros. Acondroplasia y gen R3FCF. Genética de tumores. Esclerosis tuberosa. Oncogenes. Retrovirus. Genes supresores. El retinoblastoma. Proteínas RB y p53. Otros genes supresores.*

### Introducción

El desarrollo embrionario obedece a un plan genético, que sólo ha comenzado a comprenderse en los últimos años. 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.).<sup>1</sup> 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 las células del endodermo; en los deuterostomas el esbozo de la boca es posterior a la formación del 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,<sup>2</sup> 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", 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.<sup>3</sup>



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 el desarrollo posnatal (por ejemplo, la acondroplasia), 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.

Por otra parte, los tumores malignos son procesos esencialmente *genéticos* en su mecanismo; en ellos se alteran genes reguladores, algunos de los cuales funcionan de manera normal durante el desarrollo embrionario, modulando la división celular y la capacidad de diferenciación de las células. Los tumores malignos progresan en las células *somáticas*, a diferencia del embrión, y su resultado, en general, es el desarrollo a expensas del resto del organismo, poniendo en peligro la vida. En consecuencia, se resumirán las características de los oncogenes celulares y los genes represores de tumores.

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 otra parte, los 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.

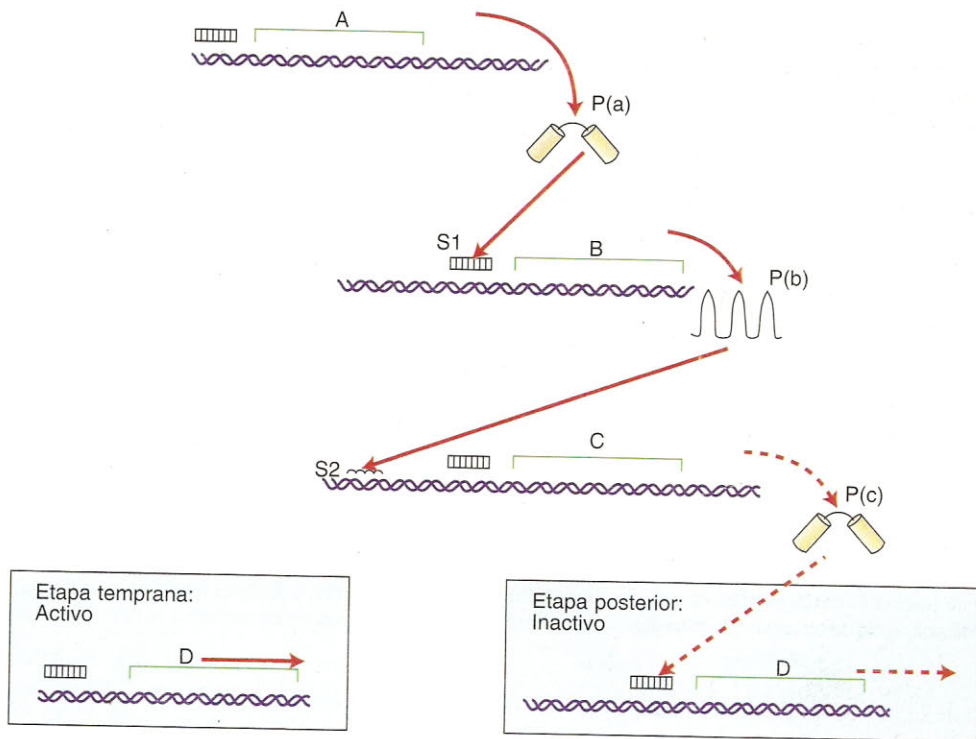
### Mecanismo general de los genes reguladores del desarrollo: cascadas regulatorias

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. 13-1). En forma más restringida, se puede decir que muchos genes del desarrollo codifican *factores de transcripción* (véase cap. 4), 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 determinados, 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). 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  $\epsilon$  y  $\zeta$  de las hemoglobinas embrionarias en el embrión temprano y su silenciamiento a partir del tercer mes del desarrollo.

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*.



**Fig. 13-1.** 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.

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.

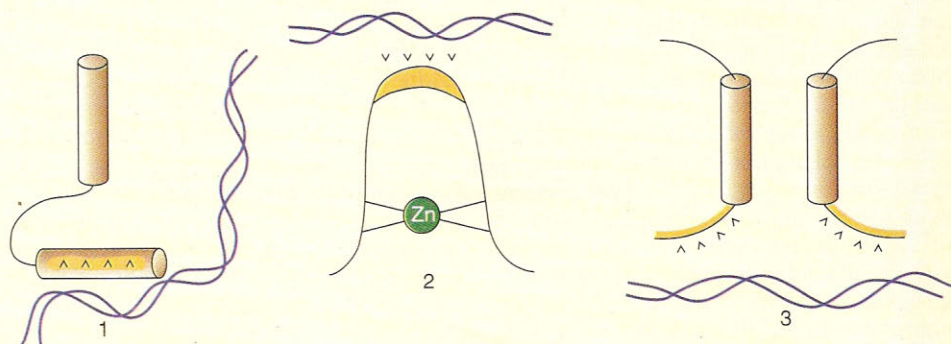
### Proteínas ligadoras de ADN y sus "motivos"

Un numeroso grupo de proteínas es codificado por genes reguladores; estas proteínas, luego de ser sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos, ingresan al núcleo y buscan ciertas secuencias "consenso" de zonas del ADN corres-

pondientes 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. 13-2).

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  $\alpha$ -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 sen-





**Fig. 13-2.** Esquema de los “motivos” en proteínas reguladoras. 1: hélice-vuelta-hélice; 2: “dedos de Zinc”; 3: “cremallera de leucinas”. Los segmentos de  $\alpha$ -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 ^).

tido 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 2 cisteínas y 2 histidinas (también puede estar formado por 4 cisteínas). Por lo común, estas proteínas reguladoras tienen varios “dedos de Zn”; su número varía entre 2 y 9 “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  $\alpha$ -hélice, de tal modo que las leucinas están siempre separadas por 7 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, inte-

ractúan entre sí 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 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. 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; 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



**Panel 13-1. 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. Recientemente se lograron 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). El ácido retinoico es sintetizado y segregado en el embrión temprano a nivel del *nódulo de Hensen* y de la *notocorda*;<sup>7</sup> 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.<sup>8</sup> 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):



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 *Hox a* (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 *Hox a*, muestran un típico efecto "homeótico": se produce la transformación de segmentos axiales del embrión en un sentido "anterior" (hacia segmentos anteriores, expansión de tipo mesencefálico hacia el rombencéfalo) en el caso del "noqueo" de los *Hox a1* y *Hox b1*. El efecto homeótico tiene un sentido "posterior" o caudal en el caso de un tratamiento experimental con exceso de AR (hiperactivación de los genes *Hox a*, que determina una "posteriorización" de los segmentos axiales, a desmedro del mesencefalo y el prosencefalo). Estos datos, así como los relativos al desarrollo de los miembros, demuestran el papel esencial de las familias HOX en el desarrollo del embrión temprano.

*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;<sup>5</sup> 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.<sup>6</sup>

### Genes "HOX" humanos (véase panel 13-1)

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 son llamados "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.



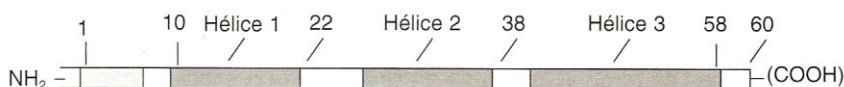


Fig. 13-3. Esquema de un homeodominio correspondiente al producto de un gen *HOX*.

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 denomina "homeodominio", de 60 aminoácidos, que forma 3  $\alpha$ -hélices y que es la parte que reconoce y se relaciona con una secuencia determinada de ADN (en especial la tercera de las  $\alpha$ -hélices) (fig. 13-3).

Los genes "HOX" humanos se encuentran en cuatro familias génicas, las familias HOX 1 - HOX 4 (o HOX A - HOX D), que están localizadas respectivamente en las regiones cromosómicas 7p, 17q, 12q y 2q (fig. 13-4).<sup>9</sup>

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;<sup>10</sup> 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 8 segmentos o rombómeros, asociados con los arcos branquiales 1-4, hay una activación escalonada de los genes Hox b1 - Hox b4 en el embrión del ratón.<sup>11</sup>

La función de los genes homeóticos humanos ha sido especialmente estudiada en el desarrollo de los miembros (véase más adelante).

Otros genes homeóticos, similares a ciertos genes de la segmentación, son los genes humanos PAX, que están asociados con ciertas malformaciones.

### Genes "PAX": síndrome de Waardenburg y gen PAX 3

Los genes reguladores llamados "PAX" han sido identificados por contener una secuencia característica, la "caja apareada" ("paired box"), originalmente descrita en un gen de segmentación (paired = apareado) de *Drosophila*.<sup>12</sup>

La "caja apareada" es una secuencia que codifica el dominio "apareado", de 130 aminoácidos, que contiene una  $\alpha$ -hélice y un motivo hélice-vuelta-hélice.

En 1992, se conocían 8 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

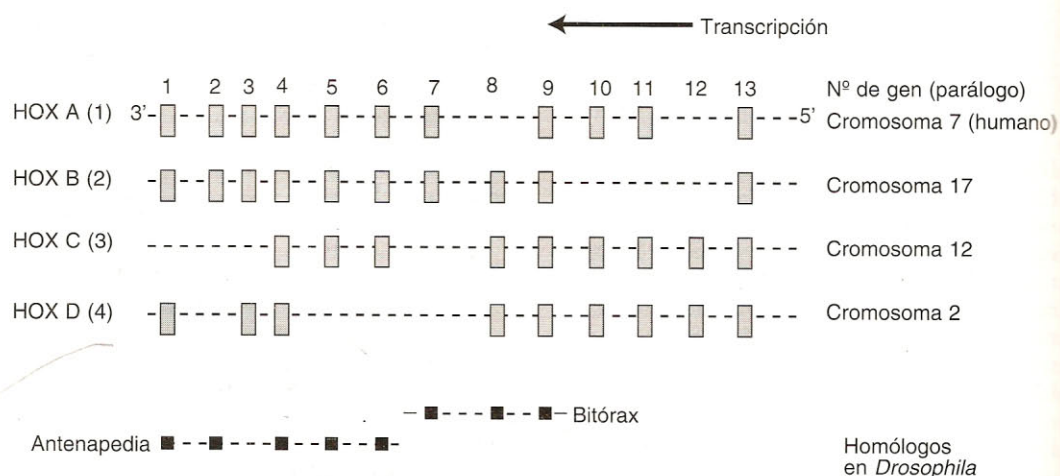
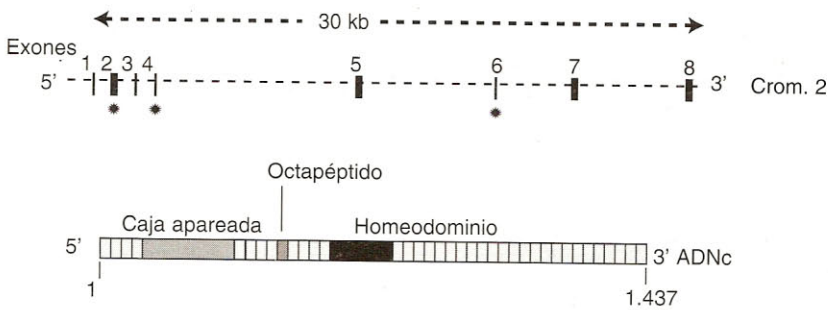


Fig. 13-4. Familias génicas HOX humanas. Cada familia génica contiene varios de los genes HOX, aunque pueden faltar algunos. Los genes homólogos de diferentes familias reciben el mismo número (arábigo) y se denominan "parálogos". Abajo se esquematizan los complejos génicos correspondientes de *Drosophila*.



**Fig. 13-5.** Organización del gen *PAX 3* (en el cromosoma 2). Los 8 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.<sup>13</sup>

corresponde al síndrome de Waardenburg, que es el responsable más común de la sordera hereditaria; 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 *PAX 3*, localizado en el cromosoma 2.<sup>13,14</sup>

El gen *PAX 3* se extiende por más de 30 kb y presenta 8 exones, que están representados en un ADNc de 1.437 pb<sup>13</sup> (fig. 13-5).

Las mutaciones en el gen *PAX 3* muestran que el síndrome de Waardenburg puede ser producido por mutaciones en cualquiera de tres segmentos: el dominio apareado, el octapéptido y el homeodominio, de tal manera que el resultado se debe a una *pérdida de la función normal* del gen *PAX 3*. 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.<sup>14</sup> Por consiguiente, se ha sugerido que la pérdida de la función del gen *PAX 3* 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 *PAX 3*.

### La aniridia en el hombre: gen *PAX 6*

El segundo ejemplo de un gen *PAX* anormal es el del gen *PAX 6*, mutado en la aniridia congénita.<sup>14</sup> El gen *PAX 6* 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; estas relaciones entre el gen *PAX 6* y el desarrollo ocular se observan también en *Drosophila*.

La aniridia 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 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 delección visible al microscopio y que incluye la región del gen *PAX 6*. En el ratón existe un gen homólogo, el *Pax 6* (difiere sólo en un codón respecto de *PAX 6*), cuya mutación dominante *Sey* ("small eye", ojo pequeño) produce efectos similares. Los homocigotos para la mutación de *Pax 6* en el ratón no sobreviven, carecen de ojos y de cavidades nasales, y presentan defectos severos del desarrollo cerebral.<sup>15</sup>

Las mutaciones que producen la aniridia humana tienen un espectro característico; prácticamente todas ellas son de terminación de la



cadena, 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 delecciones que producen el síndrome WAGR no se diferencian de la aniridia simple en lo que respecta al ojo y, por consiguiente, la aniridia parece ser el resultado de una pérdida total de la función de uno de los dos genes PAX 6 de las células.<sup>15</sup> 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 homocigotos carecen de ojos y cavidades nasales, que se desarrollan de espesamientos del ectodermo o placodas, se ha sugerido que la función de PAX 6 es requerida 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 PAX 6.<sup>15</sup>

Por último, el hecho de que un gen de la mosca *Drosophila* sea homólogo del PAX 6 y que su mutación altere también el ojo compuesto de la mosca, ha llevado a sugerir que el gen PAX 6 ha aparecido en la evolución como un gen que dirige la formación de estructuras sensoriales en la región neural anterior.<sup>15</sup>

## 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 mosca) 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. El interés de este modelo es mayor por la frecuencia con la que ocurren malformaciones de los miembros de origen genético, en especial las sindactilias, las polidactilias y las manos hendidas o en pinza de cangrejo.

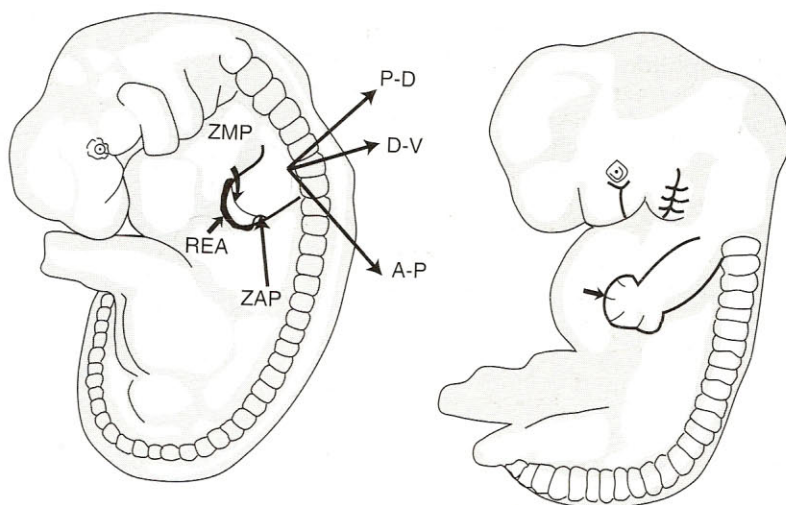
Los miembros aparecen como esbozos o yemas en el embrión humano de la quinta semana, y desde un punto de vista funcional, se considera que en estos esbozos hay tres ejes de de-

sarrollo: el *proximal-distal* (P-D, de la raíz del miembro a su extremidad), el *ántero-posterior* (A-P, del pulgar hacia el meñique) y el *dorso-ventral* (D-V, del dorso de la mano hacia la palma). Cada eje está determinado por un producto génico específico: el proximal-distal por el *factor de crecimiento fibroblástico-4* (FCF-4), el *ántero-posterior*, por el producto del gen *erizo sónico* (SHH, sonic hedgehog), y el dorso-ventral, por el producto del gen *Wnt7a*.<sup>16-18</sup>

Además de los tres ejes, en los esbozos o yemas se distinguen varias regiones con potencial de desarrollo especial: 1) el repliegue (cresta) ectodérmico apical (REA), 2) la zona mesenquimática de progreso (ZMP), y 3) la zona de actividad polarizante (ZAP) (fig. 13-6).

El repliegue apical (REA) es un espesamiento del ectodermo del extremo del esbozo, constituido por un epitelio pseudoestratificado que forma un cordón, debajo del cual hay una zona especial de mesénquima, la zona de progreso (ZMP); ambas zonas se influyen mutuamente, ya que el REA mantiene indiferenciada a la ZMP, y esta última induce la formación del REA. El REA dirige el crecimiento en el sentido proximal-distal y parece determinar los cambios en ese eje; si se reseca el REA, se trunca el desarrollo del miembro. El REA puede ser sustituido por la proteína "factor de crecimiento fibroblástico 4" (FCF-4); esta proteína es capaz de rescatar el desarrollo axial del miembro luego de ser reseca el REA. El blanco de la acción de esta proteína es la zona mesenquimática adyacente (ZMP) donde progresa el crecimiento axial del miembro; en dicha zona se encuentra un receptor específico de este factor de crecimiento: el receptor "R1FCF". Por consiguiente, el mecanismo de determinación proximal-distal comprende la activación del gen del FCF-4 en las células epiteliales del REA y la utilización de su producto (en forma específica, por poseer el receptor R1FCF) en el mesénquima de la zona de progreso. Este mecanismo que opera en el eje P-D se continúa con genes dependientes (o "inferiores"), que pertenecen a la categoría de los homeóticos de clase HOX (aunque estos genes HOX cumplen funciones sobre todo en el eje A-P).

En ese eje, en el extremo del esbozo y en la región más posterior 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 en la región anterior. Las acciones de esta ZAP pueden ser duplicadas por el ARN de un gen llamado "erizo sónico"



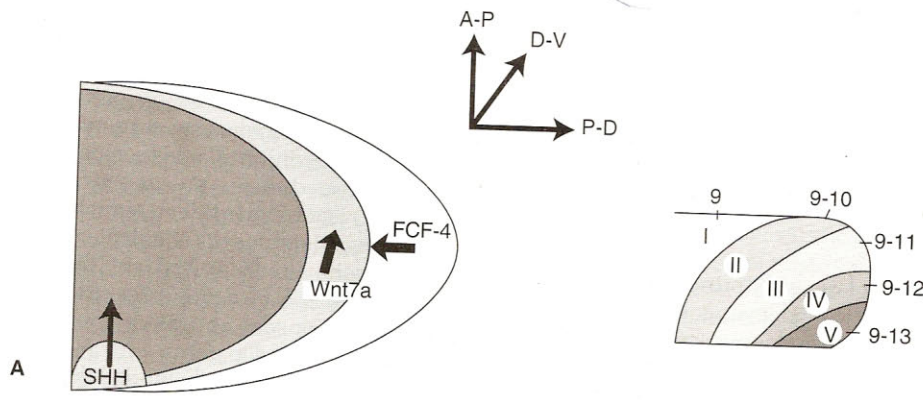
**Fig. 13-6.** Esbozo o yema de un miembro en el embrión de quinta semana del desarrollo, con las regiones especializadas: REA, repliegue ectodérmico apical; ZMP, zona mesenquimática de progreso; ZAP, zona de actividad polarizante. Los tres ejes están señalados. A la derecha, a la sexta semana, con los surcos radiales interdigitales.

(SHH), gen que está activo en la ZAP y cuya activación depende de la proteína FCF-4 sintetizada en el REA; a su vez, el producto del SHH activa al gen de FCF-4, lo cual determina un lazo de retroalimentación que mantiene el crecimiento y desarrollo en los dos ejes P-D y A-P (fig. 13-7).

En el tercer eje, el dorso-ventral, 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 de-

sempeñan 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 entre sí en el desarrollo de un miembro. El gen FCF-4 parece ser "interruptor" porque basta para desatar el crecimiento de un miembro; su



**Fig. 13-7.** A. 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. B. Distribución territorial de genes *HOXD* expresados en cada territorio. Los números expresan el tipo de genes *HOXD* expresados en cada territorio. Los márgenes de los territorios delinean los futuros rayos digitales.



**Panel 13-2. 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, que incluye fusiones parciales y duplicaciones de dedos.<sup>19</sup> En tres familias investigadas se observaron 29 individuos heterocigotos y uno homocigoto para una mutación dominante y autosómica causante del defecto: en los heterocigotos, 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 metacarpiario también adicional. En los dedos de los pies hay anomalías similares. El homocigoto tiene alteraciones más intensas, con fusión de los tres dedos posteriores, dedos muy cortos y metacarpiarios 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.<sup>19,20</sup>

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. 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. La actividad de estos genes forma territorios superpuestos en el extremo del miembro, en la región que va a formar los dedos; cada superposición, en apariencia, delinea la formación específica de un dedo. Las activaciones específicas de genes HOX D en estos territorios que formarán las radiaciones digitales posiblemente están en relación con la programación de apoptosis (muerte celular programada) en el mesénquima interdigital<sup>17</sup> (véase panel 13-2).

### Receptor del factor de crecimiento fibroblástico (R3FCF) y acondroplasia humana

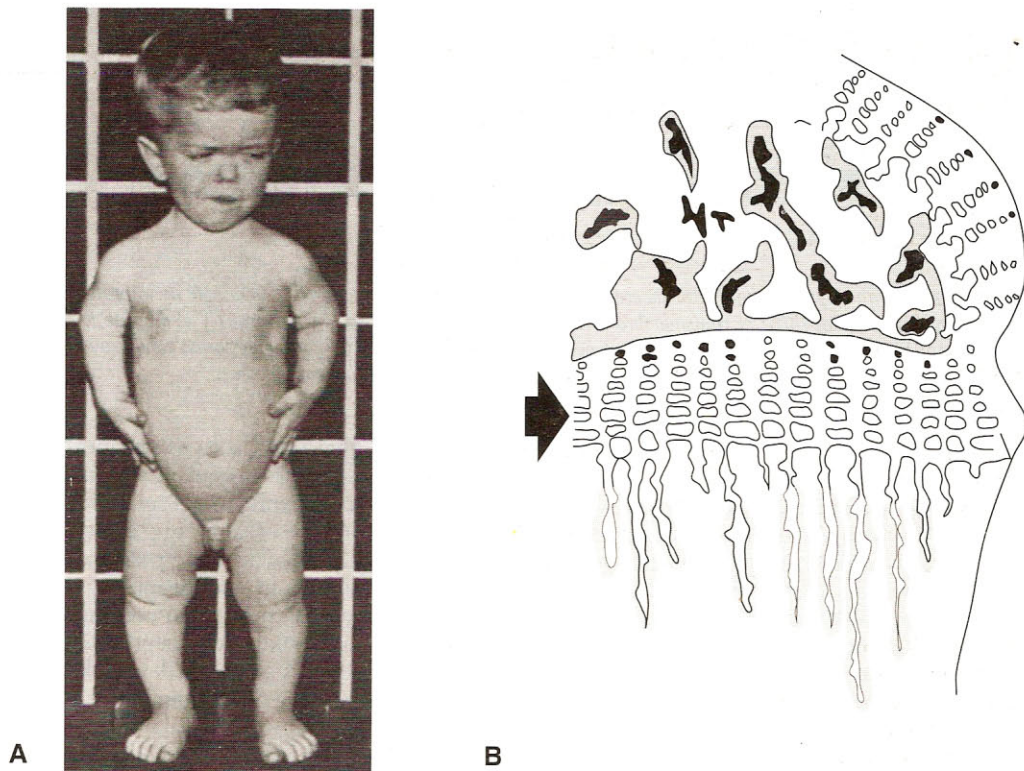
La acondroplasia es la principal causante de enanismo genético; además, constituye una enfermedad hereditaria dominante clásica, que ha servido como modelo de la transmisión hereditaria de genes anormales. Los enfermos acondroplásicos son fácilmente identificables desde el nacimiento y aun antes si se cuenta con información radiográfica. La talla ya está reducida a un promedio de 46 cm en el nacimiento, con el puente nasal deprimido, cráneo 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 enanismo por acortamiento de los huesos largos de los miembros, con ciertas anomalías óseas características, como los dedos en tridente 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. 13-8).

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 endocondraria; los cartílagos metafisarios que se osifican precozmente son los principales responsables del crecimiento disminuido en los miembros. La incidencia de acondroplasia oscila alrededor de 1 en 10.000 nacidos vivos, y en el 80% de los casos son mutaciones nuevas, originadas en uno de los padres; el aumento de la edad paterna está relacionado con un aumento de la probabilidad de tener un hijo con esta malformación.

La acondroplasia es un rasgo dominante con penetrancia completa, es decir que la presencia del gen mutante siempre da un cuadro patológico, que se manifiesta relativamente con poca





**Fig. 13-8.** A. Niño acondroplásico con enanismo 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. Cartilago de conjunción (flecha), tejido en el cual el gen R3FCF es activo y su producto anormal acelera la conversión del cartilago en hueso.

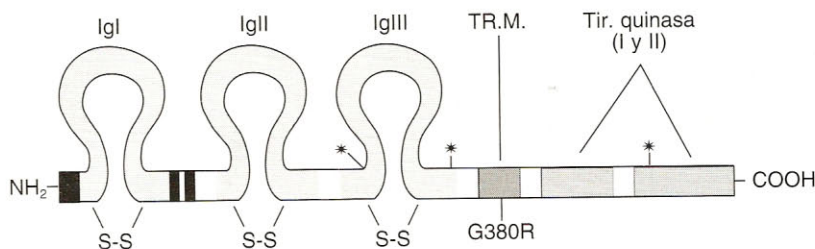
variantes. Con cierta frecuencia, dos acondroplásicos contraen matrimonio entre sí; en estos casos, los hijos tienen una probabilidad del 25% de ser normales, un 50% de ser acondroplásicos heterocigotos como los padres y, finalmente, hay un 25% de probabilidad de que sean *homocigotos* para el gen mutante. Los homocigotos para la acondroplasia no sobreviven a la época perinatal; presentan acentuación de los defectos óseos, con graves efectos neurológicos.

Recientemente se ha localizado el gen afectado en la acondroplasia en el extremo del cromosoma 4 humano (4p16.3).<sup>21</sup> El gen normal codifica el receptor 3 para el factor de crecimiento fibroblástico (a su vez, este factor de crecimiento tiene 9 variantes). 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.<sup>22</sup> El gen de este receptor, denominado R3FCF (= FGFR3 en inglés), codifica la proteína receptora, que es una glucoproteína

de membrana constituida por 5 dominios (fig. 13-9): un dominio citoplasmático con actividad de quinasa de tirosinas, donde se transduce la señal; un dominio transmembranoso, que atraviesa la membrana, y 3 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 al 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, y modifica el codón 380 para cambiar una glicina por una arginina.<sup>22</sup> Sólo 3 casos poseían una mutación diferente en el mismo nucleótido, consistente en una transversión de la guanina por citosina, que modifica el mismo codón, y un único caso atípico no poseía esa mutación. Por consiguiente, es probable que esta mutación sea la única responsable de la acondroplasia, con lo cual esta afección, junto a la anemia falciforme (véase cap. 12), sería una de





**Fig. 13-9.** Proteína receptora 3 del factor de crecimiento fibroblástico. Se señalan los 5 dominios de la proteína (los de tipo inmunoglobulina, IgI-IgIII; el transmembranoso TR.M., y el citoplasmático, Tir. quinasa (I y II)) y el sitio de la mutación más frecuente en la acondroplasia (G380R, que cambia una glicina por una arginina). Asteriscos: zonas cuya mutación está asociada con displasia tanatofórica (malformación letal vinculada con la acondroplasia).

las pocas enfermedades monogénicas por una única mutación específica; esto concuerda con la homogeneidad del cuadro clínico en la acondroplasia. Por otra parte, 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). Este fenómeno inesperado podría explicarse si existiera un pseudogén cercano que actuara como inductor de una conversión génica.<sup>22</sup>

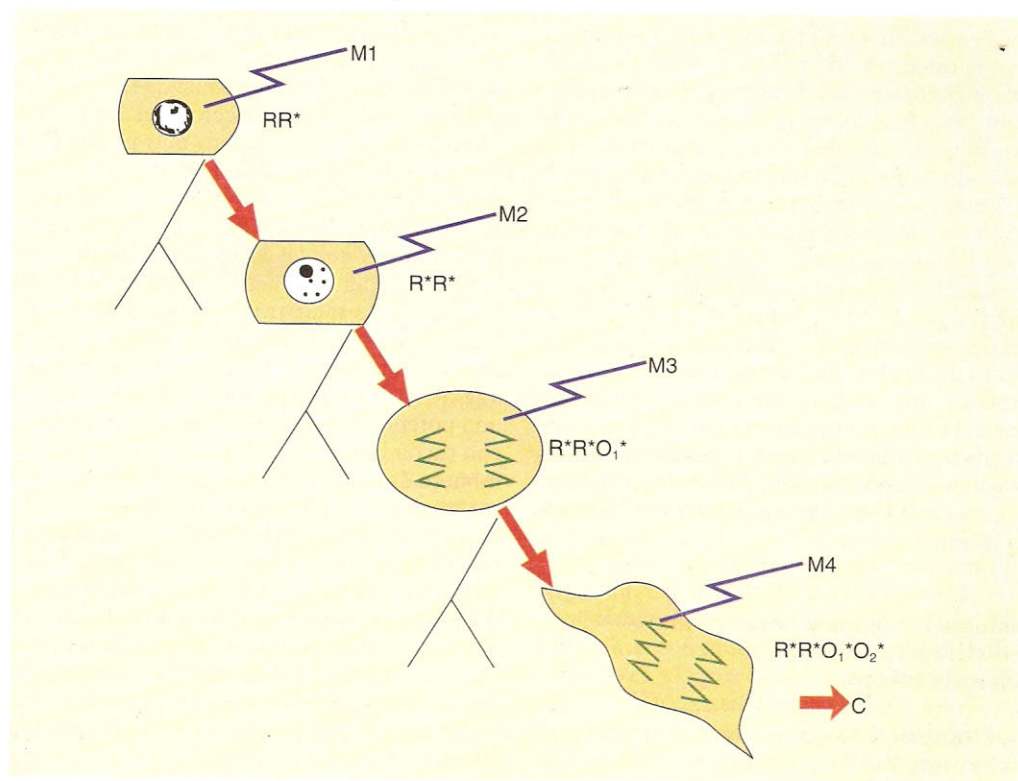
El gen R3FCF es activo en la zona de cartílago en reposo del cartílago metafisario de crecimiento de los huesos largos, y esto explicaría la patogenia de la enfermedad, puesto que al ser el único receptor activo en ese tejido, la mutación lo alteraría en su función de receptor de la señal del FCF. En tejidos embrionarios (tubo neural, esbozos cartilaginosos) también está activo, pero dada la presencia de otros receptores (hay 4 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. Sin embargo, 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.<sup>23</sup>

Estas afecciones, igual que la acondroplasia, muestran un patrón de herencia dominante, y esto sugiere una ganancia de función por parte de la proteína mutante. Dicha ganancia de función en el receptor mutado en la acondroplasia no parece estar asociada con la presencia del ligando; es posible que la mutación del receptor facilite la dimerización u oligomerización de varios receptores por medio de uniones mediadas por la modificación del dominio transmembranoso. Esta oligomerización de los receptores, independiente de la presencia del ligando (FCF),

puede obrar como una activación anormal del receptor, ajena a los mecanismos normales de regulación, y esto explicaría el sellamiento precoz de las zonas de crecimiento de los huesos largos, así como el sellamiento precoz de las suturas craneanas en la acondroplasia y en los otros síndromes. Se trataría, en este modelo, de una activación anómala del receptor, asincrónica e inarmónica con el estado del tejido, que finalmente se osifica a destiempo.

### Naturaleza genética del crecimiento tumoral. Hipótesis de los múltiples impactos mutacionales

Las células tumorales tienen alteraciones en su genoma; esto fue sospechado 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. 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 que determinan las características de disregulación, 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), de tal manera que el tumor se desarrolla y es propio del individuo en el cual ocurren las mutaciones somáticas. Estas mutaciones génicas, que ocurren en células somáticas, no difieren en naturaleza de las mutaciones en células germinales, que dan lugar a enfermedades hereditarias; tanto unas como otras son cambios en el ADN celular, que consisten en transversiones o tran-



**Fig. 13-10.** 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.

siones de bases, delecciones o inserciones de bases, o cambios de mayor extensión (véase cap. 5). En cambio, 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). 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 no se establece ninguna mutación y los cambios quedan limitados a esa célula y mueren con ella. De allí que haya una estrecha relación entre la tasa mitótica de un tejido normal y su capacidad de generar tumores malignos.

Si bien 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 es una única mutación. Tal como fue enunciada,<sup>24</sup> 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 inferiores a dos, en la misma célula. El número total de mutaciones necesario para el establecimiento de un tumor maligno no está determinado, aunque los estudios hechos sobre pacientes a distintas edades sugieren que son necesarias de 4 a 6 mutaciones diferentes.<sup>25</sup> 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 (fig. 13-10). 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. Antes de considerar algunos tumores benignos, es conveniente establecer, en términos generales, cuáles son los tipos de genes cuya mutación es importante en el desarrollo tumoral. En tal sentido, los estudios de los últimos años señalan tres categorías de genes cuyas mutaciones son importantes en muchos tumores: 1) genes promotores de crecimiento u *oncogenes*, 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 en oncogenes generalmente son dominantes, mientras que las mutaciones en genes supresores de tumores son recesivas.

### 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 suponer que el número de mutaciones de 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" (véase más adelante) de la esclerosis tuberosa. La neurofibromatosis 1 (véase su descripción en el cap. 6) es causada por mutaciones dominantes del gen de la neurofibromina; el producto de este gen (neurofibromina) es una proteína activadora de la GTPasa, que regula el oncogén *ras*, por lo cual este gen 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 incidencia 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. Recientemente 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) pero más proximal que la región de la familia de la  $\alpha$ -globina.<sup>26</sup> El segundo gen TSC2 cubre 45 kb y su ADNc, de 5,5 kb, ha sido clonado. Este gen se expresa en fibroblastos y células linfoides, 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 delección que incluye la región de TSC2, es decir que la enfermedad está asociada no sólo con variadas mutaciones, sino con la pérdida total del gen. Se ha investigado la condición de los dos genes TSC2 en tejidos extraídos de hamartomas (los tumores benignos, de tipo adenomatoso, que incluyen la glándula sebácea y otros tejidos) y se ha comprobado la "pérdida de heterocigosidad" en las células del hamartoma, es decir que el gen 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.<sup>26</sup>

### Oncogenes, protooncogenes y oncogenes celulares

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, los retrovirus no requieren, para su replicación dentro de las células, de ninguna actividad oncogénica; sin embargo, dada su necesaria integración con el genoma celular, pueden capturar algunos segmentos genéticos de las células huésped. En los casos en los que los segmentos genéticos capturados por el retrovirus correspondan a ciertos genes reguladores, se produce la creación de un *oncogén viral*, los cuales pueden presentar una función exacerbada por estar bajo el control de un promotor viral, y además, al formar parte del genoma viral, están sujetos a una tasa de mutación mayor



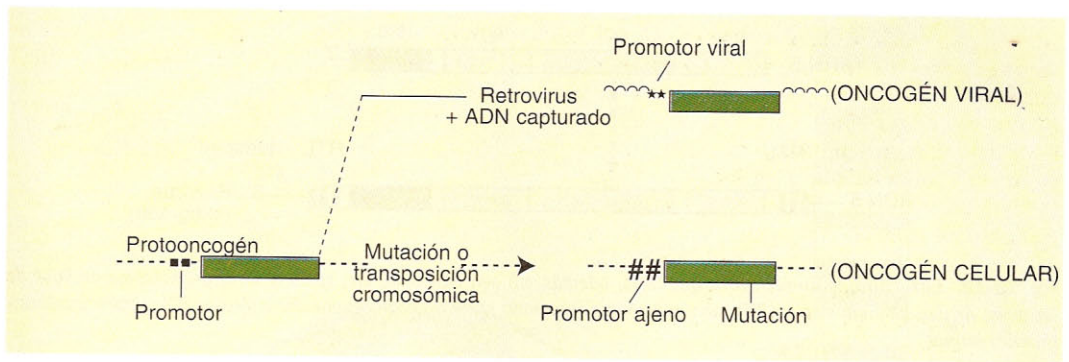


Fig. 13-11. Relación entre protooncogenes, oncogenes virales y celulares.

que la de la célula (véase cap. 5). De esta manera, 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 parciales, 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. 13-11).

Los protooncogenes y sus mutantes, los oncogenes, no han demostrado tener un papel primario en el origen de los tumores malignos; y si bien los oncogenes están presentes en 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, al aumentar la potencialidad de crecimiento de células ya malignizadas por un mecanismo primario, 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 celular con segmentos de ADN agregado o sin ellos.

### Replicación de los retrovirus y su integración al genoma celular

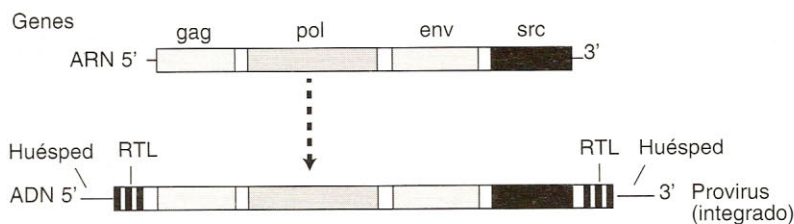
Los retrovirus son virus que contienen ARN y que son capaces de dirigir la síntesis de ADN complementario a su propio genoma de ARN; estos virus comprenden el del sarcoma de Rous de las aves, el virus de la leucosis aviaria y el virus del SIDA, entre otros.

La estructura y la replicación de los retrovirus es característica: todos ellos poseen 3 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. 13-12).

El retrovirus, al entrar al 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 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. 13-12). 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





**Fig. 13-12.** 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.

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.

## 9 Genes supresores de tumores

En los últimos años, 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"), aunque su función principal es regular el ciclo celular normal y, a través de ella, cumplir numerosas funciones indirectas, las cuales han hecho que su estudio adquiriera gran importancia. Los principales genes "supresores de tumores" son el codificante de la *proteína de retinoblastoma pRB*, y el codificante de la *proteína p53*.

## 14 El retinoblastoma

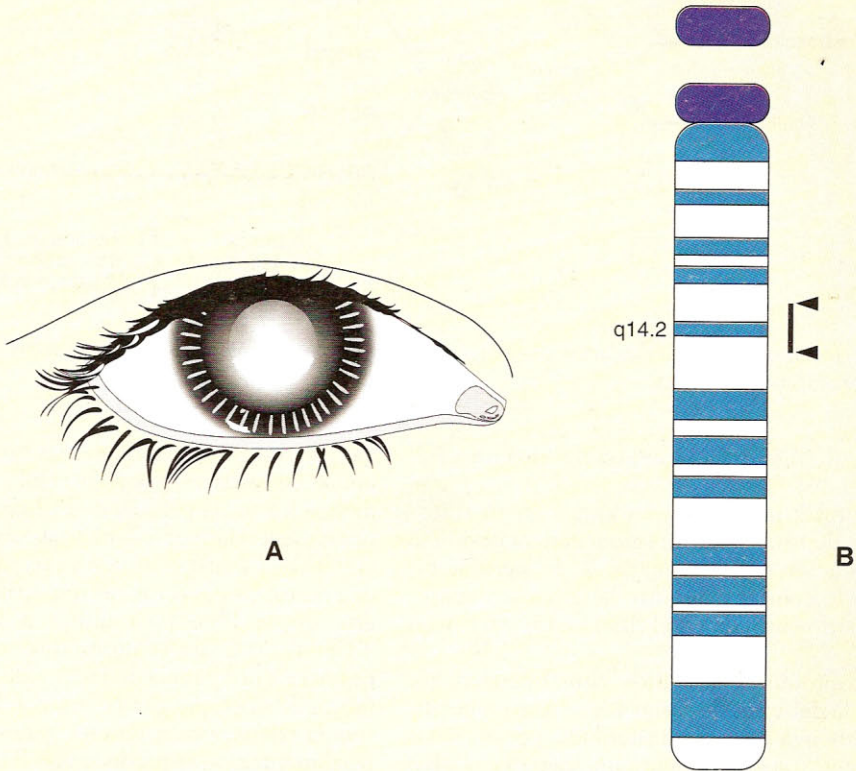
El retinoblastoma es un tumor extremadamente maligno que afecta a niños menores de 3 años de edad y que es curable con radioterapia si se realiza un diagnóstico precoz. Su incidencia es de 1 cada 20.000 nacidos y se ha ido incrementando, debido a los adelantos del diagnóstico precoz que permiten la supervivencia

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 gato", dado por el tumor retiniano inicial; 2) estrabismo sin causa aparente; 3) calcificaciones intratumorales detectables a simple vista 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. 13-13).

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 delección específica de la banda q14.2 del cromosoma 13 (fig. 13-13); en esos pacientes, el retinoblastoma está asociado con el retardo mental y defectos óseos. 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 retinoblastoma (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 preco-



**Fig. 13-13.** **A.** Reflejo blanco “de ojo de gato” en el retinoblastoma. **B.** Cromosoma 13 que indica el segmento deletado con cierta frecuencia en el retinoblastoma, y en donde residen las mutaciones que afectan a otros pacientes con este tumor.

ces 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 dos mutaciones individuales en los dos alelos del gen, y por eso su desarrollo es más tardío y el tumor es único (fig. 13-14).

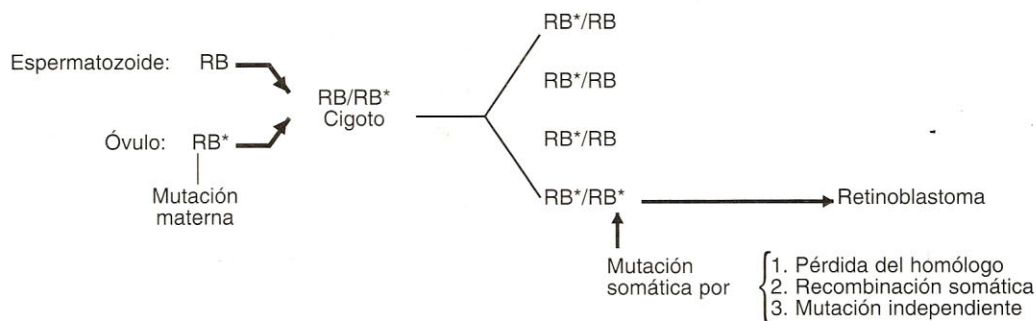
El hecho de que haya varios millones de neuronas retinianas hace que la probabilidad de un “segundo impacto” o mutación durante la época posnatal de desarrollo de la retina, para el portador de un gen anormal paterno, sea muy alta y, por consiguiente, la probabilidad de desarrollo del tumor en el hijo de un portador del

gen alterado también es muy alta, con lo cual la 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 4 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





**Fig. 13-14.** Desarrollo del retinoblastoma hereditario de acuerdo con la hipótesis de las dos mutaciones del gen *RB*. El asterisco señala el gen mutado.

unión al ADN y a la quinasa de tirosinas *cAbl* (fig. 13-15).<sup>27</sup>

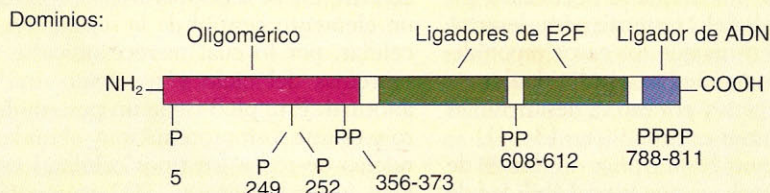
La pRB puede encontrarse con distintos grados de fosforilación: se encuentra con baja fosforilación en los primeros  $2/3$  del período  $G_1$  del ciclo celular y durante la mitosis, y aparece hiperfosforilada en el final de  $G_1$ , en S y en  $G_2$ .<sup>28</sup>

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).

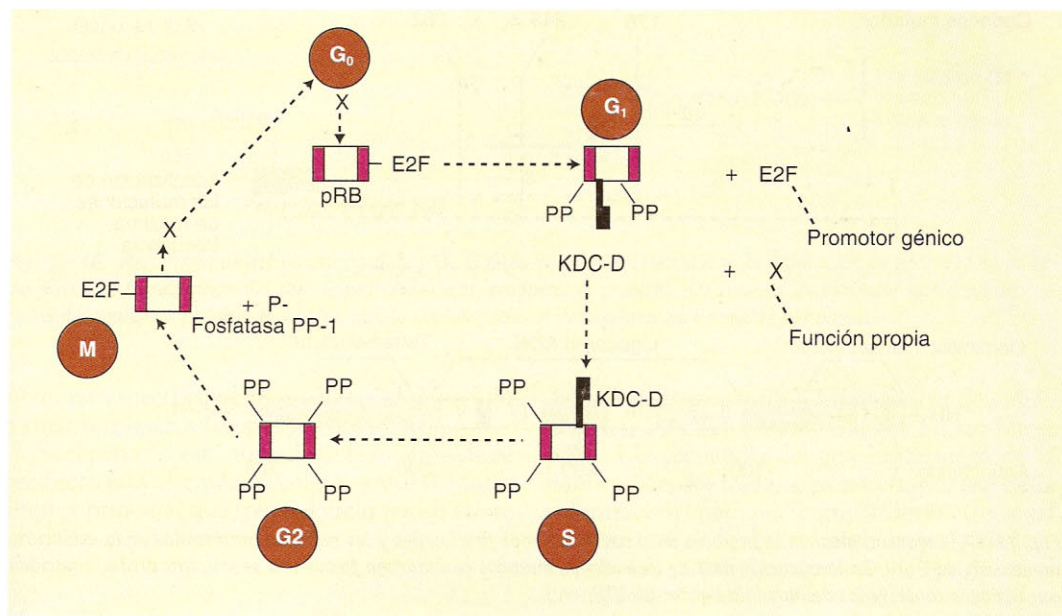
La fosforilación de la pRB que ocurre en la segunda mitad de G<sub>1</sub> le hace perder la capacidad de unirse con otras proteínas: las oncoproteínas, el factor de transcripción E2F, cAbl y otras. Además, esta fosforilación coincide con el momento del "punto de restricción" del período G<sub>1</sub> 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.

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 TTTTCGCGC 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. 13-16). 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.<sup>28</sup>

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, posiblemente modulable en diferentes tejidos.



**Fig. 13-15.** Proteína pRB y sus dominios. Los sitios de fosforilación por las quinasas dependientes de ciclinas se señalan con P y el n° del aminoácido.



**Fig. 13-16.** 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; G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, S y M: etapas del ciclo. La fosforilación de la pRB se representa por el número de radicales -P unidos.

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.

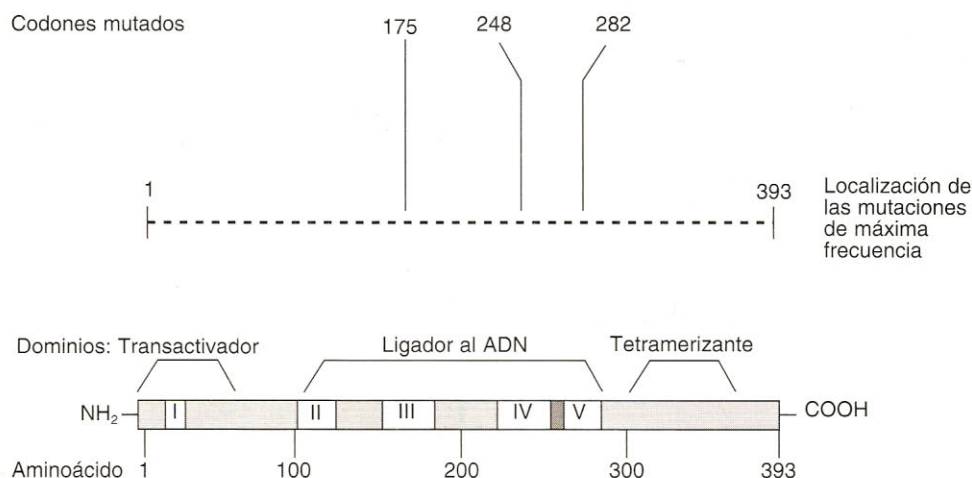
### La proteína p53 y su papel supresor del desarrollo tumoral

La proteína p53 es un factor de transcripción, altamente conservado en el curso de la evolución biológica, producto de un gen localizado 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.<sup>29</sup>

La región del cromosoma 17, que contiene el gen de la p53, 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 p53 en tumores específicos, por lo cual es de interés el conocimiento de las funciones específicas de cada región de la proteína p53. Recientemente, esta proteína ha podido ser estudiada en su forma espacial, lo cual ha revelado ciertas características de las mutaciones que se producen en ella.<sup>30</sup> La casi totalidad de las mutaciones de p53 recaen sobre los dominios centrales ligadores de oncoproteínas y también ligadores al ADN normal (fig. 13-17). La proteína p53 forma oligómeros en condiciones normales, es sumamente inestable (tiene una vida media de sólo 20-35 minu-





**Fig. 13-17.** Esquema lineal de la proteína p53, sus 3 dominios funcionales y las regiones conservadas en la evolución, numeradas de I a V. La localización de 3 de los codones mutados con máxima frecuencia se muestra arriba; coinciden con regiones conservadas del dominio ligador al ADN.

tos) y presenta 5 regiones conservadas con el transcurrir de la evolución biológica (en numerosos organismos) y 3 dominios funcionales: el de transactivación, el ligador al ADN y el de tetramerización.

### Función normal de la proteína p53: interruptora del ciclo celular

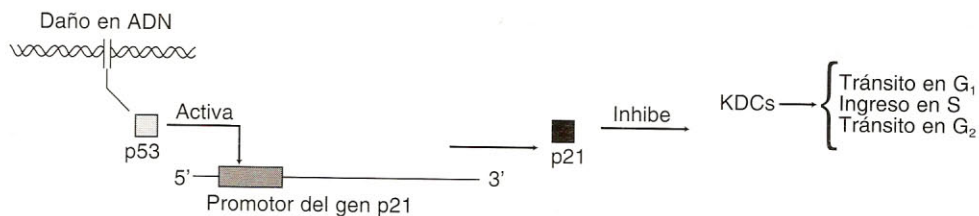
La proteína p53 existe en muy bajas concentraciones en los núcleos de células normales, pero su concentración aumenta notoriamente ante una serie de "estímulos": radiación ultravioleta, radiación X, infección viral y agentes químicos radiomiméticos; es decir, todos factores que dañan el ADN, agentes 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 enzimas de restricción y agentes similares también estimulan su producción.<sup>31</sup>

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. 5), 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: G<sub>1</sub>, S o G<sub>2</sub>-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 (ver más adelante). Otro interrogante es: ¿qué destino tiene una célula cuyo ciclo es interrumpido por la p53? La misma proteína p53 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.<sup>31</sup>

Lo mencionado con anterioridad se corrobora con el hecho de que los ratones con la anulación homocigótica (total) del gen p53 pueden desarrollarse totalmente, 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,



**Fig. 13-18.** 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 (KDCs), con lo cual se frena el ciclo celular en varios de sus pasos.

2) unirse específicamente a otras proteínas, y 3) formar tetrámeros (de p53).

Si el gen p53 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. 13-18).

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.<sup>31</sup> De esta manera, p53 cumple su papel de guardián, tanto en forma inmediata como mediata.

### Otros genes represores de tumores. El gen BRCA1 y el gen FCC

En octubre de 1994, Scolnick y colaboradores 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 y parece no estar asociado con el desarrollo del tumor en los casos no familiares, que constituyen el 95% del total. Su mecanismo es similar al de otros factores de transcripción.

En mayo de 1993, fue identificado un gen localizado en el cromosoma 2, el gen de susceptibilidad al cáncer de colon familiar (FCC), cuya mutación parece inducir la alta susceptibilidad a este tumor de incidencia familiar mediante un mecanismo diferente del de otros genes supresores, ya 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.

### 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 genético) 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 *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 PAX 3 está alterado en el síndrome de Waardenburg (sordera, defectos de pigmentación y óseos), atribuido a la falta de regulación del gen PAX 3 sobre genes "blanco". El gen PAX 6 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 FGF-4; en el eje antero-posterior, el producto del gen "erizo sónico" SHH, y en el eje dorso-ventral, el producto del gen Wnt7a, que es una glucoproteína segregada.

El gen FGF-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 formación de los dedos. La acondroplasia es causada por una mutación única de carácter dominante en el gen del receptor 3 para el factor de crecimiento fibroblástico R3FGF. El producto del gen R3FGF tiene 5 dominios: 3 exocelulares de tipo Ig, uno intracitoplasmático con actividad de tirosinquinasa, y el transmembranoso, donde ocurre la mutación G380R de la acondroplasia.

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, nunca menos de 2 y usualmente entre 4 y 6. 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 exclusivamente 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 sin ellos. Los protooncogenes dan lugar a oncogenes virales cuando son capturados por el genoma de un retrovirus y puestos bajo control de promotores virales, y 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, 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 4 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 p53 está alterado en las células de más del 50% de los tumores malignos. La proteína p53 actúa como factor de transcripción activando el gen 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.

## REFERENCIAS

- Lewin B. Genes V. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- 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.
- Mullins MC, Nüsslein-Volhard C. Mutational approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. *Current Opin Genetics and Develop* 1993; 3:648-654.
- Gurdon JB. The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 1992; 68:185-199.
- Afzelius BA. Genetic disorders of cilia. En: Schweiger HG (ed.) *International Cell Biology 1980-1981* Berlin: Springer Verlag, 1981: 440-447.
- 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.
- Shimeld SM. Retinoic acid, HOX genes and the anterior-posterior axis in chordates. *BioEssays* 1996; 18:613-616.
- Conlon RA. Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends in Genet* 1995; 11:314-319.
- Acampora D, D'Esposito M, Faiella A, Pannese M, Migliaccio E, Morelli F, Stomaiulo A, Nigro V, Simeone A, Boncinelli E. The human HOX gene family. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:10385.
- Krumlauf R. Mouse Hox genetic functions. *Current Opin Genet Develop* 1993; 3:621-625.
- Bronner-Fraser M. Segregation of cell lineage in the neural crest. *Current Opin Genet Develop* 1993; 3:641-647.
- Noll N. Evolution and role of *Pax* genes. *Current Opin Genet Develop* 1993; 3:595-605.
- Lalwani AK, Brister JR, Fex J, Grundfast KM, Ploplis B, San Agustín TB, Wilcox ER. 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.
- Pierpoint JW, Erikson RP. Invited editorial: Facts on PAX. *Am J Hum Genet* 1993; 52:451-454.
- Hanson I, Van Heyningen V. Pax6: more then meets the eye. *Trends in Genet* 1995; 11:268-272.
- Roberts DJ, Tasbin C. The genetics of human limb development. *Am J Hum Genet* 1995; 55:1-6.
- Morgan BA, Tabin CJ. The role of homeobox genes in limb development. *Current Opin Genet Develop* 1993; 3:668-674.
- Tickle C. Vertebrate limb development. *Current Opin Genet Develop* 1995; 5:478-484.
- 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.
- Rijli FM, Chambon P. Genetic interactions of Hox genes in limb development: learning from compound mutants. *Current Op Genet Dev* 1997; 7:481-487.
- Velinov M, Slauchaupt SA, Stoilov I, Scott CI, Gussella JF, Tsipouras P. The gene for achondroplasia maps to the telomeric region of chromosome 4p. *Nature Genet* 1994; 6:312-317.
- Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI, Hecht JT, Horton WA, Machado M, Kaitila I, McIntosh I, Francomano CA. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Amer J Hum Genet* 1995; 56:368-373.
- Wilkie AOM, Morris-Kay GM, Jones EY, Heath JK. Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Current Biol* 1995; 5:500-507.
- Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68:1590-1594.
- Dix D. The role of age in cancer incidence: an epidemiological study. *J Gerontol* 1989; 44:10-18.
- Sampson JR, Harris PC. The molecular genetics of tuberous sclerosis. *Human Mol Genet* 1994; 3:1477-1480.
- Hollingsworth RE, Hensley CE, Lee W-H. Retinoblastoma protein and the cell cycle. *Current Opin Genet Develop* 1993; 3:55-62.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81:323-330.
- 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.
- 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.
- 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.



## 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. Síndrome del X frágil.***

### Introducción

El material genético nuclear, descrito en el capítulo 3 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).<sup>1</sup> En 1959, se describió la primera anomalía cromosómica humana, la trisomía del cromosoma 21 en el síndrome de Down,<sup>2</sup> y a partir de allí se constituyó en un campo propio de estudio dentro de la Genética Médica, especialmente mediante el uso de técnicas de bandedo 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,<sup>3</sup> 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  $\mu\text{m}$ , y la del menor (el número 21) es de casi 2  $\mu\text{m}$ . 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 currículum 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% 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.<sup>4</sup> Se puede usar sangre venosa entera (1 mL o menos) con 0,1 mL de solución de heparina (500 U.I.), 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 1 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 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 las 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 prometafase, con cromosomas más elongados, el número de bandas visibles puede llegar a sobrepasar las mil (este patrón de bandas es llamado "de alta resolución"). Las diferencias entre el primer patrón y el segundo consisten en el desdoblamiento de bandas metafásicas en subbandas 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



co al bandeo 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 bandeo Q y el bandeo G producen bandas que están relacionadas con la composición predominante de bases en el ADN de las regiones bandeadas. Las bandas oscuras del bandeo G y las brillantes (fluorescentes) del bandeo 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 G-C, como la cromomicina A3, dan un patrón de bandeo fluorescente inverso al bandeo Q y al G.

Además de poseer riqueza en el par A-T, las bandas oscuras del bandeo 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 bandeo adquiere 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.<sup>5</sup> 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. 3) y se caracterizan por unirse a proteínas no histónicas del llamado "armazón cromosómico", rico en la enzima topoisomerasa II.<sup>5</sup> 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 precozmente.

## Otros tipos de bandeo: bandeo C, bandeo R y bandas N

El bandeo C (de constitutivo) tiñe exclusivamente la heterocromatina constitutiva, compuesta por ADN de tipo satélite, muy repetido (véase cap. 3). Por consiguiente, difiere completamente del bandeo 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 bandeo 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 bandeo es indicado para la búsqueda de polimorfismos de heterocromatina.

El bandeo R es simplemente el inverso del bandeo clásico (G o Q); las bandas claras de un tipo de bandeo son oscuras en el otro tipo. Se usa la cromomicina A3 y las bandas fluorescentes son las ricas en C-G.

El bandeo 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 bandeo clásico, ya que se basa en la presencia de proteínas argentafines en esas regiones; se tiñe con nitrato de plata.

Los diferentes bandeos 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 (HISYF = FISH)

La técnica HISYF 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 microscopía, que ha reemplazado a la técnica



ca 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. 3) 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. 2) 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.

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 presencia de un gen determinado o de un oncogén en las células de una biopsia efectuada varios años atrás.<sup>6</sup> En estos casos, para mejorar la detección, puede combinarse la HISYF con la aplicación *in situ* de la reacción en cadena de la polimerasa (véase panel 14-1).

### 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. 2) realizada en el portaobjetos con las células fijadas (Síntesis *In Situ* mediante Primeros, 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.<sup>8</sup>

### El cariotipo humano. Clasificación de SINCH (= ISCN)

Se ha establecido un "Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana" (SINCH = ISCN en inglés),<sup>9</sup> 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 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. 14-1):

Grupo A: cromosomas 1-3. Son grandes y metacéntricos (1 y 3) o submetacéntricos (2).



### Panel 14-1. 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).<sup>7</sup> De ahí se deduce que la HISYF debe practicarse en condiciones cuidadosamente estandarizadas (véase hibridación, cap. 3).

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. 2). 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.

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 NORs, 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 NORs, 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 re-



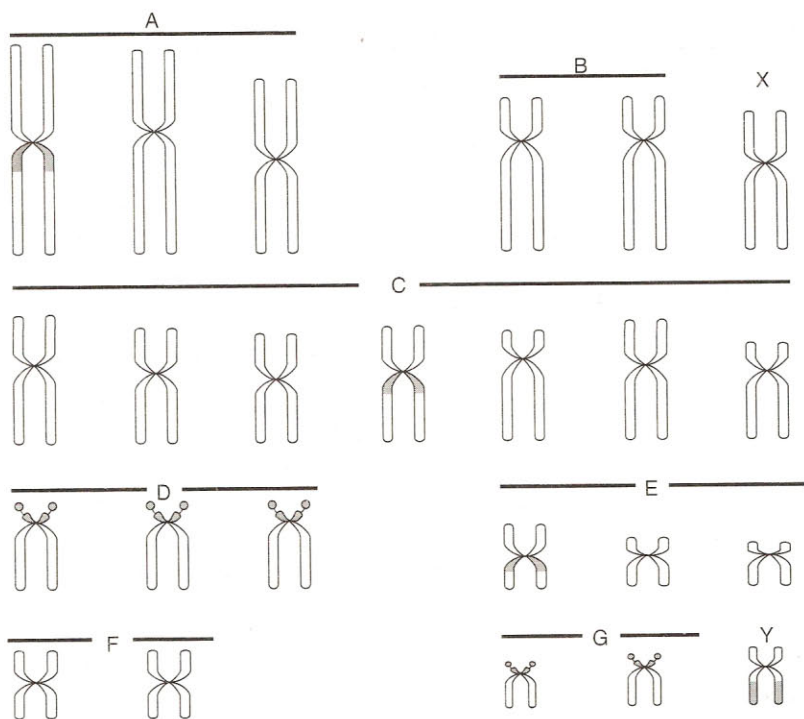


Fig. 14-1. Esquema de los grupos del cariotipo humano, que muestra sus características básicas, sin bandeado.

gión más distal. Así, 1p11, 1p12 y 1p13 son las tres primeras bandas del brazo corto del cromosoma 1 humano. Para designar a 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,(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



Cuadro 14-1. Clasificación de las cromosomopatías

I. ALTERACIONES NUMÉRICAS	A. Del conjunto	
	1. Poliploidia	1a: Triploidia 1b: Tetraploidia 1c: Mosaicos con componente poliploide
	2. Parentales	2a: Diandria 2b: Diginia
B. Parciales, autosómicas (aneuploidias 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)
	2. Monosomías	(Letales)
	3. Mosaicos aneuploides	3a: 1 47/46, +21
C. Parciales, sexuales (aneuploidias sexuales)	1. Trisomías sexuales	1a: XXY (síndrome de Klinefelter) 1b: XXX (triple X o trisomía del X) 1c: YYY (síndrome YYY)
	2. Monosomías sexuales	2a: XO (síndrome de Turner)
	3. Polisomías sexuales	3a: XXXY (variante del síndrome de Klinefelter) 3b: XXXXY 3c: XXXX (tetrasomía del X) 4a: XXY/XY; XXXY/XY 4b: XO/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	

son los efectos en el fenotipo (la excepción son los cromosomas sexuales: el X, por la compensación de dosis, explicada en el cap. 8, 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 14-1).

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 *poliploidia*, 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 *aneuploidia*. Así, uno o más cromosomas excedentes, o uno o más cromosomas faltantes, son casos de aneuploidia. 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 poliploidias humanas son letales tempranas, aunque algunos casos raros 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 ma-

dre, 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 son más difíciles de reconocer que las numéricas y en general permanecieron poco definidas hasta la apari-

ción de métodos sofisticados de bandeo. Los principales tipos de aberraciones estructurales se definen a continuación (fig. 14-2).

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 bandeos 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. 8). 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 consi-

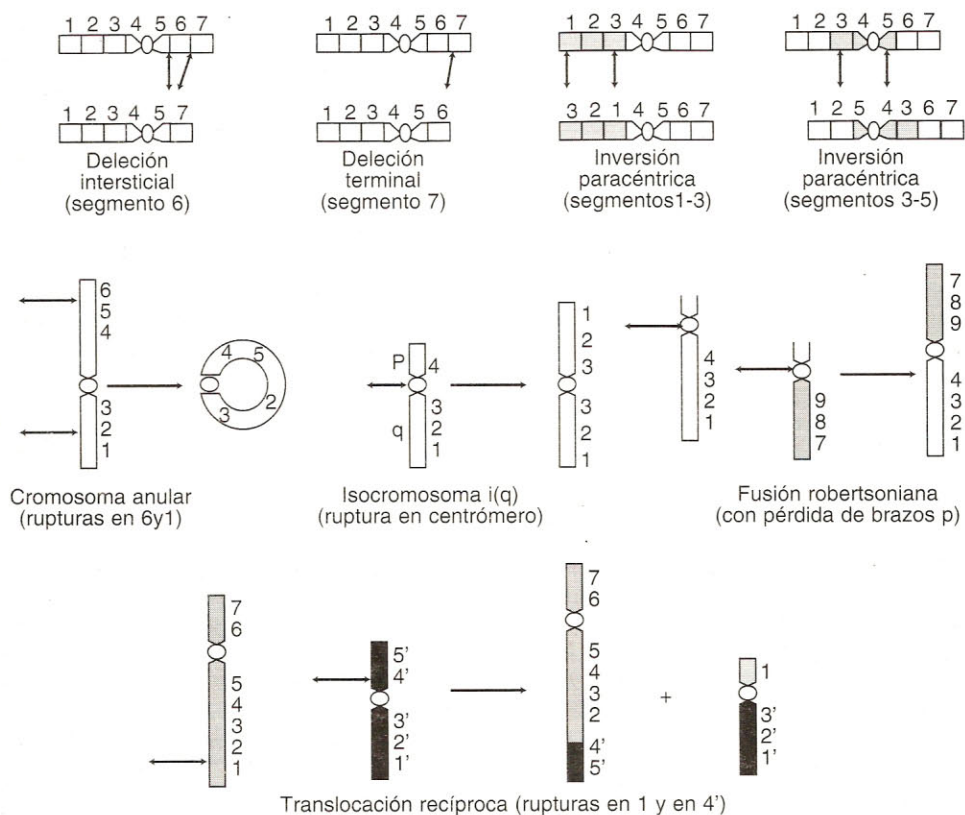


Fig. 14-2. Esquema de las alteraciones estructurales de los cromosomas. Las dobles flechas simbolizan rupturas en el cromosoma.



dera 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 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, 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 (heterocigotos) muestran efectos de ellas en su re-

producción (abortos) y en ciertas ocasiones los portadores varones son estériles.

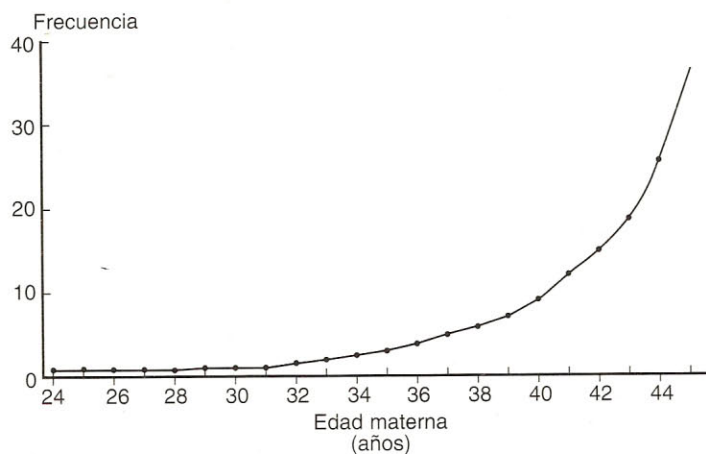
Las *translocaciones recíprocas* constituyen el intercambio de segmentos entre dos cromosomas y dan por resultado dos cromosomas *derivados*, que generalmente tienen una forma diferente de la de los dos cromosomas originales. Una translocación recíproca es, en principio, *balanceada*, porque cuando se 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, ya que su incidencia es de 1 cada 700 nacidos vivos en todas las razas, 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 colaboradores en 1959.<sup>10</sup> El 95% de los pacientes con este síndrome tiene una trisomía del cromosoma 21, y el 5% restante 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. 14-3) se mantiene lineal hasta

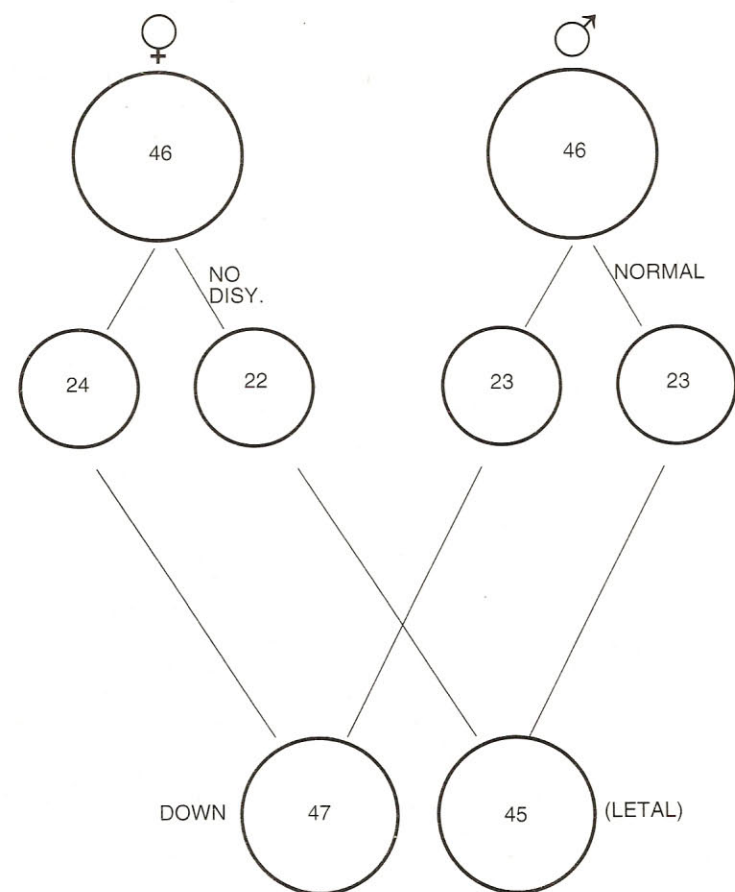
# SÍNDROME DE DOWN Y EDAD MATERNA Frecuencia por 1.000 nacidos



**Fig. 14-3.** Gráfica de la frecuencia de nacimientos con síndrome de Down en relación con la edad materna al dar a luz.

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.



**Fig. 14-4.** Origen de la trisomía 21 por no-disyunción materna en la primera división meiótica (la causa más frecuente).



**Cuadro 14-2.** 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%	—	—	—

\* De Buyse<sup>11</sup>

\*\* Portadores de translocación balanceada, sin fenotipo anormal.

14-4) (véase cap. 9). 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 espermatoцитos 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 espermatoцитos. Si bien la mayoría de las trisomías 21 suceden a causa de una no-disyunción materna, una minoría (20%) se debe a una no-disyunción en el padre (véase cap. 9).

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, 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 mosaïcismo, cuyo pronóstico es más benigno. El mosaïcismo por lo común consiste en una línea celular con trisomía y una línea diploide normal, es decir, es 47,XY,+21/46,XY.

### 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 14-2).

Las translocaciones observadas en el síndrome de Down involucran casi siempre cromosomas acrocéntricos; dos cromosomas acrocéntricos sufren rupturas cerca del centrómero y se re-

componen 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. 14-5).

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. 14-6), 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. 14-6).

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. 14-7). Éste es uno de los pocos casos de riesgo total en las enfermedades genéticas.



**Fig. 14-5.** Esquema de la formación de un cromosoma con translocación que podría producir síndrome de Down. R: rupturas.

## Fenotipo en el síndrome de Down

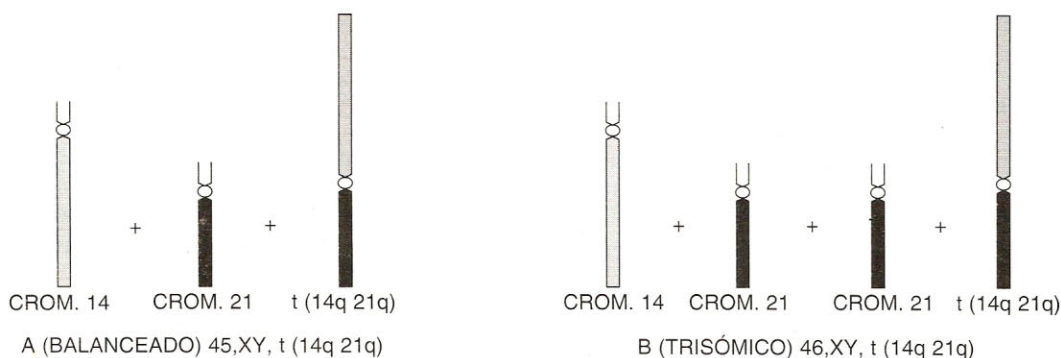
Estos pacientes presentan un cuadro con distintas anomalías que abarcan varios órganos y sistemas, como cabe esperar en un desequilibrio que afecta a numerosos genes.

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 man-

chas de Brushfield, que son manchitas blancas situadas en forma concéntrica en el tercio más interno del iris (no se observan en ojos oscuros; fig. 14-8).

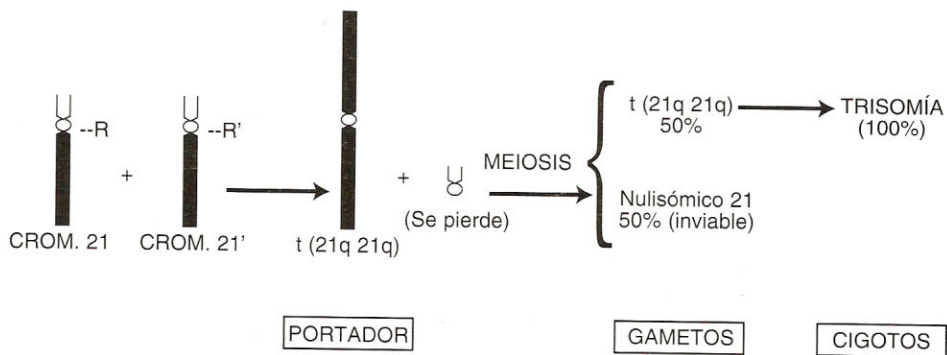
El retraso mental es el signo mayor en el síndrome de Down. Por lo común, los adultos tienen un coeficiente intelectual (CI) de 25 a 50, pero se considera que el nivel alcanzable puede variar de acuerdo con los estímulos que recibe de sus familiares y de su entorno. El CI varía durante la infancia, para obtener su máximo relativo al normal, entre los 3 y los 4 años de edad, luego de lo cual declina más o menos uniformemente (fig. 14-9). 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



**Fig. 14-6.** Diferencia entre el portador de una translocación balanceada (A) y su hijo, trisómico por transmisión del cromosoma translocado.





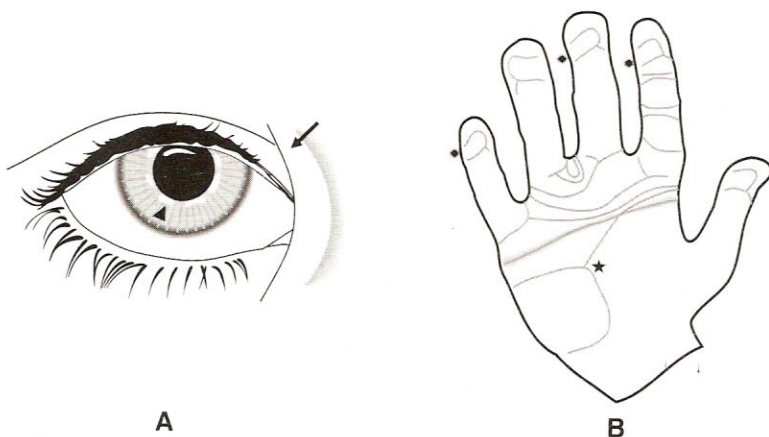
**Fig. 14-7.** Esquema de la formación de una translocación  $t(21q\ 21q)$  y el riesgo del 100% de producir un síndrome de Down por parte del portador de la translocación. R: rupturas.

fallecimiento de muchos en los primeros años, de modo que los mayores de 5 años tienen expectativas de vida razonablemente largas (50 años). Los peligros secundarios que amenazan a los niños mayores y a los adultos son el fácil 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.

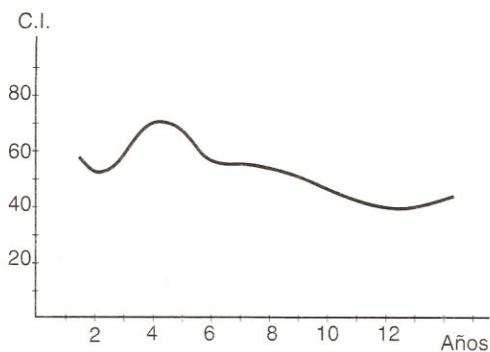
La fertilidad de los pacientes es totalmente diferente en los dos sexos: mientras que en el varón con síndrome de Down la espermatogénesis se bloquea en la etapa meiótica y son estériles, las mujeres son fértiles. La descendencia de una paciente con síndrome de Down se ajusta a las predicciones teóricas, puesto que alrededor del 50% de sus hijos son normales y el otro 50% es trisómico por transmisión de un cromosoma 21 excedente.

### 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 síndrome de Down; éste se halla caracterizado por la trisomía de la región que incluye las bandas q22.1, q22.2 y q22.3. Entre los genes conocidos localizados en esta región, están el gen *Gart*, el SOD-1, el *Ets-2*, el PFKL, el de la proteína  $\alpha$ -A del cristalino y el de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloides. El gen *Gart* codifica la enzima sintetasa de fosforribosil-glicinamida, que interviene en el anabolismo de las purinas; por esto se ha sugerido que su presencia por triplicado está vinculada al nivel excesivo de purinas en el síndrome de Down, que por sí solo puede ser nocivo para las funciones del sistema



**Fig. 14-8.** A. Ojos en el síndrome de Down. Pliegue epicanático (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.



**Fig. 14-9.** Cambios del coeficiente intelectual de acuerdo con la edad en el síndrome de Down.<sup>12</sup>

nervioso.<sup>13</sup> El gen SOD-1 codifica una enzima, la superóxido dismutasa, que interviene en el sistema de protección de la célula contra la acción tóxica de radicales libres que contienen oxígeno, pero se desconoce la regulación de su función. Por último, el gen de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide, localizado también en esta región, probablemente está involucrado en el depósito precoz de amiloide en el sistema nervioso de los pacientes.

### Trisomía del cromosoma 18 (síndrome de Edwards)

Esta trisomía es aproximadamente diez veces menos frecuente que el síndrome de Down, ya que su frecuencia es de 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) 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 2<sup>do</sup> y el 5<sup>to</sup> dedos superpuestos a los vecinos, sindactilia, dislocación de la cadera, malformaciones del pabellón de la oreja, hipoplasia del mentón (microgafia), eventración o hernias abdominales, criptorquidia o hipoplasia de los labios mayores, casi constantemente, malformaciones cardiovasculares (defectos en los tabiques) y gastrointestinales (divertículo de Meckel, estenosis pilórica). Los patrones de dermatoglosos 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.

### 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 microftalmía, 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 (ageneia de los bulbos olfatorios y del cuerpo calloso, hipoplasia cerebelosa); los patrones de dermatoglosos 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.

### 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 anomalía 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 esfinje (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,



**Cuadro 14-3.** *Cariotipos en el síndrome de Turner y sus frecuencias\**

Cariotipo	Categoría de la anomalía	Frecuencia
45,X	Númerica (monosomía libre)	55%
46,XX/45,X	Númerica (mosaicismo +/-monosómico)	
47,XXX/45,X	Númerica (mosaicismo trisómico/monosómico)	10% (todos los mosaicismos)
47,XXX/46,XX/45,X	Númerica (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	Númerica 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.<sup>12</sup>

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 14-3).<sup>12</sup>

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. 9). Éste no es el único aspecto atípico de esta 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 XO es fértil.<sup>14</sup>

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, sobre todo antes del tercer mes del embarazo, por lo cual este síndrome puede ser considerado como letal relativo. La incidencia de este síndrome en recién nacidos es de 1 en 5.000 nacimientos; 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 posible que la letalidad relativa de la monosomía libre del X sea 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 in-

trauterina 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.

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.<sup>15</sup> 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.

### Fenotipo en el síndrome de Turner. Genes "anti-Turner" y patogenicia

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 46,XY del (Yp-Yter). En el cuadro general de las pa-

cientes 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 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 definitiva.

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. 8). Por otra parte, la explicación de los estigmas somáticos turnerianos requiere factores o genes "anti-Turner" presentes en el segundo cromosoma X o en el cromosoma Y normal. Se ha sugerido que estos genes abarcan dos categorías, ambas caracterizadas por actuar en dosis doble en los sujetos normales: a) los genes integrantes de la región pseudoautosómica, presentes tanto en el extremo de Xp como en el extremo de Yp (véase cap. 7), 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. 8). Estos genes, tales como el par RPS4X-RPS4Y (que codifica la proteína ribosómica S4), al estar en estado monosómico en el síndrome de Turner, podrían afectar los rasgos o "estigmas" somáticos.<sup>16,17</sup>

El fenotipo de los pacientes con isocromosoma Xp y de los que tienen delección 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 citada. Por otra parte, los casos en los que hay mosaicismo con una línea celular normal se caracterizan por un cuadro más atenuado, mientras que los casos en los cuales hay mosaicismo patente de una línea celular con el cromosoma Y o aquellos casos que presentan un fragmento del cromosoma Y, corren el riesgo de desarrollar un gonadoblastoma.

### Síndrome de Klinefelter. Polisomías del cromosoma X con presencia del Y

El síndrome de Klinefelter, como el de Turner, fue descrito antes del desarrollo de la Citogenética Humana y consiste clínicamente en la asociación de microorquidismo (testículos pequeños), esterilidad con azoospermia, gonadotrofinas séricas elevadas, ginecomastia y apariencia 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 (cuadro 14-4).

La incidencia de este síndrome es de aproximadamente 1 cada 1.000 nacidos vivos; 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. Si bien la detección mediante el examen de cromatina sexual es fácil, la mayor parte son diagnosticados en la época pospuberal. La incidencia del tipo más frecuente, 47,XXY, está relacionada con la edad materna, aunque no en forma tan pronunciada como en otras trisomías. El origen de esta anomalía se divide en partes aproximadamente iguales entre no-disyunción materna (correlacionada con la edad de la madre) y no-disyunción paterna (sin correlación estrecha con la edad paterna).<sup>18</sup>

La incidencia de este síndrome se eleva de manera considerable entre los varones infértiles (1 en 50) y sobre todo en los azoospermicos (12 al 20%). Los pacientes con polisomías más numerosas son más raros (en total un 5% de los afectados por el síndrome). En realidad, 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 radioul-



**Cuadro 14-4.** *Cariotipos observados en el síndrome de Klinefelter y sus frecuencias*

Cariotipo	Categoría de la anomalía	C. de Barr*	Frecuencia
47,XXY	Númerica	1	80%
48,XXXXY	Númerica (polisomía sexual con crom. Y)	2	
49,XXXXXY	Númerica (polisomía sexual con crom. Y)	3	5% (en conjunto, las polisomías con Y)
48,XXYY	Númerica (polisomía sexual con crom. Y)	1	
47,XXY/46,XY y otros	Númerica (mosaicismos)	Variable (0, 1 o >)	15% (total de mosaicismos)

\* N° de corpúsculos de Barr por núcleo.

nar y otras), cardiovasculares y faciales (tipo mongoloide) con una disminución marcada en el recuento de crestas dérmicas en los dermatoglifos.

### Fenotipo y patogenia

El signo fundamental es el microorquidismo; la longitud 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. Como consecuencia de la atrofia y la fibrosis, 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 totalmente hacia la pubertad. Sólo algunos pacientes presentan algún grado de espermatogénesis; en ellos se ha comprobado mosaicismo, con una línea celular 46,XY, que probablemente provee las células germinales remanentes. El mecanismo molecular del daño celular no se conoce. Dos signos adicionales, de tipo cuantitativo, son más variables y difíciles de delimitar: hay un cierto grado de disminución del coeficiente intelectual, que se manifiesta por dificultades escolares y psicológicas, y en segundo lugar, hay un ligero aumento de la estatura. Estos signos cuantitativos y otros como las alteraciones en los dermatoglifos se exageran notablemente cuando el número de cromosomas X aumenta.

### Condición XYY de los varones

La condición de trisomía sexual con 47,XXY 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 a 20% (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,XXY detectadas al nacer que, en términos generales, permitieron descartar la hipótesis de la "criminalidad genética", adjudicable a un uso deficiente de la estadística.<sup>19</sup>

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 corre-

lación 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 espermatoцитos 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".

### 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 incidencia del cariotipo 47,XXX es de aproximadamente 1 en 1.000, y mucho más raramente se observan la tetrasomía y la pentasomía del cromosoma X, cuyos cuadros somáticos son similares a los de los XXXXY.

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. La fertilidad no está afectada y la transmisión de un cromosoma adicional es improbable.

### Anomalías estructurales

Las anomalías estructurales de los cromosomas humanos son numerosas y variadas, aunque su incidencia es baja, salvo las translocaciones robertsonianas balanceadas y las inversiones pericéntricas, que por lo general son consideradas como polimorfismos.

Una de las anomalías estructurales que está bien caracterizada es el síndrome del "maullido de gato" asociado a la delección 5p-, que tiene una incidencia de 1 en 50.000 nacimientos. En un 80% de los casos existe una delección que

ocupa la parte terminal del brazo corto del cromosoma 5 y puede ser de variable extensión. En otros casos existe un cromosoma 5 anular o una translocación no balanceada con pérdida de 5p. El fenotipo alterado es atribuido al estado monosómico de esta región cromosómica. En el fenotipo se aprecian un profundo retardo mental y un grito parecido al maullido de un gato, presente desde el nacimiento, relacionado con la hipoplasia de la laringe. Hay variadas malformaciones esqueléticas, un aspecto particular de la cara, con abertura palpebral "antimongólica" (inclinada hacia afuera y abajo), subdesarrollo del mentón, microcefalia y escaso desarrollo en general. La supervivencia es considerable cuando no hay malformaciones viscerales graves.

### Sitios frágiles: de las cromosomopatías a las mutaciones por expansión de repeticiones

Una anomalía estructural que dio la pista para el descubrimiento de un nuevo tipo de mutaciones es la de los "sitios frágiles" en los cromosomas y, en especial, el "sitio frágil" sensible a folatos ubicado en la banda del brazo largo del cromosoma X, Xq27.3. Este sitio frágil caracteriza al *síndrome del X frágil*, un síndrome de retardo mental importante, causado por un nuevo tipo de mutación, la *expansión de repeticiones de trinucleótidos*. Esta clase de mutación ya ha sido mencionada en el capítulo 5 y al describir la enfermedad de Huntington (véase cap. 6). Primero se describirá el sitio frágil.

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 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. 14-10).

El primer sitio frágil del cromosoma X, denominado FRAXA (FRÁgil X, A), se encontró en células de pacientes con retraso mental profun-



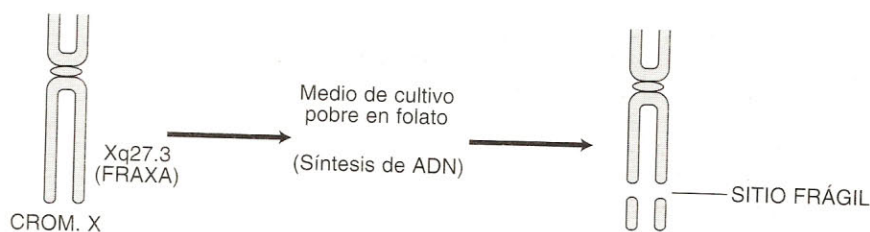


Fig. 14-10. Esquema de la expresión del sitio frágil del cromosoma X, FRAXA.

do y se ha constituido en una expresión citológica del "síndrome del X frágil". Con posterioridad se encontraron otros dos sitios frágiles en el cromosoma X, los llamados FRAXE (asociado con leve retardo mental) y FRAXF, sin fenotipo alterado.<sup>20</sup> El sitio original FRAXA se corresponde con un gen, el *FMR-1* (Frágil-X, Retraso Mental, 1).

### Fenotipo del síndrome del X frágil

Este síndrome ocurre tanto en varones como en mujeres (con ciertas diferencias); la incidencia es 1 cada 1.200 varones recién nacidos y de 1 cada 2.500 mujeres. 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 el varón. Las características fenotípicas son profundo retraso mental, aumento del volumen testicular (macroorquidismo), particularidades faciales y del tejido conectivo. A menudo el rostro es alargado, por disminución de la distancia intercigomática y el mentón prominente. El volumen testicular es mayor de 30 mL. Por lo general, hay laxitud ligamentosa y pecho excavado. El diagnóstico definitivo se hacía citológicamente por la expresión del sitio frágil, pero en la actualidad se detecta de manera directa el defecto en el ADN (amplificación de repeticiones). El coeficiente intelectual es variable pero en la mayor parte de los varones se sitúa entre 35 y 45. En las mujeres (ésta es una mutación ligada al X pero expresada también en mujeres), el coeficiente intelectual está menos afectado (60-80) y los signos somáticos son más leves. La herencia de esta mutación no responde a las reglas usuales, dado que hay "transmisores" varones normales, transmisores mujeres no afectadas pero en las cuales ocurre una impronta génica" necesaria para la amplificación y pacientes (con amplificación de repeticiones en el ADN) en la progenie de estas últimas. Además, existe el fenómeno de la "antici-

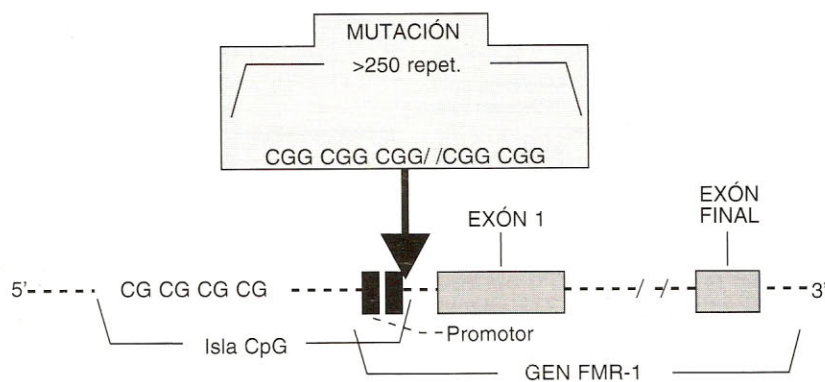
pación" como en la enfermedad de Huntington (véase cap. 6). La "antecipación" consiste en el aumento de la penetrancia a medida que transcurren las generaciones y tiene su explicación en el aumento de la longitud de las secuencias repetidas en el gen (véase más adelante).

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 de los fragmentos cromosómicos de las células de estos pacientes mediante métodos moleculares permitió descubrir segmentos de ADN con secuencias anormales: largas secuencias del trinucleótido CGG (citosa-guanina-guanina) repetidas varios cientos de veces. Estos segmentos con repeticiones se encuentran en la región no traducida (SANT) antes del comienzo del exón 1 del gen *FMR-1*, que está localizado en el sitio FRAXA, en la región Xq27.3 (fig. 14-11).

En las personas normales, esta región del ADN tiene normalmente unas pocas repeticiones del triplete CGG intercaladas; se ha determinado que el número de estas repeticiones es un polimorfismo, que se extiende entre 5 y 52 repeticiones de CGG.<sup>20,21</sup> De esta manera, 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. 5). Este tipo de mutación por expansión de tripletes repetidos se ha encontrado también en otras cinco enfermedades hereditarias humanas (véase cap. 5). Por otra parte, la mutación por expansión no se expresa inmediatamente, ya que primero "evoluciona" a través de una etapa "premutacional": en ella, las



**Fig. 14-11.** Ubicación y estructura de la mutación del síndrome del X frágil. Los límites de la "isla CpG" no están determinados, aunque las repeticiones son distales a la parte principal de la "isla".

repeticiones de tripletes han comenzado a expandirse, pero aún no han traspasado el "umbral" de 230 repeticiones, a partir del cual se producen los efectos que llevan a la expresión en el fenotipo en el caso 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 60 y los 200 tripletes. Las mujeres portadoras de una "premutación" tienen un riesgo de tener un hijo con el síndrome del X frágil que 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 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 son normales, 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 recibe una "impronta génica" durante la ovogénesis, la cual facilita la amplificación mayor de los tripletes en sus hijos durante la etapa embrionaria temprana (entre el día 5 y el día 20 posfertilización) (fig. 14-12).

Se considera que alrededor del 1% de las mujeres de la población general son portadoras de la premutación del X frágil, lo cual provee los nuevos casos.

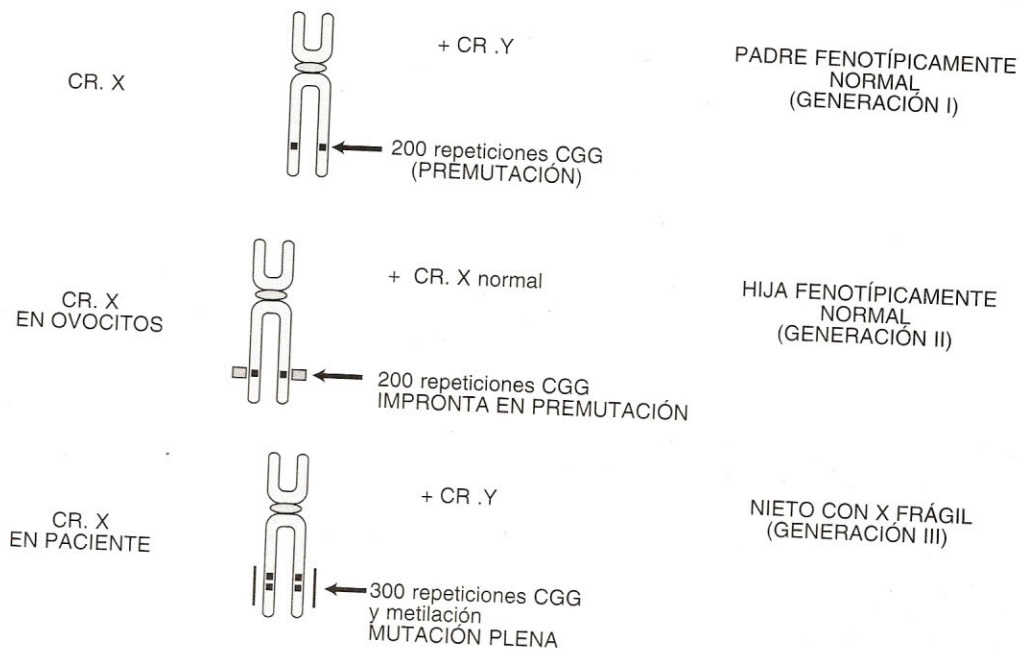
### Efectos en el gen FMR-1

Cuando el número de repeticiones de los tripletes CGG pasa el umbral de las 230 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, internas, que son mucho más raras que las de expansión de las repeticiones. El gen FMR-1 se expresa activamente en los espermatozonios 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 su función no es bien conocida, aunque probablemente sea una proteína que interviene en la síntesis proteínica, ya que posee la capacidad de unirse al ARN (véase panel 14-2).

### 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 comple-





**Fig. 14-12.** Esquema del paso de la premutación a la mutación plena en el síndrome del X frágil. Se observa el fenómeno de "anticipación" por el cual el ADN de los abuelos, portadores, anticipa la aparición del síndrome en los nietos.

tas 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 80% 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 y que pueden llegar al 100%. El fenotipo del Down está relacionado con la dosis génica triple correspondiente a la región 21q22.1-21qter, que comprende los genes Gart, SOD-1 y el de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloides. 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 el RPS4X y el RPS4Y; la muerte de los ovocitos está en relación con la ausencia del segundo cromosoma X.

El síndrome de Klinefelter se origina tanto por no-disyunción materna como paterna; el microorquidismo secundario a la degeneración de la línea germinal es una consecuencia



### Panel 14-2. Adelantos en el diagnóstico y la patogenia del síndrome del X frágil.

El síndrome del X frágil es el responsable más importante de retraso mental heredable y es una de las enfermedades genéticas originada por 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-1*; es decir que el mecanismo causante de la enfermedad es totalmente distinto en ambos casos. En los últimos años se han realizado importantes avances en el conocimiento de este síndrome.<sup>22,24</sup>

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 CCG); 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.<sup>22</sup> 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. Las funciones de estas proteínas no están clarificadas, aunque se ha observado su propiedad de asociarse a la subunidad ribosómica mayor, lo cual indicaría que tienen 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 (perteneciente a la "SANT", véase cap. 4). La repetición normal es polimórfica y comprende entre 6 y 50 tripletes CGG repetidos. Cuando existen alrededor de 60 a 200 repeticiones, se denomina "premutación" (aún no muestran signos de enfermedad); y cuando hay más de 230 repeticiones, se habla de "mutación plena" (prácticamente siempre denotan la enfermedad). 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 230 repeticiones CGG), estos sitios aparecen metilados y, lo más revelador, son incapaces de ligarse con proteína.<sup>23</sup> Por consiguiente, la patogenia de la enfermedad estriba en que la expansión de tripletes estimula la metilación de esta región reguladora del gen, lo cual impide que se asocie con factores de transcripción e inhibe de esa manera la transcripción del gen FMR-1. El diagnóstico de la mutación se ha facilitado con la disponibilidad de un anticuerpo anti-proteína FMR-1; el diagnóstico de los portadores de premutación se realiza con impronta de Southern o con RCP (véase cap. 2), usando métodos no isotópicos de detección.<sup>24</sup>

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. 8), 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. 8). Por último, el mecanismo de la expansión de premutación a mutación plena a través de mujeres portadoras está siendo investigado. Este mecanismo probablemente es un "deslizamiento" de la ADN polimerasa más allá del límite de la secuencia templado, cuando hay una serie de repeticiones que excede cierto límite. El momento en que se produce esta expansión es discutido, pero algunas evidencias sugieren que no ocurre en el embrión, sino en la meiosis materna o, como alternativa, en el embrión muy temprano.<sup>25</sup>



compatibilidad de 2 cromosomas X y el microambiente testicular. La condición 47,XXX 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. El síndrome de fragilidad cromosómica del X se patentiza por interrupciones en este cromosoma frente a ciertas condiciones de cultivo y se asocia con un déficit intelectual importante. Este sitio frágil se denomina FRA-XA, está localizado en Xq27.3 y afecta al gen FMR-1. La mutación consiste en una expansión de los tripletes CGG más allá de las 50 repeticiones; la premutación consiste entre 60 y 100 repeticiones y la mutación plena entre 30 y más de 1.000 repeticiones. Cuando el número de repeticiones supera 230, la región de ADN es metilada y se suprime la transcripción del gen FMR-1, lo cual causa el síndrome de retardo mental.

## REFERENCIAS

- Tjio JH, Levan A. The chromosome number in man. *Hereditas* 1956; 42:1.
- Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *CR Acad Sci (Paris)* 1959; 248:1721.
- Leitch AR, Schwarzscher T, Jackson D, Leitch JJ. In situ hybridization. A practical guide. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1994.
- Watt JL, Stephen GS. Lymphocyte culture for chromosome analysis. En: Rooney DE, Czepulkowski BH (eds.). *Human Cytogenetics, a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1986: 39-55.
- Saitoh Y, Laemmli UK. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 1994; 76:609-622.
- Mori C, Shiota K. Sexing of human embryos and fetuses by fluorescent in situ hybridization (FISH) to paraffin-embedded tissues with sex chromosome-specific DNA probes. *Am J Med Genet* 1994; 50:180-186.
- Swinger RR, Tucker JL. Fluorescence in situ hybridization: a brief review. *Exper Molec Mutagen* 1995; 27:245-254.
- Gosden J, Lawson D. Rapid chromosome identification by oligonucleotide-primed in situ DNA synthesis (PRINS). *Mol Hum Genetics* 1994; 3:931-936.
- ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Harnden DG, Klinger HP (eds.). *Cytogenetics and Cell Genetics*. Basel: S. Karger, 1985.
- Hamerton JL. Cytogenetics of mongolism. En: Hamerton JL (ed.). *Chromosomes in Medicine*. Little Club Clinics in Develop Medicine N° 5. Londres: Heine-mann Ltd., 1962: 140-183.
- Buyse ML (ed.). *Birth defects encyclopedia*. New York, 1990.
- De Grouchy J. Clinical cytogenetics. En: Busch H (ed.). *The Cell Nucleus*, vol. II. New York: Academic Press, 1974: 371-436.
- Patterson D. The causes of Down syndrome. *Sci American* 1987; 257:42-48.
- Solari AJ. Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- Jirasek J. Principles of reproductive embryology. En: Simpson JL (ed.). *Disorders of sexual differentiation*. New York: Academic Press, 1976: 51-111.
- Ashworth A, Rastan S, Lovell-Badge R, Kay G. X-chromosome inactivation may explain the difference in viability of XO humans and mice. *Nature* 1991; 351:406-408.
- Lobaccaro JM, Lumbroso S, Belon Ch, Medlej R, Berta PH, Sultan CH. Genes du chromosome Y et syndrome de Turner. *Ann d'Endocrinol* 1993; 54:323-329.
- Mac Donald M, Hasold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE, Jacobs P. The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Human Mol Genet* 1994; 3:1365-1371.
- Anderson VE. Genes, behavior and responsibility: research perspectives. En: Frankel MS, Teich A (eds.). *The Genetic Frontier. Ethics, law and policy*. Washington: American Association for the Advancement of Science, 1994: 105-130.
- Nelson DL. The fragile X syndromes. *Seminars in Cell Biol* 1995; 6:5-11.
- Bates G, Lehrach H. Trinucleotide repeat expansions and human genetic disease. *BioEssays* 1994; 16:277-284.
- Longshore JM, Tarleton J. Dynamic mutations in human genes: a review of trinucleotide repeat diseases. *J Genet* 1996; 75:193-217.
- Schwemmler S, De Graaf F et al. Characterization of FMRI promoter elements by in vivo footprinting analysis. *Amer J Genet* 1997; 60:1354-1362.
- Tranebaerg J, Lubs HA et al. Conference Report. Seventh International Workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. *Amer J Hum Genet* 1996; 64:1-14.
- Moutou C, Vincent M-C, Biancalana C, Mandel J-L. Transition from premutation to full mutation in fragile X syndrome is likely to be prezygotic. *Human Mol Genet* 1997; 6:971-979.

## **GENÉTICA DE LOS TEJIDOS: ASPECTOS PARTICULARES**

*Trastornos genéticos de la epidermis: ictiosis hereditarias. Histofisiología de la epidermis. Canales iónicos: defectos genéticos. Histogénesis del cartílago y del hueso. Gen *OSF2* y diferenciación de osteoblastos. Genética del desarrollo vascular. Trastornos genéticos de los fotorreceptores.*

### **Introducción**

En la actualidad, se están produciendo importantes avances en el conocimiento de los mecanismos de las enfermedades que afectan específicamente a ciertos tejidos, como la epidermis de la piel, el cartílago hialino, el tejido óseo y varios otros.

El estudio de las enfermedades mendelianas que afectan a los tejidos, las convierte en experimentos naturales, en los cuales el aislamiento del gen responsable permite esclarecer la bioquímica específica de ese tejido o, al menos, señala un camino en ese sentido. Por otro lado, el estudio de las características básicas de cada tejido, junto a los resultados crecientes del Proyecto del Genoma Humano, representan otro camino que converge con el anterior. Por eso, en este capítulo se examinarán ciertas enfermedades genéticas de los tejidos, se bosquejará un resumen de las estructuras y los procesos de esos tejidos, y se intentará integrar ambos enfoques en una histofisiología y patogenia particular de dichos tejidos. Necesariamente, este cometido se realizará de manera fragmentaria: sólo se examinarán algunos tejidos o aspectos de ellos y só-

lo se presentarán unas pocas enfermedades como prototipos.

Por otra parte, ciertos procesos fisiológicos muy generales del organismo están siendo investigados en profundidad. De esta manera, en el capítulo siguiente se presentarán los conceptos actuales de la genética del envejecimiento, de la obesidad y de la pigmentación. Ambos capítulos se complementan con los contenidos de otros, en especial el capítulo 12.

### **Genética de la epidermis.**

#### **Trastornos de la cohesión intercelular a nivel superficial: las ictiosis hereditarias**

Las ictiosis (condición de pez, piel escamosa) son enfermedades que afectan las capas superficiales de la epidermis, con un excesivo engrosamiento del estrato córneo, piel seca y formación de escamas. Se distinguen cuatro tipos clásicos: a) ictiosis vulgar (mendeliana dominante, autosómica, gen desconocido); b) ictiosis ligada al sexo, recesiva, por defecto de la enzima sulfatasa esteroideal, cuyo locus está en Xp22.3; c) hiperqueratosis epidermolítica (HE), por defecto





**Fig. 15-1.** Piel de un paciente con ictiosis ligada al X. Las escamas oscuras son características. (Gentileza del Prof. Dr. Alejandro A. Cordero.)

de las queratinas Q1 y Q10, y d) ictiosis lamelar, mendeliana recesiva, por defecto de la transglutaminasa de los queratinocitos, TGM1. La forma ligada al sexo, y sobre todo la lamelar, han revelado datos de interés y serán resumidas aquí.

### **Ictiosis ligada al sexo: falla de la sulfatasa esteroideal STS**

La ictiosis ligada al cromosoma X se presenta en varones, con una incidencia de 1 en 5.000 nacimientos; se detecta a partir de aproximadamente los 6 meses de edad, y es transmitida por mujeres portadoras de la mutación del gen STS. Los niños presentan escamas oscuras, pardas, de aspecto "sucio" (fig. 15-1), de 0,5 cm a varios centímetros de diámetro, y es característica su aparición en la parte lateral del cuello y en las pantorrillas. Hay también sequedad de la piel y prurito, y las palmas de las manos no son afectadas. En los climas calurosos y muy húmedos, las escamas son menos perceptibles. Con el aumento de la edad

esta ictiosis se acentúa y puede haber opacidad leve de la córnea, que por lo general no afecta la agudeza visual. El tratamiento con agentes hidratantes, propilenglicol y otros, es benéfico, aunque la afección se mantiene de por vida.

La enzima afectada (STS) hidroliza el sulfato de colesterol en condiciones normales; los pacientes de este tipo de ictiosis tienen incrementado el nivel de esta sustancia en el estrato córneo de la epidermis; a su vez, el incremento del sulfato de colesterol hace que el estrato córneo no se descame normalmente, por una mayor cohesión entre sus laminillas. El microscopio electrónico muestra la persistencia de imágenes de desmosomas a ese nivel (lo cual es anormal); los cuerpos laminares y su excreción son normales.<sup>1</sup>

Además, está incrementado el nivel de sulfato de colesterol en el plasma (donde se encuentra asociado con las lipoproteínas de baja densidad), así como el nivel del metabolito dehidroepiandrosterona en el líquido amniótico.

El gen de esta enzima (STS) posee 10 exones y forma parte de una familia de sulfatasas muy homogénea.<sup>2</sup> Este gen se encuentra muy cerca de la región pseudoautosómica (no sufre lionización) e integra un grupo de cuatro genes de esta familia (sulfatasas) que están ubicados en la misma banda del cromosoma X (fig. 15-2). La mayoría de los pacientes con ictiosis ligada al X presenta delecciones (en general de tamaño considerable) en la región de este gen.

El déficit de STS inhibe la descamación normal, en pequeñas placas, al aumentar la cohesión en las laminillas córneas por el incremento de sulfato de colesterol. Aunque se sabe que la mayoría de los lípidos del estrato córneo, incluido el sulfato de colesterol, se encuentran en los espacios intercelulares y las membranas citoplasmáticas, no está aclarado el mecanismo por el cual esta sustancia aumenta la cohesión intercelular. Un mecanismo de naturaleza diferente se encuentra en la ictiosis lamelar.

### **Ictiosis lamelar: "bebés colodión" (falla de la transglutaminasa 1)**

Ésta es una ictiosis grave en el recién nacido, pero que no empeora con la edad. Su incidencia es de alrededor de 1 cada 200.000 nacimientos. Al nacer, el bebé está rodeado de una cutícula translúcida, que se cae a las dos semanas; durante este período requiere especial cuidado que la membrana no se reseque y constriña al bebé, para lo cual es necesario un ambiente saturado de humedad. Con posterioridad a la caída de la



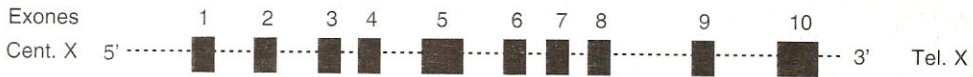


Fig. 15-2. Estructura del gen de la sulfatasa esteroide (arilsulfatasa C, ASC o STS).

membrana, y a lo largo de toda la vida, se desarrollan placas córneas grandes y rígidas, que pueden evertir los párpados (ectropión) (fig. 15-3).

En la ictiosis lamelar, el defecto corresponde a la enzima transglutaminasa TGM1, específica de los queratinocitos.<sup>3,4</sup> Esta enzima provoca puentes cruzados entre proteínas, específicamente el puente N- $\epsilon$ ( $\gamma$ -glutamil) lisina, que contribuye de manera decisiva a formar la envoltura rígida de los queratinocitos de la capa córnea, o "envoltura cornificada", subyacente a la membrana citoplasmática y de unos 20 nm de espesor, sumamente resistente a los agentes químicos. Las proteínas que participan en la formación de este enrejado son la involucrina y la lorricrina. Por medio de estos puentes, la TGM1 también interviene para conferir las características de resistencia mecánica y química del cabello (cutícula y médula).<sup>5</sup>

El gen de esta transglutaminasa, TGM1, se localiza en el cromosoma 14q11 y está formado por 15 exones dispuestos en 14 kb de ADN, que codifican una enzima de 816 aa., la cual presenta 5 dominios. Se han observado varias mutaciones, que incluyen la producción de un codón de terminación, en pacientes con esta enferme-

dad; pero es factible que también participe otro gen en esta ictiosis. Por otra parte, existe otro mecanismo diferente que origina ictiosis en la hiperqueratosis epidermolítica.

### Hiperqueratosis epidermolítica: ictiosis por falla de queratinas Q1-Q10

Los mecanismos productores de ictiosis vistos antes tienen sus sitios de acción en el espacio intercelular (sulfato de colesterol acumulado) y en la envoltura cornificada de las células del estrato córneo. Hay, además, un mecanismo cuyo lugar de acción es el propio citoplasma de los queratinocitos, porque afecta los filamentos intermedios formados por las queratinas Q1 y Q10 (véase cap. 12) (fig. 15-4).

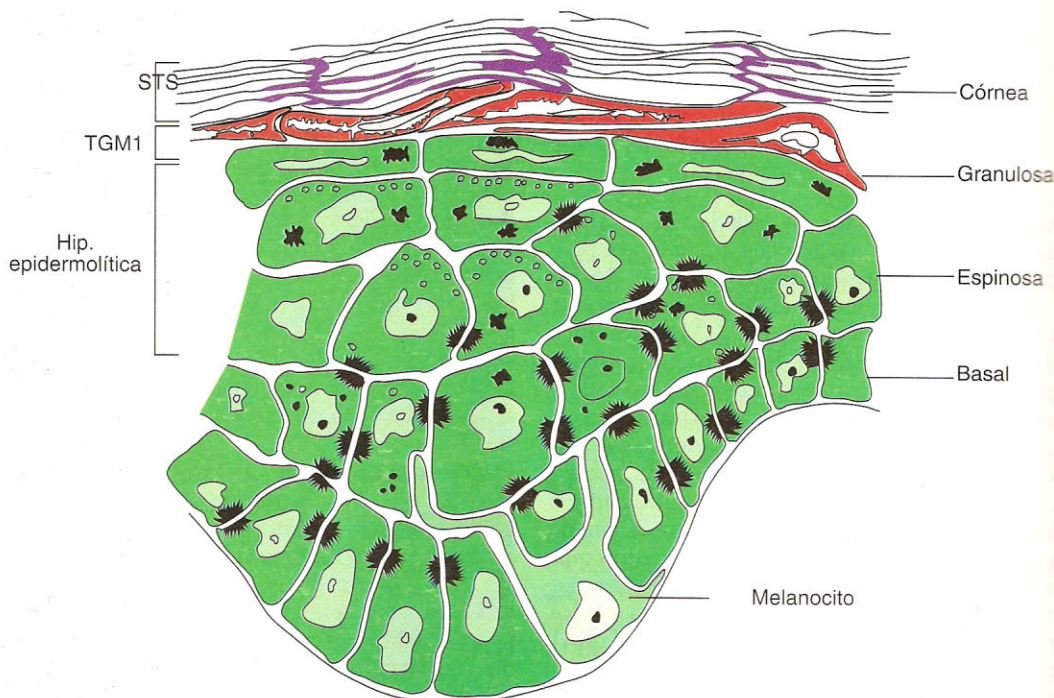
Como se vio previamente, la gran variedad molecular de queratinas permite la distribución especial de algunos tipos de queratinas a alturas diferentes de la epidermis; las Q1, Q10 y Q2e son suprabasales, es decir que son de las capas más superficiales.

En la hiperqueratosis epidermolítica (HE) hay mutaciones dominantes de los genes de una



Fig. 15-3. Niña afectada de ictiosis lamelar. Las escamas cubren la cara y por su rigidez provocan la eversión del párpado (ectropión). (Gentileza del Prof. Dr. Alejandro A. Cordero.)





**Fig. 15-4.** Localización de los lugares de acción de las proteínas mutadas en la ictiosis ligada al sexo (STS), la ictiosis lamelar (TGM1) y la hiperqueratosis epidermolítica.

o más de estas queratinas suprabasales. En caso de estar mutado el gen de la Q2e, sólo afecta a las células más superficiales y es un tipo de ictiosis muy benigna ("ictiosis ampollar de Siemens"). Cuando están afectadas Q1 o Q10, se desarrolla la HE, que en la época perinatal se presenta con enrojecimiento y ampollas, mientras que en la madurez hay placas pardas y pocas ampollas (fig. 15-5).

En esta enfermedad se observan la vacuolización de los queratinocitos superficiales de la capa espinosa y un espesamiento del estrato córneo. La vacuolización se debe a defectos de los filamentos de queratina, que los vuelven frágiles frente a la compresión y las fuerzas tangenciales a la piel; como reacción a esta lesión se desarrolla una proliferación excesiva, que lleva al engrosamiento de los estratos granuloso y córneo, característico de esta ictiosis.

### Histofisiología de la epidermis superficial

Los "experimentos naturales" de las ictiosis permiten aclarar algunos aspectos de la función de las capas superficiales de la epidermis. En estas capas se producen varios procesos importantes: 1) cornificación final, 2) descamación fisiológica,

3) formación de la "envoltura celular córnea" de cada queratinocito y 4) establecimiento de la barrera para el agua.

La cornificación está asociada con la formación de gránulos de "queratohialina" en la capa espinosa superior y en el estrato granuloso. La queratohialina contiene la proteína filagrina ("proteína agrupante de filamentos") y otras sustancias. La filagrina interactúa con los filamentos intermedios de queratina, que se encuentran en los queratinocitos (véase cap. 12), aparentemente guiando su empaquetamiento en manojos. Esta interacción entre filagrina y filamentos de queratina es poco conocida, pero se supone que está alterada en otro tipo de ictiosis (benigna o vulgar) cuyo gen aún es desconocido. Por otra parte, los queratinocitos de las capas superiores del estrato espinoso sintetizan selectivamente queratinas Q1 y Q10 y, por último, la queratina Q2e. La filagrina de los gránulos de queratohialina y las queratinas de los filamentos intermedios constituyen la mayor parte de la masa proteica citoplasmática en las capas superiores de la epidermis. La cornificación está afectada en la hiperqueratosis epidermolítica (HE) porque las queratinas "superficiales" de la epidermis están alteradas por la mutación de alguno de sus genes (de Q2e, Q1



y Q10). Las mutaciones productoras de HE afectan en especial el extremo inicial del dominio helicoidal de las queratinas (1A y H1) y son mutaciones dominantes. Esto se explica porque el segmento helicoidal inicial de las queratinas es importante para la interacción de los heterodímeros en la formación del filamento intermedio, y sus alteraciones llevan a la producción de filamentos poco resistentes, que se destruyen rápidamente. La aparición de una queratina mutante, que al asociarse con otros monómeros para formar heterodímeros extiende su influencia sobre muchos filamentos, explica el carácter dominante de la HE. El desarrollo de la ictiosis en esta afección es *secundario*; el efecto primario es la citólisis (destrucción celular, vacuolización) en el estrato espinoso superior y el granuloso, que a su vez es una consecuencia de la fragilidad de los filamentos alterados de queratina. Esta citólisis estimula una hiperproliferación de la capa basal, responsable del aumento de espesor de la capa córnea; es decir que las escamas y el aumento de grosor de la capa córnea son, al menos parcialmente, causados por una provisión excesiva de queratinocitos de las capas inferiores, aunque no se descartan el efecto de la queratina anormal y la citólisis.

La *descamación normal* depende de la cohesión entre las células totalmente cornificadas del estrato córneo; ésta a su vez depende de los materiales "cementantes" del espacio intercelular y de las modificaciones de la membrana celular. La importancia de las sustancias cementantes se pone de manifiesto en la ictiosis ligada al sexo: el déficit de la sulfatasa esteroideal permite una acumulación anormal de sulfato de colesterol intercelular, que inhibe la descamación fisiológica. También es obvia la importancia de las sustancias cementantes en las alteraciones de la secreción de los cuerpos laminares (véase más adelante).

La formación de la "envoltura córnea" en las células del estrato granuloso está regulada en parte por la enzima transglutaminasa 1, cuyo déficit produce la ictiosis lamelar. Esta afección es recesiva, porque, como es usual en las afecciones recesivas, basta la transcripción de un alelo normal para mantener la formación de la envoltura habitual. En la ictiosis lamelar se forma una envoltura anormal, discontinua, que también es visible en el pelo.<sup>5</sup> Sin embargo, aún no está explicado el mecanismo por el cual este defecto de la envoltura lleva al aumento de la cohesión de las laminillas córneas; es decir, no se conocen bien los fenómenos asociados a la formación de esta envoltura en condiciones normales.



**Fig. 15-5.** Paciente afectada de hiperqueratosis epidermica. En jóvenes y adultos no hay ampollas, sino placas hiperqueratósicas (gruesas) y pardas, con cordones transversales salientes, especialmente desarrollados en codos y rodillas. (Gentileza del Prof. Dr. Alejandro A. Cordero.)

Por último, la *barrera fisiológica contra el agua*, localizada a nivel del estrato granuloso, está relacionada con la formación y la exocitosis de los "cuerpos laminares" o de Odland, que se forman en las células del estrato espinoso, tienen una estructura interna de laminillas paralelas de alto contenido lipídico, se sintetizan en el aparato de Golgi y se liberan en el espacio intercelular a nivel del estrato granuloso, determinando la formación de la barrera para el agua. La formación o la extrusión de estos cuerpos laminares está alterada en ciertas afecciones como la psoriasis, pero su genética es poco conocida.

#### Alteraciones hereditarias de las uñas: paquioniquia congénita (genes de queratinas Q16-Q17)

Hay dos formas clínicas de paquioniquia congénita, una enfermedad autosómica domi-





**Fig. 15-6.** Engrosamiento de las uñas (pachyoniya congénita) en los pies. El lecho ungular se cornifica y las uñas se engruesan y deforman en su borde distal. (Gentileza del Prof. Dr. Alejandro A. Cordero.)

nante cuya base ha sido aclarada recientemente como una alteración de los genes de las queratinas "duras" o tricocíticas Q16 y Q17. En ambas formas clínicas, el signo más importante es el gran engrosamiento de las uñas, que sólo se cortan aserrándolas (fig. 15-6). Además, en una forma (Jadassohn-Lewandowsky, abreviado J-Le) hay hiperqueratosis palmar y plantar y leucoqueratosis en la mucosa bucal, mientras que en la otra forma (Jackson-Lawler o J-La) no se presentan estos signos pero hay quistes epidérmicos que pueden infectarse y pueden aparecer dientes temporarios neonatales; también el pelo es anormal, en su implantación más vertical y su estructura ("pili torti").

En el tipo clínico J-Le se ha observado una mutación en el gen de Q16.<sup>6</sup> Esta mutación (Leu130Pro) afecta el dominio 1A, es decir, el inicio del segmento helicoidal de la Q16, y al introducir una prolina se presume que distorsiona profundamente la conformación helicoidal. En la forma J-La se ha estudiado otra mutación, la Asn92Asp, que también afecta el segmento A1. En ambos casos hay trastornos estructurales en los queratinocitos suprabasales de la epidermis: los filamentos se agrupan en haces muy gruesos, el estrato granuloso es irregular y más fino, la queratohialina está reducida y el espacio intercelular, ensanchado. La hipertrofia ungular probablemente es secundaria al daño traumático de los queratinocitos suprabasales, cuyos filamentos parecen ser más frágiles que los normales.

Esta enfermedad muestra la localización y la función específica de estas queratinas en las uñas y los pelos, y complementa las observaciones reseñadas en el capítulo 12 acerca de las funciones normales de las queratinas de los queratinocitos basales y suprabasales.

### Genética de los canales iónicos: trastornos epiteliales, musculares y nerviosos asociados a mutaciones de los canales

En capítulos anteriores, se han descrito dos importantes canales de las membranas celulares de los epitelios, cuyas mutaciones están asociadas a enfermedades: el canal de cloro (RTFQ) de la enfermedad fibroquística (cap. 6) y el canal de sodio de la nefrona distal, relacionado con el síndrome de Liddle (cap. 10). En realidad, existe una gran variedad y cantidad de canales (más de 100 tipos) en todos los tipos celulares, destinados a superar la impermeabilidad de la bicapa lipídica para las moléculas y los iones con carga eléctrica, y a mantener las concentraciones iónicas intracelulares, muy diferentes de las del medio intercelular (p. ej., alto  $K^+$  y bajo  $Na^+$  intracelulares), en asociación con las proteínas transportadoras responsables del transporte activo. Estos canales están formados por las "proteínas de canal", que son proteínas integrales de membrana, con varios dominios intramembranosos que forman las paredes del canal, cuya cavidad es hidrofílica y con un diámetro ajustado al del ion que lo atraviesa (p. ej., el diámetro de los iones sodio y potasio es muy diferente uno de otro), de modo que los canales son *específicos* para un determinado ion. Estos canales son, por consiguiente, de menor tamaño y más selectivos que los de las uniones comunicantes o "nexos", y además no realizan transporte activo (que es función de las proteínas "transportadoras"), aunque poseen algún tipo de regulación. Hay tres tipos principales de regulación: por voltaje, por estímulo mecánico y por asociación de ligandos. La regulación más versátil es por ligandos (como los neurotransmisores), pero la más básica es por voltaje: las oscilaciones de diferencias de potencial a través de la membrana provocan variaciones en la



conformación de las "proteínas de canal" (por las fuerzas que el campo eléctrico ejerce sobre los grupos cargados de las proteínas), lo cual determina uno de los tres estados del canal: cerrado, abierto o inactivado. Las células nerviosas y las musculares se han especializado en la producción de canales iónicos; las nerviosas utilizan los canales iónicos regulados por voltaje para transmitir muy velozmente ( $100 \text{ m/s} = 360 \text{ km/h}$ ) señales eléctricas (potencial de acción), primero con la intervención de los canales de sodio y luego, con los de potasio.

Los canales para cationes están formados por cuatro subunidades proteicas, que pueden ser idénticas (homotetrámeros del canal de  $\text{K}^+$ ) o que pueden ser diferentes dominios de una proteína muy grande, como en los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  (fig. 15-7).

Todos los dominios y las subunidades de los canales catiónicos están relacionados entre sí, formando una familia de proteínas de canal, que muestra un grado de conservación notable en diversos organismos, por lo cual su función es de gran importancia: el continuo descubrimiento de mutaciones en estas proteínas, que están asociadas a enfermedades, así lo confirma.

### **Síndrome del intervalo QT largo en el electrocardiograma: mutación del canal de potasio (genes LQT2 y KVLQT1)**

El síndrome de QT largo se observa en los casos en que el intervalo QT es mayor de 0,40 segundo para una frecuencia de 70 pulsaciones (fig. 15-8).

Dado que el intervalo QT representa el tiempo total de la despolarización y la repolarización del ventrículo, su alargamiento implica que la despolarización o la repolarización ventricular (más probablemente esta última) se encuentran demoradas o alargadas y que existe un riesgo de fibrilación ventricular (por lo general fatal). En efecto, en personas con una arritmia de este tipo, con frecuencia se observa síncope sin ninguna otra razón en edad juvenil. El estudio de estos casos ha llevado a descubrir mutaciones de cualquiera de los dos genes codificantes de los canales de  $\text{K}^+$ : el gen LQT2 (Long QT, syndrome 2) del cromosoma 7 y el KVLQT1 (canal de  $\text{K}^+$ , Ventricular, QT Largo, 1) del cromosoma 11.<sup>7,8</sup> LQT2 codifica subunidades de un canal de  $\text{K}^+$  rectificador y KVLQT1 codifica también otro canal de  $\text{K}^+$ . De esta manera, se ha propuesto que el síndrome se debe a una falla de la repolarización ven-

tricular. Las mutaciones son dominantes negativas, es decir que la proteína anormal que forma una subunidad, al asociarse con las restantes para formar el tetrámero, impide la función normal de todo el canal, es decir, del tetrámero (interfiere con la función de la proteína normal). Este defecto parece corregible con medicación, incluso con pequeñas cantidades de  $\text{K}^+$ .

De manera similar, en ciertas afecciones del sistema nervioso se hallan asociadas mutaciones de los canales de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Ca}^{++}$ .<sup>7</sup>

### **Mutaciones del canal 2 de acuaporina y del receptor de vasopresina V2: diabetes insípida**

Los canales de acuaporina no son canales de iones, sino de agua, que están especialmente desarrollados en los túbulos renales. Estos canales están relacionados con la resorción renal de agua, estimulada por la hormona antidiurética o vasopresina; también intervienen los receptores específicos de la hormona, que son proteínas de membrana. La diabetes insípida es una afección caracterizada por una excreción muy aumentada de orina muy diluida (10 a 20 L), con sed muy intensa y sequedad de las mucosas. La forma hereditaria de esta enfermedad puede ser ligada al sexo o autosómica. En el primer caso, está afectado el gen del receptor de la vasopresina V2, localizado en Xq28; en el segundo, está afectado el gen de la acuaporina 2, localizado en el cromosoma 12q13;<sup>9</sup> (fig. 15-7B).

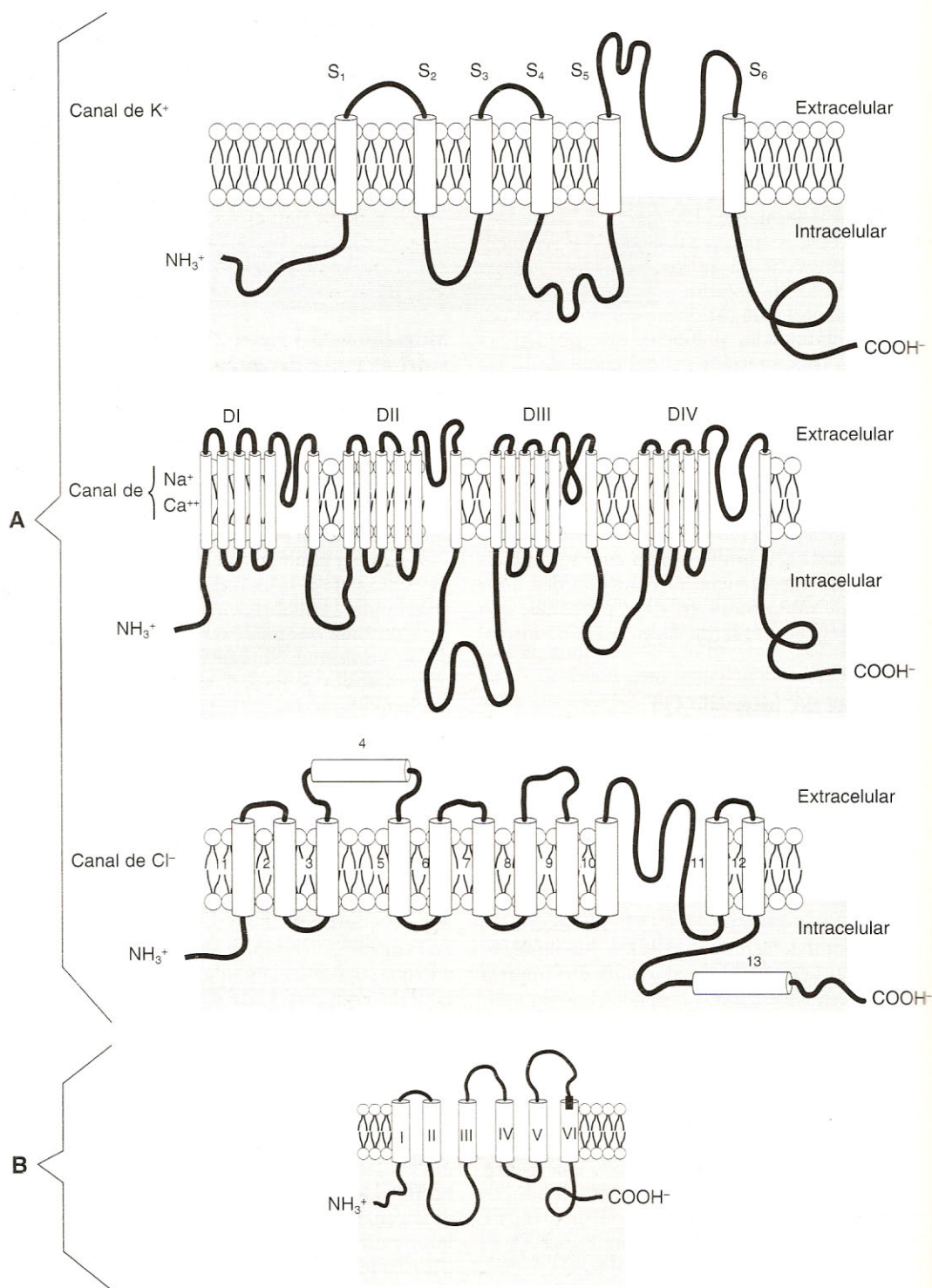
Las mutaciones del gen de acuaporina producen pérdida de función y, por consiguiente, son recesivas; probablemente dificultan el procesamiento y la localización correcta de la proteína en la membrana citoplasmática, en forma similar a lo que sucede en la mutación más frecuente de la fibrosis quística, la  $\Delta\text{F508}$  (véase cap. 6).

### **El plan genético para la formación de cartílago y hueso**

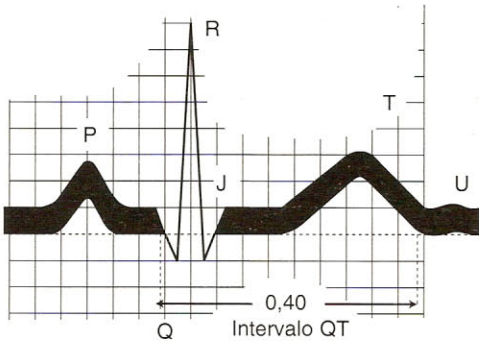
El espectacular descubrimiento del origen molecular de la acondroplasia (véase cap. 13) ha llevado a un gran incremento de los estudios genéticos de las enfermedades del esqueleto, y esto, a su vez, al estudio de los factores genéticos para el desarrollo de los tejidos cartilaginoso y óseo. En los párrafos siguientes se resumen las características del cartílago, precursor del hueso.

El cartílago está formado por células muy especiales, los "condrocitos", y por una matriz ex-





**Fig. 15-7. A.** Esquema de la estructura de las subunidades proteicas de los canales de potasio (arriba), de sodio (o calcio) (intermedio) y de cloro (abajo). Las porciones intramembranas están representadas por cilindros dentro de la bicapa. **B.** Canal de acuaporina.

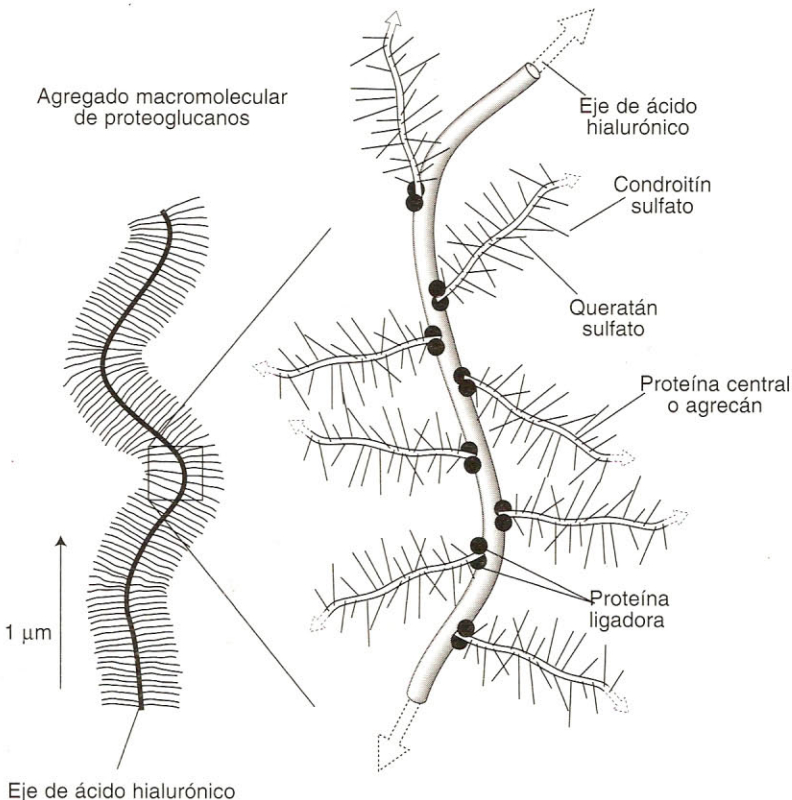


**Fig. 15-8.** Electrocardiograma normal. Se señala el intervalo QT normal.

tracelular especial, elástica, resistente a la presión y muy duradera, que es producida por el condrocito. Un tejido conectivo especializado, el pericondrio, rodea los bordes externos del cartilago. Dado que el cartilago no posee vasos, los condrocitos se nutren por difusión, y su ambiente posee baja tensión de oxígeno (1-2%),<sup>10</sup>

por lo cual estas células utilizan preponderantemente el metabolismo anaeróbico de la glucosa hasta producir lactato. Los condrocitos del cartilago adulto no se dividen mientras estén en condiciones normales; esto significa que son las mismas células del cartilago del niño (excepto en las metáfisis). La matriz extracelular está compuesta por agua (70-80%), iones, proteoglicanos y colágenos. Los colágenos forman la mayor parte de la sustancia orgánica y son cuatro, en orden de abundancia: colágeno II, colágeno IX, colágeno XI y finalmente, sólo en la zona de cartilago hipertrófico de las metáfisis, colágeno X. Los proteoglicanos están constituidos por ácido hialurónico (hialuronán) (cadenas de 2.500 o más unidades formadas por N-acetilglucosamina y ácido glucurónico), "agrecanos" (complejos de unidades de 100 condroitín-sulfatos y 30 queratán-sulfatos sobre una proteína central, la proteína agreacán) y unidades de "proteína ligadora" (de agrecanos a hialuronanos) (fig. 15-9).

Otros componentes menores son: la proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa



**Fig. 15-9.** Elementos de los proteoglicanos del cartilago: ácido hialurónico, proteína ligadora y unidades de agrecanos, que forman una red centrada sobre una cadena de hialuronato.



Cuadro 15-1. Algunas proteínas constituyentes del cartílago y sus genes respectivos<sup>11,12</sup>

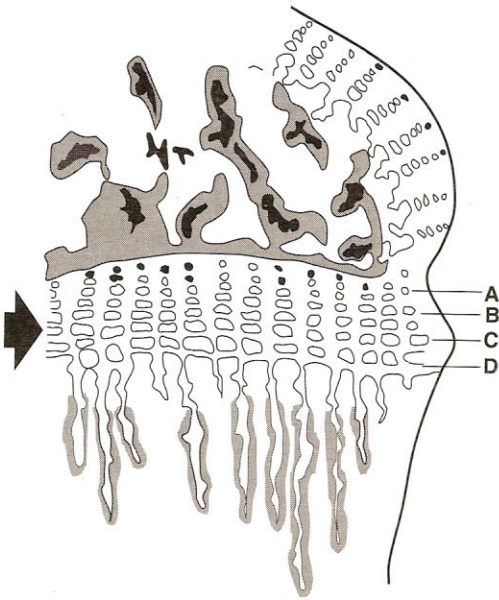
Proteína	Gen	Localización cromosómica	Función normal
Colágeno II	COL2A1	12q13.11	Principal colágeno del cartílago. El subtipo IIB es marcador de la diferenciación de condroblastos. Homotrímero. Fibrillas finas, en arcadas, que brindan resistencia al estiramiento y a la compresión.
Colágeno IX	COL9A1 COL9A2 COL9A3	6q12 1p33 —	Colágeno menor, unido al colágeno II por uniones transversales; agregados en dirección opuesta a las del colágeno II. Confiere resistencia lateral a la tensión. En matriz territorial. No da fibrillas típicas.
Colágeno XI	COL11A1 COL11A2 COL11A3	6p21.3	Colágeno menor, unido al II y al IX, necesario para la cohesión normal. Su defecto da fibras gruesas y fragilidad.
Colágeno X	COL10A1	6q21	Específico de la zona de cartílago hipertrófico de las metáfisis. Aparece pocos días antes de la calcificación. No forma fibrillas y tiene afinidad por el calcio.
Agrecán	AGC1		Proteína central de las unidades de proteoglucanos; tiene tres dominios globulares (el N, de unión al ácido hialurónico y proteína ligadora) y un dominio central lineal. Da la resistencia a la presión del cartílago, por su capacidad de retener agua.
Proteína ligadora			Glucoproteína que estabiliza la asociación del ácido hialurónico con los proteoglucanos. Su extremo N corresponde a la familia de Ig.
POMAC	COMP	19p13.1	Proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa. Es de la familia de las trombospondinas. Glucoproteína pentamérica, ligadora de Ca <sup>++</sup> .
TSDD	DTDST	5q31	Proteína transportadora de sulfato (alterada en la displasia diastrófica). Tiene 12 dominios transmembranosos.
ARSE	ARSE	Xp22.3	Aril-sulfatasa-E, enzima alterada en la condrodysplasia punctata.
RPrPTH	RPrPTH	3p21	Receptor de la proteína relacionada con la PTH (parathormona). Reguladora del crecimiento en las metáfisis.
R3FCF	FGFR3	4p16.3	Receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (alterado en la acondroplasia).
R2FCF	FGFR2	10q25.3	Receptor 2 del FCF, alterado en los síndromes de Crouzon, Apert y Pfeiffer.
R1FCF	FGFR1	8p11.2	Receptor 1 del FCF, alterado en el síndrome de Pfeiffer.

(POMAC = COMP en inglés), que es una glucoproteína pentamérica de la familia de las proteínas ligadoras de calcio y que se encuentra en la matriz territorial rodeando inmediatamente a los condrocitos, y la proteína transportadora de sulfato, que está alterada en la displasia diastrófica (TSDD = DTDST en inglés). El cuadro 15-1 agrupa algunos de estos componentes y sus genes.

El plan genético para el desarrollo de cartílago a partir de una célula mesenquimática indiferenciada requiere, como paso esencial, la activación transcripcional del gen codificante del colágeno II en cantidad sustancial, y también, dada la interacción que poseen entre sí los tres

colágenos del cartílago normal, una activación regulada y de menor desarrollo de los genes para el colágeno IX (no fibrilar) y el colágeno XI (fibrilar y que se encuentra en el centro de las fibras constituidas en su mayor parte por colágeno II).

La activación transcripcional de los genes para los colágenos del cartílago depende de una cascada génica reguladora, incompletamente conocida, en la cual intervienen proteínas reguladoras, en especial de la familia de las "proteínas morfogenéticas de hueso" (PMH = BMP), un grupo de proteínas secretorias cuya función general es la señalización intercelular. Este grupo de proteínas forma parte de una superfamilia de



**Fig. 15-10.** Zonas del cartílago metafisario de un hueso largo. A: en reposo, B: seriado, C: hipertrofiado, D: calcificado.

proteínas, los “factores  $\beta$  de crecimiento y transformación” (FBCT = TGF- $\beta$ ), que son proteínas pequeñas o péptidos (110-140 aa.) con propiedades reguladoras de la mitosis, la diferenciación y la adhesividad celulares. Los receptores de estos factores proteicos son quinasas de serina/treonina, que se clasifican en tipos I y II, pero que actúan cooperativamente formando heterodímeros cuando se les asocia el ligando (factor  $\beta$ ).

Recientemente se ha reconocido otro gen regulador de la síntesis de colágenos del cartílago: el gen SOX9, ya visto en relación con la determinación sexual (véase cap. 7). La proteína codificada por SOX9, como todas las SOX, es ligadora de ADN, al cual modifica en su forma molecular, cambiando su capacidad transcripcional. Se ha observado la proteína SOX9, que se une específicamente al ADN del intrón 1 del gen del colágeno II, COL2A1; algunas mutaciones de SOX9 inhiben esta capacidad de unión de SOX9 al ADN intrónico del gen COL2A1, y simultáneamente inhiben la expresión *in vivo* de este tipo de colágeno, lo cual muestra que la activación de este gen de colágeno está regulada por SOX9.<sup>13</sup>

De acuerdo con lo expresado, las mutaciones que afecten los genes del colágeno del cartílago producirán enfermedades en las cuales el cartílago está alterado (“condrodisplasias”); esto ha sido verificado en los últimos años. Pero no sólo los genes COL son causantes de condrodis-

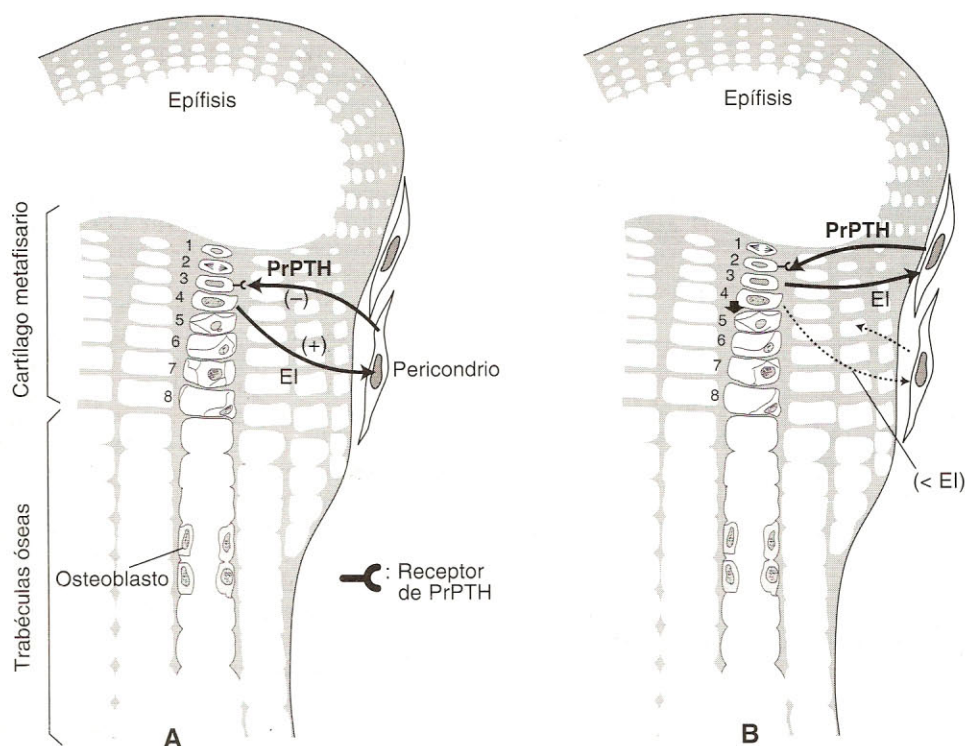
plasias, también los genes codificantes de otras proteínas menores o enzimas y receptores de membrana provocan estas patologías (los genes para agrecán y proteína ligadora, al ser compartidos por el tejido conectivo, son demasiado amplios en su función para ser específicos de patologías del cartílago). De todos estos genes adicionales, los que corresponden a los receptores 3 a 1 del factor de crecimiento fibroblástico ya son conocidos como origen de la acondroplasia (véase cap. 13) y otros síndromes relacionados. En la actualidad, un número significativo de otras condrodisplasias ha podido ser explicado desde el punto de vista molecular.<sup>11,12</sup> Para los fines básicos de este texto, sin embargo, es de mayor interés la explicación del mecanismo que regula el crecimiento normal del cartílago metafisario en los huesos largos.

### Mecanismo regulatorio del crecimiento de las metafisis en los huesos largos

Los huesos largos del organismo humano continúan creciendo en longitud desde la niñez hasta que el joven adulto llega a su estatura máxima (antes en la mujer que en el varón). Ello se debe a la existencia del cartílago metafisario, que se sella o desaparece en esa etapa de la vida. Este cartílago posee las cuatro zonas características: en reposo, seriado, hipertrofico y calcificado (fig. 15-10). Además, a medida que el niño progresa en edad, el cartílago cada vez es menor en grosor y tiene menor actividad, de tal manera que hay una muy estricta regulación en esta desaceleración del crecimiento en longitud del hueso.

En los últimos años, se descubrió que los factores esenciales de esta regulación son génicos, y se determinó la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativo para mantener un nivel determinado de condrocitos entrando en la fase de hipertrofia.<sup>14</sup> Este circuito de retroalimentación negativa está formado esencialmente por los productos de dos genes: el gen “erizo índico” (EI = IHH, indian hedgehog en inglés) y el gen “PrPTH” (proteína relacionada con la parathormona = PTHrP, parathormone related protein en inglés). El gen EI es activado en los condrocitos de la zona proliferante en forma transitoria; su producto, la proteína EI, actúa finalmente sobre una célula blanco específica, la del pericondrio, e induce en ésta la activación del gen PrPTH, cuyo “blanco” a su vez son las células de la zona proliferante que tienen un receptor para su producto, el RPrPTH (véase cuadro 15-1). La acción de la proteína





**Fig. 15-11.** Dos etapas sucesivas del circuito de regulación de la diferenciación del cartílago metafisario, de condrocitos proliferantes a condrocitos hipertróficos. Este circuito tiende a frenar el crecimiento en longitud del hueso, al inhibir la producción de cartílago hipertrófico que luego se reemplaza con hueso. En **B** se observa que el circuito inhibitorio se desplaza hacia arriba, y permite la diferenciación del condrocito 4 (la flecha vertical corta señala su desplazamiento hacia la zona hipertrófica).<sup>14</sup>

PrPTH es inhibitoria de la diferenciación de condrocitos proliferantes a hipertróficos, de tal manera que regula el avance del crecimiento en longitud del hueso (fig. 15-11).

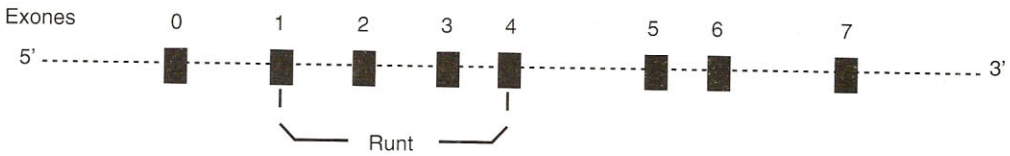
El gen EI codifica una proteína secretoria de 408 aa. que tiene un extremo carboxilo con propiedades autocatalíticas (de tal manera que esta proteína se autoprocesa) y un extremo amino con propiedades señalizadoras. Este gen pertenece a la familia de genes "erizo", que comprende tres genes importantes: "erizo sónico" (ES = SHH), "erizo desértico" (ED = DHH) y el EI (IHH), todos los cuales son genes reguladores del desarrollo en los mamíferos (en *Drosophila* fue encontrado primero el gen erizo, de polaridad segmentaria). Se sospecha que la acción del gen EI es indirecta, a través de otro producto, que a su vez estimula la producción de la proteína PrPTH.

Es interesante que el gen EI esté relacionado (y se exprese con posterioridad) al gen "erizo sónico", que interviene, entre otros procesos, en el desarrollo de los esbozos de los miembros (véase cap. 13). La conclusión de este párrafo es

que en cada proceso de desarrollo hay sofisticadas interacciones entre genes, y que además las respuestas dependen de la historia previa de cada célula. Por último, coincidiendo con la idea de que el conocimiento básico rinde siempre una aplicación imprevista, este mecanismo explica justamente una enfermedad: la *condrodisplasia metafisaria de Jansen*, en la cual está mutado el gen del receptor para la PrPTH.<sup>14</sup>

#### Osteogénesis: gen OSF2/CBFA1 y diferenciación de los osteoblastos

El plan organizativo del esqueleto se basa en el desarrollo previo de los moldes cartilaginosos de los huesos largos y las condensaciones de mesénquima en los futuros huesos craneanos (osteogénesis endocondral y endoconjuntiva, respectivamente), y es en esos primeros pasos, de los moldes cartilaginosos y endoconjuntivos donde intervienen los más numerosos y complejos factores reguladores, que deben establecer las posiciones espaciales de los esbozos y las



**Fig. 15-12.** Gen *OSF2/CBFA1*, el factor de transcripción activador de los osteoblastos. Los exones 1-4 codifican los dominios que son compartidos por el producto de este gen y las proteínas "runt", homólogos del gen "runt" de la segmentación de *Drosophila*.<sup>15</sup>

diferencias de estructura de cada esbozo. Una última etapa es la formación del tejido óseo en sí mismo, que depende básicamente de la diferenciación y la actividad de los osteoblastos, células formadoras de la matriz ósea y responsables de su mineralización; esta etapa, en teoría, debería tener un control más sencillo, puesto que ya existe la información de la posición y la estructura de los esbozos. Sin embargo, en 1997 fue sorprendente el hallazgo de un único gen responsable de la diferenciación de los osteoblastos y, a través de esto, de la formación de hueso.<sup>15,16,17</sup>

Los osteoblastos son células derivadas de "células osteoprogenitoras" del mesénquima o tejido conectivo indiferenciado. Forman capas monocelulares, parecidas a un epitelio, sobre el tejido cartilaginoso o sobre tejido óseo ya formado, y van depositando capas de sustancia osteoide, que seguidamente se mineraliza, con el depósito de hidroxipatita estimulado por la fosfatasa alcalina segregada por el osteoblasto. Estas células producen colágeno I (óseo), osteonectina (glucoproteína fosforilada, que se une al colágeno I y tiene afinidad por el catión calcio), osteopontina (otra glucoproteína, rica en ácido siálico) y, especialmente importante por ser secretada de manera específica por el osteoblasto, la "osteocalcina", proteína dependiente de la vitamina K y que se liga al calcio, o más propiamente, a la hidroxipatita (la osteonectina se expresa también en los condrocitos y la osteopontina en los condrocitos de la zona hipertrófica).

La anulación funcional ("noqueo" génico o reemplazo génico dirigido, véase cap. 5) de un gen que codifica un factor de transcripción, el gen *OSF2/CBFA1* (Factor Osteoblástico 2 o Factor Ligante Medular A1 = Core-Binding Factor A1), provoca la ausencia total de osteoblastos en animales de experimentación.<sup>15,16,17</sup> En consecuencia, no se forma ningún tejido óseo en estos animales; sin embargo, poseen los moldes cartilaginosos de sus huesos largos y las condensaciones conectivas de los esbozos de los huesos craneanos.

El gen *OSF2/CBFA1* se localiza en el cromosoma 6p21, posee ocho exones y dos formas alternativas de expresión, dado que posee un sitio de empalme críptico en el exón 1 (que permite usar la codificación del exón 0), aunque en la especie humana el ARNm sólo se inicia en el exón 1 (fig. 15-12).

Las informaciones sobre la anulación funcional de este gen en el ratón convergieron en 1997 con los datos de un "experimento natural" en la especie humana: los afectados por una malformación congénita, la *displasia cleidocraneal* (*DCC* = *CCD*), tienen uno de los alelos de este gen mutado (véase panel 15-1).<sup>15</sup>

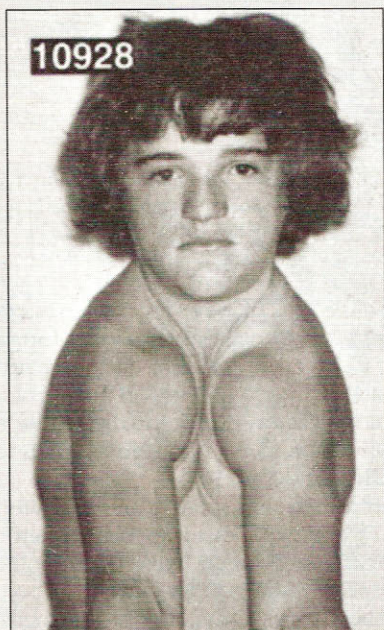
En la displasia cleidocraneal, el defecto es parcial, ya que se forma tejido óseo en la mayor parte del esqueleto; pero en ciertos sectores del esqueleto, la falta parcial de este factor de transcripción determina las malformaciones.

En el ratón experimentalmente desprovisto de este factor de transcripción, se han observado una disminución acentuada de la secreción de fosfatasa alcalina por parte de las células osteoprogenitoras y una ausencia total de osteocalcina y osteopontina, lo cual indica que, aparentemente, los genes de estas dos proteínas del hueso son genes "blanco" del factor de transcripción *OSF2/CBFA1*. Sin embargo, la ausencia de osteocalcina no es la causa de la falta de osteogénesis, porque la anulación del gen de la osteocalcina no bloquea la formación de hueso, sino que la desregula. Todos estos datos indican que la falta total del factor de transcripción *OSF2/CBFA1* provoca la falta de maduración de los osteoblastos, a través de un mecanismo de falla de la activación (o directamente una inhibición) de varios genes "blanco" de este factor.

### Genética del desarrollo vascular

El desarrollo del aparato circulatorio en el embrión es un imperativo que surge cuando, llegado a un cierto tamaño, este embrión muy temprano (tercera semana del desarrollo) ya no puede continuar abasteciendo a todas sus





**Fig. 1.** Paciente afectado por displasia cleidocraneal. La virtual ausencia de clavículas le permite aproximar sus hombros hacia el centro del pecho. (De Buyse, M.L., *Encyclopedia of Birth Defects*. New York, 1990; con autorización.)

**Panel 15-1. La displasia cleidocraneal y el descubrimiento del gen de diferenciación de los osteoblastos.** La displasia cleidocraneal (ausencia de clavículas y deformaciones de los huesos del cráneo) es una malformación congénita conocida desde la antigüedad. Los pacientes tienen una falta parcial o completa del desarrollo de las clavículas, lo cual les permite doblar los hombros hacia adelante hasta tocarse entre sí; además, hay una permanencia de las fontanelas, con falta de cierre de las suturas de los huesos planos del cráneo, abombamiento frontal y de los parietales, estatura reducida, huesos supernumerarios (wormianos), dientes supernumerarios, sínfisis pubiana ensanchada y falta de proporcionalidad en las falanges y los metacarpianos, con desarrollo intelectual normal (fig. 1).

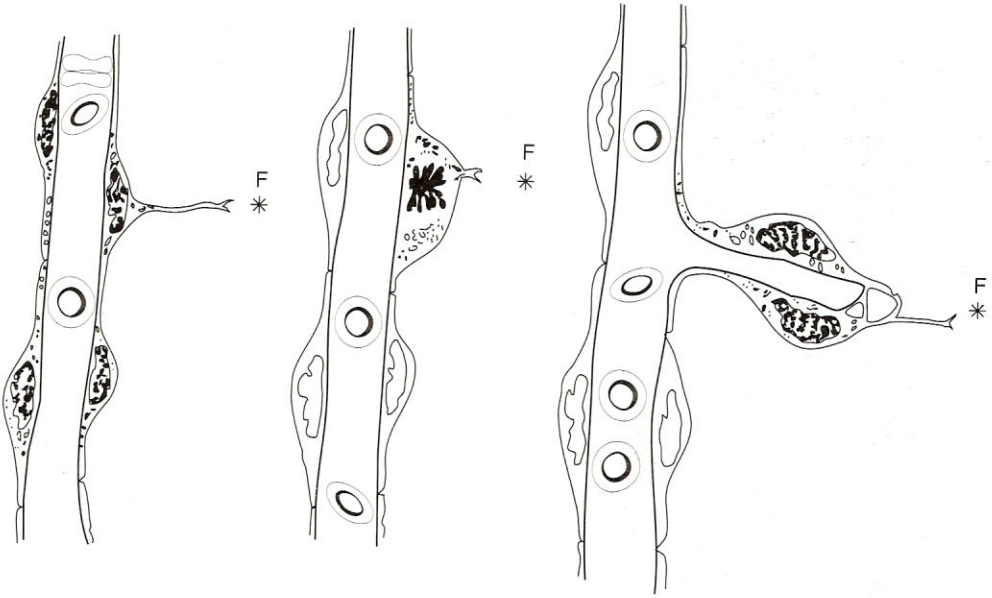
Esta malformación se hereda en forma autosómica *dominante*, y la búsqueda del gen causante fue iniciada hace tiempo; en 1997, simultáneamente con otras informaciones convergentes, se descubrió dicho gen, en el brazo corto del cromosoma 6p21, y resultó ser el mismo gen que regula la diferenciación de los osteoblastos, el gen del factor de transcripción *OSF2/CBFA1*.

Los enfermos son *heterocigotos* para un alelo mutado del gen *OSF2/CBFA1*. Las mutaciones pueden consistir en deleciones, en un codón de terminación que determina una proteína truncada o en una mutación de cambio de sentido, que hace perder a la proteína su afinidad hacia las secuencias del ADN promotor de los genes "blanco" sobre los que actúa este factor de transcripción; es decir que la dominancia de esta afección mendeliana obedece a una "insuficiencia haploide": el alelo normal no basta para mantener la función normal, que es la actividad normal de los osteoblastos. Por otra parte, la mutación en estado homocigótico es letal, como se observa en el ratón: no hay ningún grado de diferenciación de osteoblastos, no se forma tejido óseo y los animales mueren al nacer. El esbozo de la clavícula se origina en una mezcla de osificación endocondral y endoconjuntiva, lo que la torna especialmente sensible a una disfunción parcial de los osteoblastos.

células por simple difusión de los nutrientes y el oxígeno. El desarrollo de los primeros esbozos vasculares está íntimamente asociado con la aparición de las primeras células sanguíneas.

Ambos (vasos primitivos y células sanguíneas primitivas) surgen de "islotas celulares" del mesodermo visceral de la pared del saco vitelino, en el curso de la tercera semana. Las células





**Fig. 15-13.** Mecanismo básico del crecimiento vascular. El crecimiento de un vaso está determinado por el estímulo mitótico a un sector de su endotelio, que replica sus células en dirección a la fuente (F) del estímulo (quimiotaxis) y luego canaliza el brote para formar un tubo que inicia una rama del vaso.

mesenquimáticas centrales de estos islotes se diferencian en células hemopoyéticas, mientras que las células periféricas establecen uniones intercelulares muy precisas, de tipo ocluyente y de tipo nexo, y se transforman en células *endoteliales*. Todos los vasos primitivos, incluido el corazón, derivan de dichas células endoteliales, que son las células más importantes en este desarrollo, y que además son capaces de formar una membrana basal específica y de reclutar células adyacentes (pericitos), que a su vez modulan el desarrollo de los vasos. La célula endotelial conserva su capacidad mitótica durante toda la vida del organismo, como lo revela su replicación en cultivos, aunque en el organismo adulto su tasa habitual de división es lenta (meses o años). Además, está altamente especializada para la difusión y el transporte de sustancias del vaso al medio ambiente, ya que cuenta con un núcleo oblongo cuyo eje coincide con el del vaso, gránulos especiales (de Weibell), los organoides habituales y gran cantidad de uniones ocluyentes y nexo. La mitosis de la célula endotelial está altamente regulada: en el organismo adulto es estimulada mediante factores segregados por otras células, por heridas y sustancias irritativas. Pero las mitosis de estas células no dan lugar a células separadas, sino a brotes del endo-

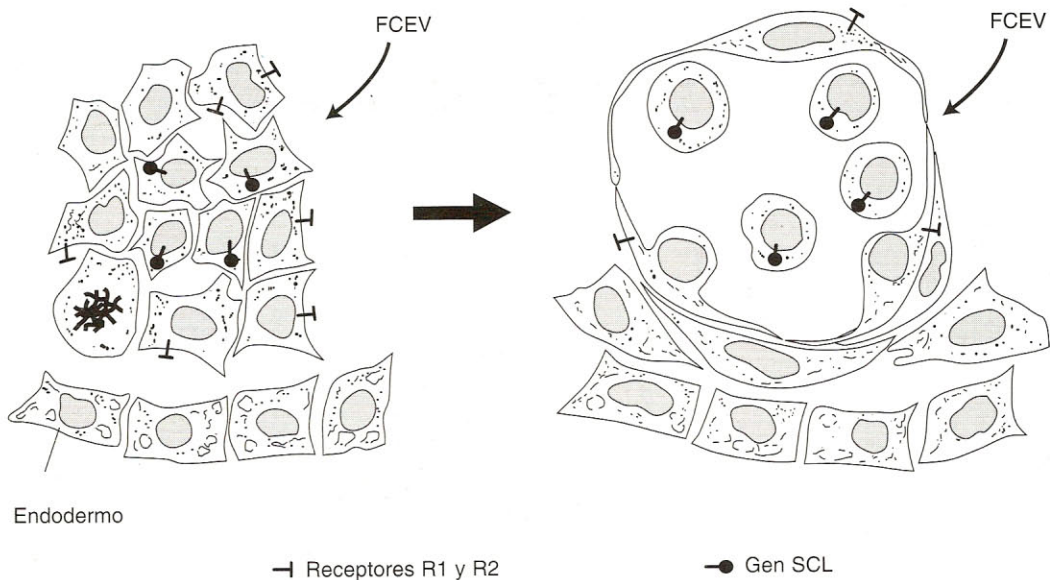
telio que se canalizan para formar *tubos*, es decir que siempre mantienen uniones intercelulares (fig. 15-13).

La formación y el crecimiento de los vasos están regulados por sustancias (ligandos) que se unen a receptores específicos en la membrana de las células endoteliales y que conforman un sofisticado sistema de señalización intercelular, iniciado en los receptores, que son "quinásas de tirosinas".<sup>18</sup>

Hoy en día, se distinguen dos tipos de procesos en la formación de vasos:

1. La *vasculogénesis*, o formación primaria de vasos en el embrión temprano, cuando se diferencian por primera vez los endotelios y las células sanguíneas.
2. La *angiogénesis*, el crecimiento de vasos a partir de endotelios preexistentes, ya sea durante el posterior desarrollo embrionario, el crecimiento posnatal, la neoformación local de vasos en tejidos adultos como la mucosa uterina en cada ciclo menstrual, y la neoformación patológica de vasos en los tumores. La angiogénesis se desarrolla básicamente por el proceso esquematizado en la figura 15-13, mientras que la vasculogénesis es un proceso único del embrión de la tercera semana (fig. 15-14).





**Fig. 15-14.** Vasculogénesis o formación primaria de vasos y células sanguíneas en el embrión temprano (tercera semana). Las células mesenquimáticas de los islotes, bajo la influencia de morfógenos, se diferencian en la periferia en endotelios y en el centro en células sanguíneas primitivas. El principal morfógeno es FCEV: Factor de crecimiento endotelial vascular. FCEV-R1 (= R1), FCEV-R2 (= R2): receptores 1 y 2 de endotelios. SCL: gen inductor propio de las células sanguíneas (factor de transcripción específico de células hemopoyéticas primitivas).

La vasculogénesis en el embrión de la tercera semana depende de diversos factores o sustancias morfogenéticas, de las cuales la más conocida es el "Factor de Crecimiento Endotelial Vascular" o FCEV (= VEGF en inglés); esta proteína está muy relacionada con otra similar, el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (FCDP = PDGF en inglés); ambas son secretadas por varios tipos celulares y actúan uniéndose a receptores específicos.

Los dos receptores del FCEV son el R2 y el R1 (en orden de aparición temporal). Ambos receptores son proteínas de la membrana citoplasmática de la célula endotelial, que tienen una porción intramembranosa, una externa con dominios similares a las inmunoglobulinas y una intracitoplasmática, que actúa como "quinasa de tirosinas", es decir, fosforila tirosinas, ya sea de la propia proteína receptora o de otras proteínas citoplasmáticas, iniciando así un circuito de señales que determina proliferación o diferenciación celular.

La anulación experimental del gen ("noquear" un gen, véase cap. 5) del FCEV-R2 en el ratón produce la falta de endotelios y de células hemopoyéticas (con muerte del embrión); en cambio, el "noqueo" del gen del FCEV-R1 no bloquea la hematopoyesis ni la proliferación de

células endoteliales, pero éstas no forman tubos, es decir, no hay vasos (también con muerte del embrión). Por consiguiente, las señales desencadenadas por los receptores 2 y 1 son plenamente diferentes; la desencadenada por R2 provoca la proliferación endotelial y la de R1 determina las interacciones correctas entre las células endoteliales, con la formación de tubos. La actividad del FCEV y sus receptores se mantiene en los tejidos en crecimiento y en la neoformación vascular en el adulto, pero además se agregan los procesos propios de la angiogénesis: las angiopoyetinas 1 y 2, su receptor Tie2 (Túnica interna endotelial, quinasa) y otros receptores como Tie-1 y demás factores angiogénicos, menos conocidos.

### La angiogénesis o desarrollo vascular secundario

La capacidad de crecimiento y reparación de la red vascular se mantiene durante toda la vida, pero está altamente regulada por un balance entre factores estimuladores (regulación positiva) e inhibidores (regulación negativa), como lo ha demostrado recientemente el descubrimiento de la acción antagonista de las



**Fig. 15-15.** Esquema de la angiopoyetina 2 (ANG-2, humana), inhibidora del reclutamiento de pericitos y antagonista de la angiopoyetina 1 (estimuladora). El gen humano respectivo es *ANGPT2*.

angiopoyetinas 1 y 2.<sup>19</sup> Ambas angiopoyetinas se unen al receptor Tie2 de los endotelios, pero ejercen acciones contrarias entre sí. El receptor Tie2 también es una quinasa de tirosina específica de endotelios, cuya función es controlar la capacidad, por parte de este tejido, de reclutar pericitos o células periendotheliales y, a través de ellos, mantener la integridad de la pared vascular o permitir que ésta se modifique para posibilitar un crecimiento vascular. Los dos ligandos, angiopoyetinas 1 y 2, son proteínas secretorias de alrededor de 75 kDa, que poseen una estructura muy similar, con un dominio de hélice superenrollada cerca del extremo amino y un dominio similar al fibrinógeno hacia el extremo carboxilo (fig. 15-15). La angiopoyetina humana ANG-2 tiene 496 aa.<sup>19</sup>

Las angiopoyetinas 1 y 2 actúan antagónicamente sobre la pared vascular: mientras la ANG-1 estimula la captación de pericitos, la estabilidad de la membrana basal endotelial y la de toda la pared vascular, la ANG-2 provoca la disociación entre endotelio y pericitos y el aflojamiento de la matriz intercelular y la membrana basal endotelial, facilitando la desestructuración del vaso en la región afectada. Esto permite bosquejar un esquema de la manutención del

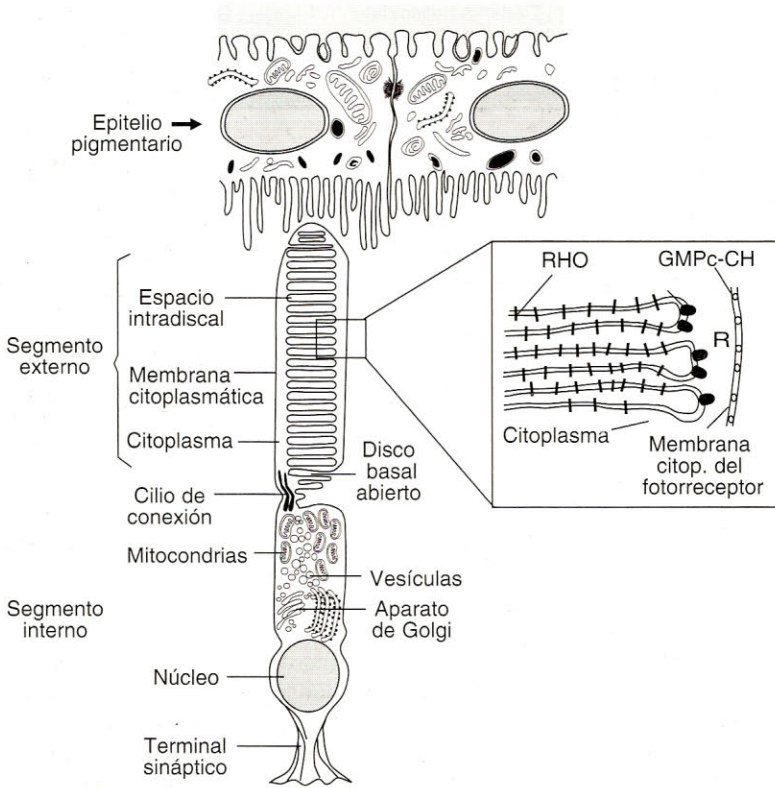
árbol vascular y de su remodelación cuando es necesaria (fig. 15-16).<sup>18</sup>

El balance de la acción de la ANG-1 y la ANG-2, aun siendo proteínas de estructura muy similar, se explica porque la ANG-1 induce la fosforilación en el receptor Tie2, mientras que la ANG-2 no sólo no induce fosforilación, sino que *inhibe* la acción de la ANG-1 que pueda estar presente, al unirse al mismo receptor. Mientras la expresión (transcripción) del gen de ANG-1 es muy extensa en el embrión y en el adulto, la expresión del gen de ANG-2 es extensa en el embrión pero es muy restringida en el adulto: se expresa selectivamente en la mucosa uterina, en el ovario y en la placenta. En estas tres localizaciones existe neoformación vascular periódica y fisiológica durante los ciclos sexuales y el embarazo, de modo que es de esperar que exista aumento de la secreción de ANG-2; pero además, y coincidiendo con lo esperado, se observó un aumento de la expresión del factor de crecimiento endotelial, FCEV, de tal manera que a la acción desestabilizante de la pared vascular de ANG-2 se suma la acción proliferativa del FCEV para determinar la neoformación vascular. Es necesario subrayar que este modelo de la angiogénesis no incluye todavía las acciones de otras sustancias, como la

Proceso:	Estabilidad	Regresión	Remodelación
Ligandos:	ANG-1	ANG-2	FCEV
Receptores:	Tie-2	Tie-2	FCEV-R1/R2
Acción:	Asociación de pericitos; estabilización del vaso	Disociación y aflojamiento de la pared vascular Apoptosis y atrofia vascular	Remodelación y crecimiento del árbol vascular

**Fig. 15-16.** Esquema de la angiogénesis, su capacidad de remodelación y de atrofia vascular (sólo se representan los factores más conocidos).





**Fig. 15-17.** Esquema de la ultraestructura de los segmentos externos de los fotorreceptores y de la capa final (externa) de la retina, el epitelio pigmentario. Al costado se amplifica un sector de un segmento externo con la ubicación de algunos productos génicos. RHO: rodopsina; R: proteína marginal o ABCR; GMPC-CH: canal regulado por GMP cíclico.

neurregulina y los inhibidores de la proliferación de endotelios, pero desde ya se lo considera un sistema regulador principal de la angiogénesis fisiológica y con posibles aplicaciones en la patología.

### Genética de los fotorreceptores retinianos

La retina contiene alrededor de 100 millones de bastones y unos 8 millones de conos. El primer tipo de fotorreceptor es más sensible a pequeñas variaciones de luz (visión en penumbra o crepuscular), mientras que el segundo permite la visión de los colores y además es responsable de la agudeza visual, ya que en la mácula lútea con su fovea o depresión (región central de la retina responsable de la agudeza visual) sólo hay conos. En la región de la papila (o emergencia del nervio óptico) no hay fotorreceptores. Por fuera de los fotorreceptores, y formando la capa más externa de la retina, se extiende la capa del

epitelio pigmentario, de gran importancia para el metabolismo y la función del resto de la retina (fig. 15-17).

Ambos tipos de fotorreceptores poseen la región fotosensitiva en sus "segmentos externos", cuya forma les da el nombre (cono o bastón) y que contienen un gran número de sacos aplanados, los cuales, a su vez, contienen las moléculas fotosensibles o pigmentos visuales: rodopsina en bastones, yodopsina en conos. Estos pigmentos visuales están formados por una parte proteínica (apoproteína), las opsinas, y un cromóforo derivado de la vitamina A, que es un aldehído (11-cis-retinal para la rodopsina). El retinal, aunque es una molécula pequeña en comparación con la opsina, sin embargo es indispensable para la fotosensibilidad, y se aloja en un hueco entre los dominios intramembranosos I y VII de la opsina, para unirse al residuo lisina N° 296 del dominio VII de la opsina. La opsina de la rodopsina es una proteína de membrana con siete dominios intramembranosos, un extremo carboxilo en el ci-

tosol y uno amino en el espacio intradiscal (fig. 15-18).

Al incidir luz sobre los sacos del segmento externo, el 11-cis-retinal se isomeriza instantáneamente por un fotón recibido a la forma 11-transretinal, y esta deformación del retinal se transmite a la opsina. Se produce entonces la cascada de fototransducción (la conversión de señal lumínica en impulso nervioso) con los siguientes pasos: 1) cambio conformacional del retinal y de la opsina, 2) unión de la opsina con la proteína G "transducina", 3) disociación de la subunidad  $\alpha$  de la transducina, 4) activación de la fosfodiesterasa de GMP cíclico, 5) hidrólisis del GMPc y disminución de éste en su localización sobre los canales iónicos, 6) cierre de los canales de sodio regulados por GMPc, 7) hiperpolarización de la membrana del bastón y 8) cambio (disminución) en la liberación de neurotransmisor en la sinapsis del fotorreceptor con la célula bipolar. Para la recuperación del fotorreceptor, intervienen la enzima guanilato ciclasa y la proteína "recoverina", afín al calcio.

Por otra parte, los fotorreceptores son células perennes que no se dividen en toda la vida adulta, a pesar de su muy intenso metabolismo, el cual se pone de manifiesto por la continua descamación y reposición de los sacos aplanados del segmento externo: se eliminan 4 o más sacos por hora y simultáneamente se reponen sacos nuevos; por ello, los mil sacos que posee un segmento externo se renuevan totalmente en diez días. A este altísimo metabolismo se asocia el epitelio pigmentario, que rodea con sus microvellosidades a los segmentos externos. El epitelio fagocita y elimina los componentes de los sacos descamados; además, provee un microambiente especial a los segmentos externos de los fotorreceptores.

En esta compleja función sensorial, los genes de las opsinas (proteínas) tienen un papel fundamental. Las mutaciones que afectan el patrón básico de la opsina impiden la función visual y la supervivencia de los fotorreceptores, de modo que sólo las alteraciones menores se detectan como trastornos de la visión, en especial en las *retinitis pigmentarias*.<sup>20,21</sup>

### Las retinitis pigmentarias: tipo de degeneración con causas variadas

Las retinitis pigmentarias (RP) constituyen un grupo de enfermedades hereditarias de la retina que han sido un ejemplo típico de heterogeneidad genética (véase cap. 6); existen patrones hereditarios autosómicos dominantes, auto-

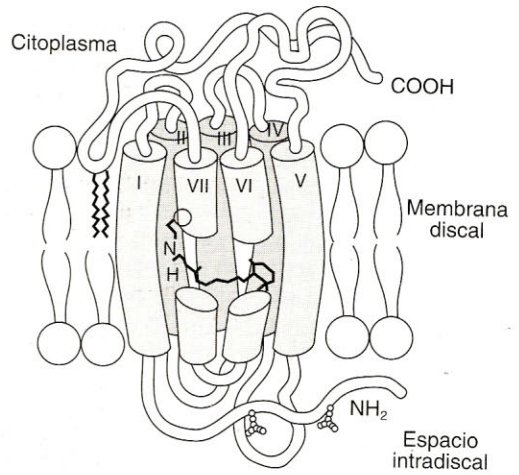


Fig. 15-18. Esquema de la molécula de rodopsina que contiene el 11-cis-retinal en el hueco entre los sectores intramembranosos I y VII.

sómicos recesivos, ligados al X, poligénicos (de 2 genes) y de herencia mitocondrial para este síndrome. Por otra parte, alrededor de 20 loci génicos se asocian, por estudios de ligamiento, con este tipo de enfermedad, y hay ya al menos siete genes clonados que están vinculados a las retinitis.<sup>20,21</sup> La forma más simple de explicar esta multiplicidad de causas es considerar que las retinitis pigmentarias son un tipo de degeneración retiniana, no una enfermedad única; es decir que la descripción de la retinitis pigmentaria como una afección con ceguera nocturna, pérdida progresiva de la visión periférica, afectación eventual de la visión central, anomalías del retinograma y observación en el fondo de ojo de depósitos espiculares del pigmento de la capa pigmentaria, con un desarrollo progresivo en la madurez, que puede conducir a la ceguera en la sexta década, es la expresión común de la degeneración de los fotorreceptores en dirección creciente hacia la mácula.

En apoyo a esta hipótesis, se describen los siguientes genes, cuya mutación se asocia a RP:

1. Gen de la rodopsina (opsina de bastones). Localizado en el cromosoma 3q21; se han observado alrededor de 100 mutaciones de este gen asociadas a RP, prácticamente todas dominantes.

El mecanismo de esta dominancia puede ser variable; algunas de las proteínas mutantes interfieren con el transporte de la proteína normal hacia el aparato de Golgi y finalmente a los sacos aplanados, es decir que ac-



tuarían como dominantes negativos. En otros casos, los sacos se forman y contienen las opsinas, pero las opsinas mutantes, con un plegamiento anormal, constituyen sacos menos compactos, que se eliminan más rápido que los normales y quizás excedan la capacidad de renovación, llevando a la muerte de los fotorreceptores.

2. Genes de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la fosfodiesterasa de GMPc (PDEA-PDEB). Situados en los cromosomas 5q31 y 4p16, sus mutaciones de cambio de sentido y sin sentido determinan formas recesivas de la RP (alelo nulo).
3. Gen de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio regulado por GMPc de los fotorreceptores. Localizado en 4p14, algunas mutaciones de cambio del marco de lectura originan RP de tipo recesivo.
4. Gen de la periferina (proteína de los extremos de los sacos, esencial para su biogénesis). Se han encontrado mutaciones de este gen en formas dominantes de RP, pero hay cierta superposición con enfermedades de la mácula.  
Por consiguiente, varios genes que afectan pasos diferentes de la cascada de transducción de señales pueden determinar RP.

### Degeneración macular y gen de la proteína marginal (ABCR)

A diferencia de las retinitis pigmentarias, las degeneraciones maculares (DM) comienzan o se focalizan en la mácula lútea. La degeneración macular es especialmente importante a edad avanzada, puesto que se encuentra presente en un 30% de las personas con edades de 75 años o superiores.<sup>22</sup> Hay varias formas hereditarias, de tipo mendeliano, de DM, de las cuales la más frecuente (1 en 10.000 nacimientos) es la enfermedad de Stargardt, que aparece entre la juventud y la madurez y se caracteriza por pérdida de la visión central y atrofia progresiva y bilateral de las máculas, con manchas amarillentas a su alrededor. Recientemente se descubrió un gen asociado a esta enfermedad; el gen, llamado ABCR (ATP-Binding Cassette transporter, Retinal), codifica una proteína de membrana, transportadora de lípidos y otras moléculas hidrofóbicas, que también es conocida como *proteína marginal* (Rim protein), por encontrarse localizada en la parte marginal de los segmentos externos de los fotorreceptores. Este gen ABCR se localiza en el cromosoma 1p21, tiene 51 exones y codifica la proteína, que posee 2 regiones

ligadoras de ATP y 12 dominios presumiblemente intramembranosos; las mutaciones asociadas a la enfermedad de Stargardt se localizan en especial en las regiones ligadoras de ATP; dichas mutaciones son recesivas. La función de la proteína marginal no está bien aclarada, pero se supone que interviene en la excreción de los productos derivados de la transducción de las señales lumínicas o de lípidos de los sacos aplastados. Esta proteína puede adquirir aún mayor importancia, si se confirma la observación de sus mutaciones en la degeneración macular de la ancianidad.<sup>22</sup>

### RESUMEN

El conocimiento del control genético de ciertos tejidos (epitelios, cartílago, etc.) está avanzando rápidamente por el clonado de genes relacionados de manera específica con cada tejido. La epidermis superficial es la región afectada por las ictiosis (*piel escamosa*), en su mayoría hereditarias. La ictiosis ligada al X es causada por mutaciones, en general deleciones, en el gen de la enzima *sulfatasa esteroideal*, que normalmente hidroliza ésteres de colesterol. La carencia de la enzima en las capas superiores de la epidermis determina que se acumule sulfato de colesterol en el espacio intercelular, y por ello se inhibe la descamación normal de laminillas córneas individuales y se forman grandes escamas. Otra enzima importante de los estratos espinoso superior y granuloso es la *transglutaminasa 1*, que produce puentes cruzados entre proteínas (involucrina y lorícina), los cuales llevan a la formación de la *envoltura cornificada* característica de los queratinocitos del estrato córneo y que se origina en el granuloso. Las mutaciones que inactivan esta enzima causan la *ictiosis lamelar* (bebés colodión). Las queratinas propias de las capas más superficiales (Q1, Q10, Q2e) también son fundamentales, porque determinan la resistencia a tensiones y presiones en las células de los estratos superficiales. Las mutaciones de alguna de estas queratinas pueden provocar, por citólisis del estrato granuloso, una proliferación excesiva en los estratos basales y un engrosamiento del estrato córneo, típicos de la *hiperqueratosis epidermolítica*. Las demás queratinas, por su parte, son importantes para preservar los estratos más profundos, como se observa en las mutaciones de queratinas basales, que determinan las epidermolisis ampollares, así como las mutaciones de las queratinas "duras" o tricócicas, Q16 y Q17, originan la paquioniquia congénita. Los canales iónicos están



formados por una o más proteínas de canal, que tienen varios dominios intramembranosos y que forman más de 100 tipos de canales selectivos para un determinado ion en varios tipos celulares (epitelios, músculo, neuronas). Las mutaciones que afectan un tipo de canal que no es esencial para la supervivencia del organismo, producen enfermedades hereditarias, como la fibrosis quística. Ciertos canales de  $K^+$ , codificados por el gen LQT2 y el gen KVLQT1, cuando están alterados por una mutación dominante de uno de sus genes, determinan una dificultad en la repolarización ventricular que se expresa en el síndrome del intervalo QT largo (del electrocardiograma). Los canales para agua, formados por la acuaporina 2 y presentes en los túbulos renales, pueden ser afectados por mutaciones recesivas que provocan un tipo de diabetes insípida. El plan genético del cartílago comprende la activación del gen para el colágeno II (principal de este tejido) y los de los colágenos menores IX y XI, el de la proteína POMAC, el de la transportadora de sulfato TSDD y algunos otros genes; todos ellos están regulados por genes "superiores", en especial los de las proteínas morfogenéticas de hueso y el producto del gen SOX9, que activa directamente al gen del colágeno II. El crecimiento de las metáfisis de los huesos largos está controlado por un mecanismo de retroalimentación negativa, formado por el gen *erizo índico* en los condrocitos proliferantes, cuya proteína actúa sobre el pericondrio, donde induce la activación del gen *PrPTH*, cuyo producto, a su vez, inhibe la diferenciación de condrocitos proliferantes a hipertróficos, cerrando el circuito.

Para la formación de hueso es fundamental la acción del gen *OSF2/CBFA1* (factor osteoblástico 2), que codifica un factor de transcripción activador de osteoblastos y cuya anulación total provoca la carencia de osteoblastos y de tejido óseo en animales; además, en estado heterocigoto en las personas provoca la *displasia cleidocraneal*. El desarrollo vascular tiene dos fases o procesos separables: la vasculogénesis o formación primaria de vasos en el embrión, y la angiogénesis o crecimiento a partir de vasos ya existentes. En el primer proceso intervienen el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) y sus receptores R2, que provocan proliferación endotelial, y R1, que dirigen las interacciones celulares para formar tubos.

En la angiogénesis actúan en forma antagónica la *angiopoyetina 1*, para estabilizar el vaso, y la *angiopoyetina 2*, para disociar sus paredes y permitir su remodelación; ambas actúan a través de su unión a un solo receptor, Tie-2.

Los fotorreceptores de la retina producen las proteínas (*opsinas*) de los pigmentos visuales y los demás componentes de la cascada de transducción de señales lumínicas en impulsos nerviosos, que incluyen una fosfodiesterasa de GMPc y las proteínas de los canales de sodio del fotorreceptor.

Diferentes mutaciones del gen de la rodopsina y de las proteínas citadas, y de otros genes, llevan a un tipo de degeneración de los fotorreceptores que se expresa en las variadas *retinitis pigmentarias*. A su vez, una forma de degeneración hereditaria de la mácula se debe a las mutaciones del gen de la *proteína marginal* o ABCR.

## REFERENCIAS

- Menon G, Ghadially R. Morphology of lipid alterations in the epidermis: A review. *Micr Res Technol* 1997; 37:180-192.
- Parenti G, Meroni G, Ballabio A. The sulfatase gene family. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7:386-391.
- Epstein EH. The genetics of human skin diseases. *Curr Opin Genet Develop* 1996; 6:295-300.
- Parmentier L, Blanchet-Bardon C, Nguyen S, Prud'homme J-P, Dubertret L, Weissenbach J. Autosomal recessive transglutaminase-1 and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1391-1395.
- Rice RH, Wong VJ, Price VH, Hohl D, Pinkerton KE. Cuticle cell defects in lamellar ichthyosis hair and anomalous hair shaft syndromes visualized after detergent extraction. *Anat Rec* 1996; 246:433-440.
- McLean WHI, Ugg EL et al. Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. *Nature Genet* 1995; 9:273-278.
- Keating MT, Sanguinetti MC. Pathophysiology of ion channel mutations. *Curr Opin Genet Develop* 1996; 6:326-333.
- Sanguinetti MC, Curran M, Spector P, Keating MT. Spectrum of HERG  $K^+$  channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93:2208-2212.
- Oksche A, Moller A, Dickson J, Rosendahl W, Rascher W, Bichet DG, Rosenthal W. Two novel mutations in the aquaporin-2 and the vasopressin V2 receptor genes in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Hum Genet* 1996; 98:587-589.
- Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. *BioEssays* 1996; 17:1039-1048.
- Horton WA. Molecular genetics of the human chondrodysplasias. *Eur J Hum Genet* 1995; 3:357-373.
- Bone dysplasias in man: molecular insights. *Curr Opin Genet Develop* 1996; 6:301-308.
- Bell DM, Leung KKH et al. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nature Genet* 1997; 16:174-178.
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian Hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996; 273:613-622.
- Mundlos S, Otto F et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997; 89:773-779.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. OSF2/CBFA1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89:747-754.



17. Komori T, Yagi H et al. Targeted disruption of CBFA1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89:755-764.
18. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277:48-50.
19. Maisonpierre PC, Suri C et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts angiogenesis. *Science* 1997; 277:55-60.
20. Berson EL. Retinitis pigmentosa: unfolding its mystery. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93:4256-4258.
21. Dryja TP, Li T. Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum Molec Genet* 1995; 4:1739-1743.
22. Allikmets R, Shroyer NF et al. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 1997; 277:1805-1807.

# Capítulo

# 16

## GENÉTICA DE ALGUNOS PROCESOS FISIOLÓGICOS

***Genética de la pigmentación humana. Color del cabello. Albinismos. Tejido adiposo. Genética de la obesidad. Genética del envejecimiento.***

### **Genética de la pigmentación humana: morenas, rubias y pelirrojas**

En el capítulo 6, luego de definir los albinismos, se resumieron las etapas que atraviesan las células formadoras de pigmento (los *melanocitos*) y se mostraron algunos aspectos del complejo proceso de la pigmentación. La genética de la pigmentación en la especie humana constituye un tema fascinante, que además tiene una vasta trascendencia social. Investigaciones recientes han mostrado los fundamentos generales que parecen regir la herencia del color del cabello, por un lado, y la de la tonalidad general de la piel, por el otro.<sup>1,2</sup>

Tal como se ha descrito con anterioridad, la formación de pigmentos melánicos depende inicialmente de la enzima *tirosinasa*, cuya falla determina el albinismo más frecuente (AOC-1A). Todos los pasos siguientes (fig. 6-12) están regulados por enzimas y factores no enzimáticos, cuyos genes se enumeran más adelante (cuadro 16-1).

No es sorprendente que los genes relacionados con la pigmentación humana sean numerosos, puesto que la pigmentación tiene un alto

valor selectivo en la evolución de la mayoría de las especies de mamíferos (en el ratón hay alrededor de 100 genes relacionados con ella; Barsh, 1996). Esta complejidad es esencialmente necesaria para una regulación muy sofisticada y precisa de la pigmentación, lo cual incluye varios aspectos: a) regulación espacial, b) regulación del tipo de pigmento y c) regulación funcional. La regulación espacial se refiere a que cada área de la piel, faneras y retina debe poseer la facultad de regular *localmente* la cantidad de pigmento: por ejemplo, los pezones, las áreas genitales, las palmas y las plantas del pie poseen una regulación especial, que requiere factores de acción local. La regulación del tipo de pigmento ha sido estudiada con éxito en los últimos tiempos; se refiere esencialmente a si el pigmento a producirse será *eumelanina* (rubio, castaño, marrón y negro, según la cantidad) o bien será *feomelanina* (rojo-amarillo, según la cantidad). La regulación funcional está relacionada con la capacidad de reaccionar con *mayor síntesis de pigmento* frente a un aumento de exposición a la luz solar. El mayor adelanto reciente se refiere al origen de los pelirrojos, es decir, las personas que sintetizan preferentemente feomelanina.<sup>1</sup> El factor más



**Cuadro 16-1.** Genes que intervienen en la pigmentación y migración de melanocitos

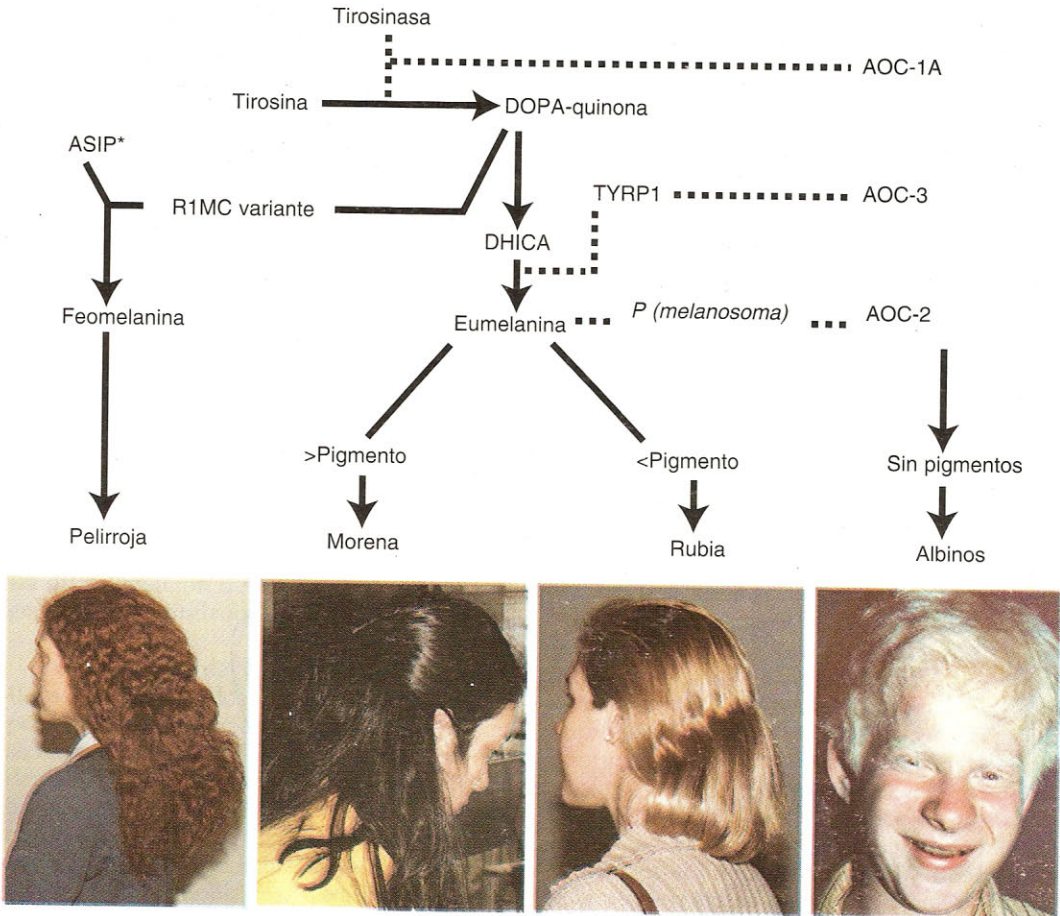
Gen	Producto y función	Defecto
TYR	Tirosinasa. Inicia la melanogénesis.	Albinismo AOC-1A.
TYRP2	Proteína 2 relacionada con la tirosinasa. Enzima que cataliza la reacción de DOPA-cromo a DHICA.	No identificado en humanos.
TYRP1	Proteína 1 relacionada con la tirosinasa. Enzima que cataliza la reacción de DHICA a eumelanina.	Albinismo ligero AOC-3 (humano).
P	Proteína integral de membrana del melanosoma.	Albinismo AOC-2 (humano).
POMC (Pro-opiomelanocortina)	ACTH; $\alpha$ -MSH y $\gamma$ -MSH (hormonas estimulantes de melanocitos).	No viable.
ASIP	Proteína antagonista del receptor de melanocortinas. Secreción de acción local (paracrina).	Posible responsable de una minoría de pelirrojos (hiperfunción).
R1MC	Receptor 1 de melanocortinas. Proteína de 7 segmentos transmembranosos, acoplada a proteína G; aumenta el AMPc.	Alelos variantes dan pelirrojos y piel blanca.
EDN3	Endotelina 3. Proteína requerida por melanoblastos.	No identificado en el hombre
ENDRB	Receptor B de endotelina. Requerido por células derivadas de la cresta neural.	Enfermedad de Hirschsprung.
KIT	Protooncogén. Receptor de quinasa de tirosinas.	Piebaldismo (mechón despigmentado)
MGF	Factor de crecimiento de mastocitos; ligando del receptor KIT. Requerido por precursores de melanocitos.	No identificado.

importante para el cabello rojizo es el tipo variante de alelos para el gen del *receptor 1 de melanocortinas* (R1MC). Nueve variantes alélicas (genes ligeramente diferentes del habitual) de este gen han sido halladas en la mayoría de un grupo de 38 pelirrojos que a su vez integraban un grupo mayor de 135 personas, de las cuales 76 eran morenas; y entre las morenas sólo 11 poseían alelos variantes del gen. La probabilidad de que una persona sea pelirroja cuando posee dos variantes alélicas del gen R1MC es 170 veces mayor que la de la población general (Barsh, 1996). Casi todas las variantes del gen R1MC disminuyen la función de este receptor, que en condiciones normales determina un aumento en la concentración intracelular de AMPc, el cual a su vez es necesario para la síntesis de eumelaninas. Por consiguiente, el receptor débil (variante alélica) R1MC da lugar a una desviación de la melanogénesis hacia la síntesis de feomelaninas, con el consiguiente resultado de pelo rojizo, piel blanca y escasa capacidad para broncearse la piel (fig. 16-1). Este rasgo se transmite como dominante (con penetrancia variable) respecto del color rubio, y recesivo frente al moreno.

A pesar de su importancia, las variantes alélicas del receptor de las melanocortinas no son

el único origen del pelo rojizo, puesto que este rasgo no segrega como un carácter simple y recesivo frente al color oscuro. Al menos otro gen interviene también en el origen de los pelirrojos: el gen ASIP, homólogo del gen "Agouti" del pelaje del ratón. El producto de este gen ASIP es una proteína antagonista del receptor R1MC de las melanocortinas, y de secreción paracrina, es decir, de efectos locales. Por consiguiente, el efecto de ASIP es similar al de los receptores débiles R1MC de los pelirrojos, pero limitado a una acción local. Por consiguiente se postula que variantes alélicas de ASIP, con afinidad más elevada por el receptor que la normal ("ganancia de función"), son otro de los orígenes de pelo rojizo, ya sea de áreas limitadas o en general.

Con respecto a los factores que regulan la cantidad de eumelanina producida en condiciones normales, y que da lugar a los matices rubio, castaño y oscuro (negro) del cabello, aún se desconocen en gran medida. Sin embargo, se sabe que las variantes alélicas del gen P, codificante de una proteína integral de los melanosomas, y que por pérdida de función determinan el albinismo AOC-2, producen un fenotipo pigmentario asociado al origen racial del individuo. De la misma forma, se sospecha que otro



**Fig. 16-1.** Los variados caminos de las melaninas humanas. El asterisco en el gen ASIP señala las variantes alélicas con un efecto minoritario en el cabello rojizo.

genes del camino de las eumelaninas, incluido el inicial TYR, pueden presentar variantes alélicas asociadas al origen racial.

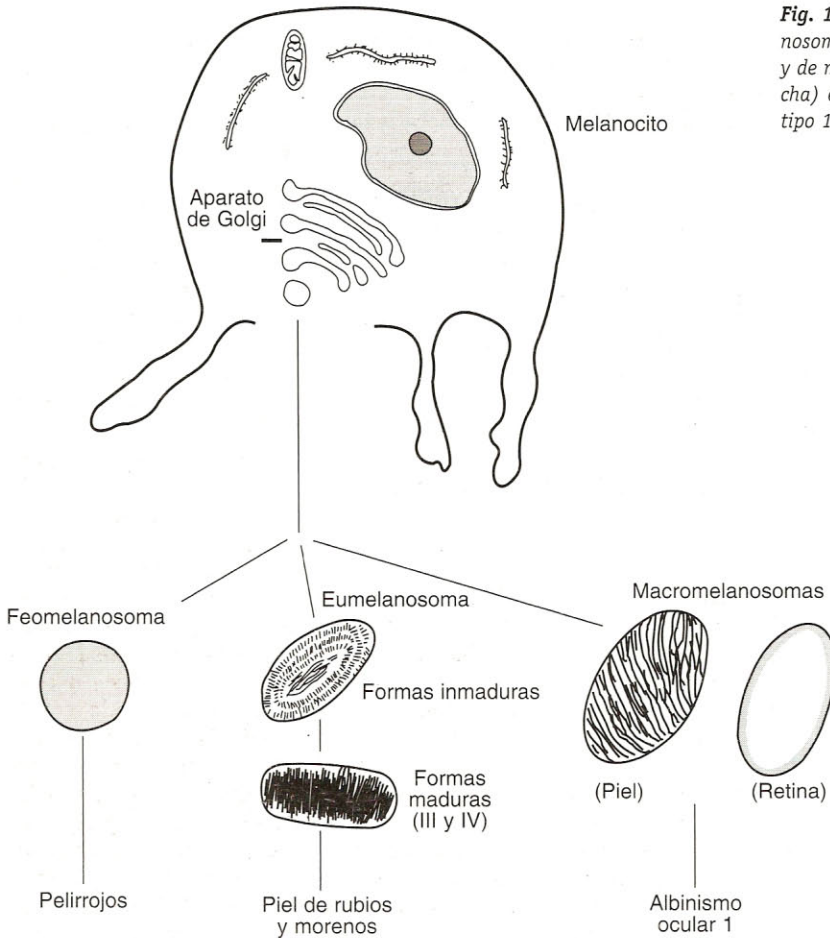
### La fabricación del pigmento: melanocitos y melanosomas. Albinismo ocular 1

El pigmento melánico es sintetizado principalmente en dos tipos de células: los melanocitos de la piel (derivados de la cresta neural) y el epitelio pigmentario de la retina (derivado de la capa externa de la vesícula óptica).

En ambos tipos celulares, la melanogénesis es similar: se desarrolla en los corpúsculos denominados *melanosomas*, citados antes. Estos orgánulos se desarrollan a partir del aparato de Golgi, aunque no se conoce bien el mecanismo de su formación, en el cual probablemente in-

terviene la fusión de vesículas específicas o *pre-melanosomas* con vesículas propias derivadas del aparato de Golgi. Los melanosomas son corpúsculos rodeados por una membrana simple y de forma, tamaño y contenido variables. Como se mencionó con anterioridad, puede clasificarse a los melanosomas en dos grandes grupos: los feomelanosomas (circulares, de contenido poco estructurado y con enzimas relativamente solubles) y los eumelanosomas (elípticos, de contenido muy estructurado o paracristalino y con enzimas insolubles). A medida que un eumelanosoma se hace más maduro, el pigmento ocupa todo el espacio y oculta la estructura subyacente (fases III y IV). Recientemente se pudo relacionar una mutación que produce albinismo ocular de tipo 1 (AO-1) con una deformación específica de los melanosomas: la producción de corpúsculos mucho más grandes que los normales, llamados *macromelanosomas* (fig. 16-2).<sup>3</sup>





**Fig. 16-2.** Formación de melanosomas normales (izquierda) y de macromelanosomas (derecha) en el albinismo ocular de tipo 1.

En los pacientes con el albinismo AO-1, que es ligado al sexo (es decir que el gen determinante está en el cromosoma X humano), hay reducción de la agudeza visual, nistagmo y fotofobia, con un iris translúcido y una retina muy poco pigmentada. En cambio, en la piel hay sólo una disminución ligera del pigmento normal. Tanto en el epitelio pigmentario de la retina como en los melanocitos de la piel se hallan los característicos *macromelanosomas*, que en la piel poseen pigmento, pero en la retina están casi desprovistos de melanina. El gen OA-1, localizado en Xp22.3, codifica un ARNm que tiene un marco abierto de lectura de 1.272 pb, codificantes de una proteína de 404 aa. con varios dominios hidrofóbicos.<sup>4</sup> Ésta ha sido identificada como una proteína integral de membrana en los melanosomas, que se encuentra alterada (por deleciones o inserciones que modifican el marco de lectura) en los pacientes con AO-1, quienes desarrollan macromelanosomas.<sup>3</sup> Aún se desconocen las diferencias de regulación que permiten la melano-

génesis en los macromelanosomas de la piel pero no en los del epitelio pigmentario de la retina.

### Las hormonas $\alpha$ y $\gamma$ estimulantes de melanocitos (MSH $\alpha$ , MSH $\gamma$ ) y su proteína precursora, pro-opiomelanocortina

La pigmentación humana está íntimamente relacionada con el sistema hormonal, como lo muestra el aumento de pigmentación en la hipofunción de la corteza adrenal (enfermedad de Addison), en la cual la hipófisis segrega un exceso de hormona estimulante, adrenocorticotrofina (ACTH). La ACTH está codificada por el gen de una gran proteína precursora (poliproteína) de varias proteínas, la pro-opiomelanocortina (POMC), que por proteólisis produce varios péptidos: la ACTH, las hormonas estimulantes de los melanocitos (MSH en inglés) y la  $\beta$ -endorfina.

El gen de la POMC se expresa en especial en las células del lóbulo anterior y de la región intermedia de la hipófisis y en neuronas hipotalámicas, pero los productos producidos finalmente son diferentes, debido a empalmes diferenciales y sobre todo a proteólisis postraduccional. La principal hormona activadora de melanocitos, la  $\alpha$ -MSH, posee una regulación especial para unirse al receptor 1 de melanocortinas (R1MC), pues existe una proteína secretoria de acción local (secreción paracrina), la proteína ASIP, antagonista del receptor R1MC, que anula la acción de la MSH, como se mencionó antes. Con anterioridad a esta etapa, que ocurre en el melanocito maduro, existen pasos previos que incluyen la migración de las células precursoras (melanoblastos) y la diferenciación de los melanocitos.

### La diferenciación de los melanocitos: gen MTF y síndrome II de Waardenburg

Los síndromes de Waardenburg de tipos I y II están relacionados con los melanoblastos, pero en distintas etapas de su desarrollo. Como se vio en el capítulo 13, el síndrome de Waardenburg de tipo I está asociado con una pérdida de función del gen PAX3 que determina, entre otros efectos, la alteración de una subpoblación de células de la cresta neural, precursoras de los melanoblastos. En el síndrome de Waardenburg de tipo II (de herencia autosómica dominante) hay despigmentación de la piel y del cabello en parches, despigmentación del iris y sordera, sin que exista una distancia de separación aumentada entre los ojos (distopia cantorum). En él se ha sospechado la existencia de una anomalía generalizada de los melanocitos, a semejanza de lo observado en ratones con la mutación "microftalmía"; en la actualidad se ha comprobado la existencia de mutaciones en pacientes con este síndrome de tipo II, que afectan el gen MTF (Factor de Transcripción asociado a "Microftalmía") y determinan una falla en la diferenciación de los melanocitos. En coincidencia con esta observación, recientemente se ha comprobado en una línea celular de cultivo que el gen humano MTF, transfectado a esta línea de fibroblastos embrionarios, induce un cambio morfológico, ya que las células adoptan un aspecto dendrítico, y además induce la aparición de marcadores de la síntesis de melanina, como la tirosinasa y la TYRP1.<sup>5</sup> Por consiguiente, el factor de transcripción MTF tiene un papel decisivo en la diferenciación de los melanocitos.

### Resumen integrativo del desarrollo de la pigmentación

Todos los seres humanos (blancos y oscuros, rubios y morenos, pelirrojos y morochos) dependemos de la enzima tirosinasa para el desarrollo de la pigmentación de la piel, el cabello y el iris. De ahí que la falla de esta enzima puede desencadenar el albinismo en cualquier grupo racial y en cualquier lugar geográfico, dando lugar a que en comunidades indígenas de tez oscura ocurran nacimientos de niños albinos, de tez muy blanca y cabello muy claro, que han sido llamados "hijos de la luna" en ciertas culturas aborígenes (fig. 16-3).

Sin embargo, hay albinismos que no dependen de la tirosinasa (los "tirosinasa positivos"), lo cual está indicando que esta enzima es necesaria pero no suficiente para la melanogénesis. Esto es así porque además, es imprescindible la diferenciación correcta de las células especiales que producen pigmento, los melanocitos; debe producirse la migración correcta de sus precursores, los melanoblastos, desde la cresta neural; es necesaria la estimulación adecuada por la hormona MSH y la presencia de sus receptores normales en los melanocitos; también debe tener lugar la formación normal de los organoides citoplasmáticos donde se fabrica el pigmento, los melanosomas, y deben estar presentes sus componentes proteicos normales y, finalmente, es necesaria la movilización del pigmento desde el melanocito hasta las células que lo acumulan. En esta sucesión de pasos están implicados muchos otros genes, que llevan no sólo a la producción de ciertos defectos de la pigmentación, sino también a la gran gama de variaciones del color de la piel, el cabello y el iris, para fortuna y belleza de la especie humana, que atesora así un bagaje de variedad génica y de aspectos del fenotipo.

### Tejido adiposo y sus variedades (blanco y pardo)

El tejido adiposo se origina en el mesodermo del embrión, a partir de un linaje celular que comienza con células totipotenciales (con capacidad para formar cualquier tejido), que van restringiendo gradualmente su aptitud para diferenciarse y llegan a ser células multipotenciales, con capacidad de dar tres tejidos: muscular, cartilaginoso y adiposo. En este tipo celular multipotencial se produce un compromiso de desarrollo hacia cada uno de los tres tipos celulares mencionados, el cual depende del proceso





**Fig. 16-3.** La aparición de niños albinos ocurre por azar en todas las razas. En este caso, en una familia centroamericana, los denominan "hijos de la luna". (Cortesía del Prof. Dr. Alejandro A. Cordero).

de metilación del ADN (ya que puede ser inducido por agentes desmetilantes como la 5-azacitidina), pero aún no se han aislado el o los genes responsables del "compromiso" para diferenciarse en adipocito. Sin embargo, se ha observado que en estos preadipocitos ya está determinado el camino a seguir, si será un adipocito de grasa parda o uno de grasa blanca; esto sugiere que los dos tipos de adipocitos pueden considerarse tejidos diferentes (fig. 16-4).

La diferenciación morfológica de los dos tipos de adipocitos es muy evidente, puesto que el de grasa blanca forma una única gota lipídica a partir de gotas confluyentes (adipocito unilocular), mientras que el de grasa parda mantiene los lípidos en numerosas gotas pequeñas (adipocito multilocular). Además, el adipocito pardo posee una gran cantidad de mitocondrias (responsables del tono pardo) y el tejido que forma está muy vascularizado, mientras que con la grasa blanca ocurre lo contrario.

A medida que el preadipocito del linaje blanco se diferencia, aparecen marcadores de esa diferenciación: en términos generales hay una disminución de la síntesis de proteínas del citoesqueleto y un aumento de proteínas señalizadoras (receptores) y de enzimas de la lipogénesis y de la lipólisis. Además, en la etapa de preadipocito también ocurre la aparición de colágeno de tipo VI (COL6A2) y una lipasa de lipoproteínas. Cuando esta célula pierde la capacidad mitótica, empiezan a aparecer marcadores

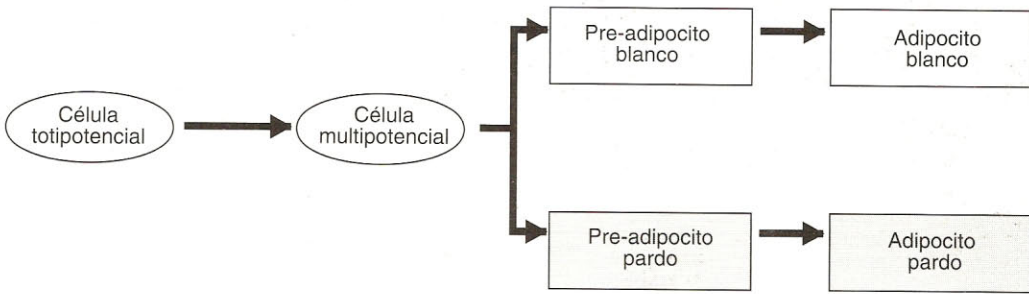
tardíos de la diferenciación en adipocito: la *proteína ligadora de lípidos del adipocito* (ALBP = AP2), una proteasa de serinas llamada *adipsina* y la proteína del gen "*obese*" llamada *leptina*. Esta última ha cobrado gran interés por su papel en el equilibrio de la acumulación de grasas.

Para la diferenciación del preadipocito del linaje pardo, el marcador exclusivo es la *proteína desacoplante* (PDA = UCP), que es una proteína translocadora de protones, de 32 kDa, localizada en la membrana mitocondrial interna, la cual actúa como desacoplante de la cadena respiratoria mitocondrial.<sup>6</sup>

### Factores de transcripción en la diferenciación del adipocito

Dado que se conocen varios marcadores de la diferenciación del adipocito (mencionados antes), es de esperar que existan factores de transcripción que determinen la aparición de dichos marcadores; estos factores deberían tener afinidad por los promotores en los genes de los marcadores. En efecto, se han caracterizado varios factores con esas particularidades: 1) el Receptor Activado por (agentes) Proliferantes de Peroxisomas, subtipo  $\gamma$  (RAPP $\gamma$  = PPAR $\gamma$  en inglés), es un receptor nuclear (de la familia de receptores nucleares de hormonas) al cual se le atribuye un papel fundamental en la diferenciación de los adipocitos; 2) el Receptor Activado





**Fig. 16-4.** Diferenciación de los adipocitos de grasa blanca y parda.

por Ácidos Grasos (RAAG = FAAR), miembro de la familia de receptores de esteroides, y 3) la Proteína  $\alpha$  Ligadora de Intensificador o de CAAT ( $P\alpha LI/CAAT = C/EBP\alpha$ ), que es una proteína con afinidad por varios promotores, incluido el de su propio gen, y que posee un dominio ligador de ADN y una cremallera de leucinas. De todos estos factores de transcripción, el de mayor importancia es el RAPP, subtipo  $\gamma$ , que se expresa casi exclusivamente en adipocitos; este factor  $RAPP\gamma$  forma un heterodímero con el receptor del retinoide X, y dicho heterodímero controla el gen del marcador AP2 (proteína ligadora de lípidos) de los adipocitos. Estos tres factores de transcripción conocidos del adipocito blanco pueden ser inducidos por un número de hormonas y metabolitos (glucocorticoides y hormona de crecimiento, ácidos grasos, ácido retinoico y otros) (fig. 16-5).

### Genes relacionados con la obesidad experimental en el ratón

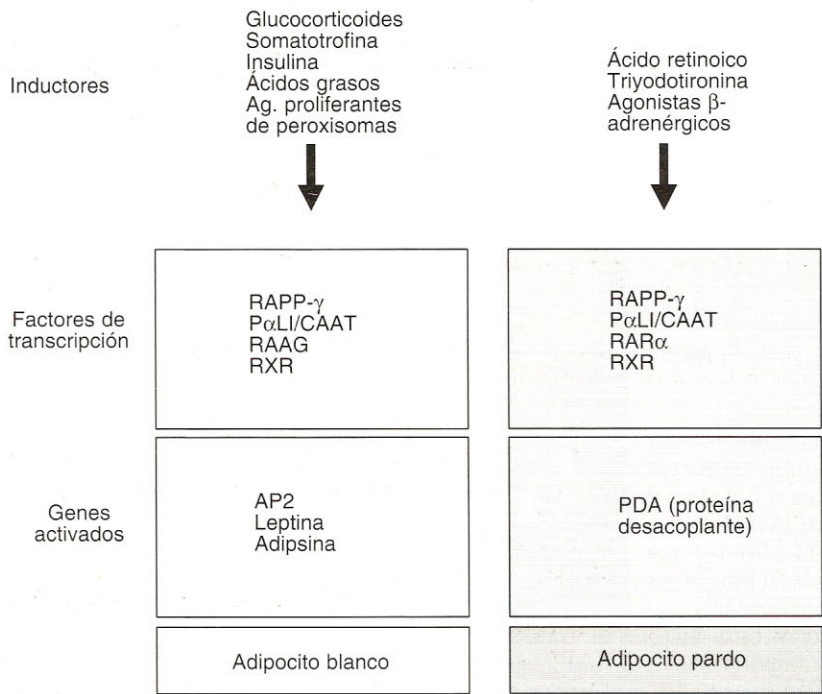
Entre 1994 y 1997, se realizaron varios hallazgos sobre genes que afectan la obesidad experimental en el ratón, que rápidamente encontraron gran publicidad en los medios, en especial el descubrimiento de la proteína "leptina". Aunque estos hallazgos no proveyeron una medicación para la obesidad humana, frustrando las exageradas expectativas, constituyen un importante adelanto para explicar los mecanismos del balance de las grasas y del peso corporal, que incluye a la especie humana. En los párrafos siguientes, se mencionan genes del ratón (abreviados en minúsculas) y sus homólogos humanos (mayúsculas). Cinco genes aparecen vinculados con la obesidad experimental del ratón (cuadro 16-2).<sup>7-9</sup>

Estos genes fueron identificados en el ratón por sus mutaciones, las cuales determinan obe-

sidad hereditaria. Sin embargo, las obesidades hereditarias del ratón difícilmente se equiparan a la obesidad humana, de modo que no pueden extrapolarse estos síndromes del ratón al ser humano; en cambio, cada uno de ellos identifica un proceso especial del metabolismo o de señalización, que tiene un proceso homólogo, normal, en la especie humana.

La leptina es una proteína segregada específicamente por adipocitos blancos. Esta proteína, de 167 aa., es muy conservada entre los vertebrados y se la considera una de las proteínas propias del tejido adiposo, cuya cantidad en el plasma es proporcional a la cantidad de grasa total del cuerpo. El gen humano de la leptina está en 7q31, ocupa alrededor de 20 kb y consiste en tres exones, aunque la región traducida se extiende sólo del final del exón 2 al exón 3. La proteína tiene un péptido señal de 21 aa., que sugirió desde el principio el carácter secretorio de esta proteína; y dado que actúa a distancia, sobre células hipotalámicas que poseen receptores específicos para ella, se la considera una hormona. La función de la leptina, sin embargo, presenta todavía muchos aspectos poco conocidos; se considera que interviene en el circuito de regulación del peso corporal, muy probablemente *inhibiendo la secreción del neuropéptido Y*. Ahora bien, para ejercer su acción sobre las neuronas hipotalámicas, la leptina debe atravesar la barrera hematoencefálica, pasar al líquido cefalorraquídeo, y encontrar sus receptores específicos en las neuronas blanco; es decir, la leptina no actúa directamente, y es engañoso pensar que es un remedio para la obesidad. En realidad, en las personas obesas hay niveles altos de leptina en la sangre, proporcionados a su masa de tejido graso, y hay una aparente incapacidad de la leptina de ejercer su función reguladora, una "resistencia aparente" a la leptina. En la especie humana no se conoce ninguna mutación del gen de la leptina que se





**Fig. 16-5.** Factores de transcripción involucrados en la diferenciación de los adipocitos blanco y pardo y algunos de sus inductores. RAPP-γ: receptor activado por (agentes) proliferantes de peroxisomas, subtipo γ; PαLI/CAAT: proteína α ligadora de intensificador o CAAT; RAAG: receptor activado por ácidos grasos; RARα: receptor α del ácido retinoico; RXR: receptor del retinoide X.

halle en personas obesas, lo cual está de acuerdo con la noción de que la leptina no es responsable de la obesidad humana ni es útil para su tratamiento, aunque interviene normalmente en la regulación del peso corporal y probablemente también en la respuesta adaptativa al ayuno (ante un ayuno pronunciado, hay una inhibición de la secreción de gonadotrofinas y hormonas esteroideas; esta reacción es anulada por la leptina). En el ratón, con la mutación del gen de la leptina (ob) en los dos homólogos, la carencia de una leptina funcionante es en realidad el origen de la obesidad: los ratones

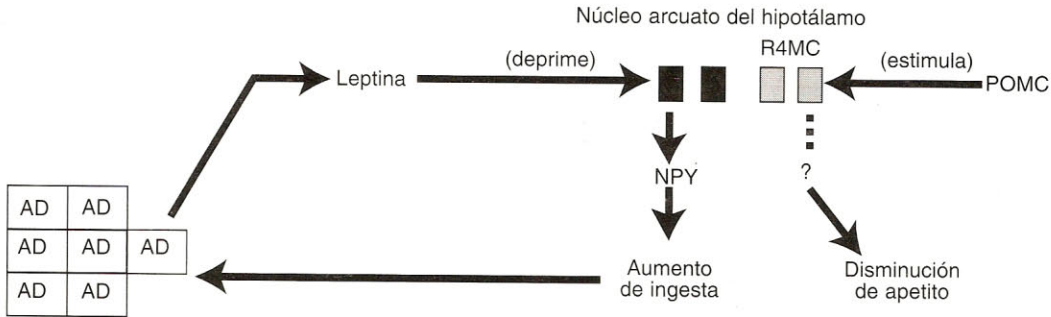
se comportan como si tuvieran apetito permanente y llegan a triplicar el peso normal; se pueden normalizar por administración de leptina. El problema es que en la obesidad humana este paso no está alterado.

El segundo de los genes importantes es el gen *db* (*LEPR*), que codifica el receptor de la leptina en las neuronas; la mutación anuladora de este receptor en el ratón tiene efectos parecidos a la mutación del gen de la propia leptina; pero nuevamente, en la especie humana, no se observan mutaciones de este receptor que estén asociadas con la obesidad. El gen de este recep-

**Cuadro 16-2.** Genes asociados con la obesidad experimental del ratón

Gen	Locus (humano)	Producto	Tejido*	Función
ob (LEP)	7q31	Leptina	Adipocito blanco	Señal al hipotálamo
db (LEPR)	1p31	Receptor de leptina	Neuronas hipotalámicas	Activación génica
Ay (ASIP)	20q13	Proteína "Agouti"	Piel y otros tejidos	Bloquea receptor de MC
fat (CPE)	4q28	Carboxipeptidasa E	Endocrinos	Procesa péptidos
tub (TUB)	11p15	Proteína hipotalámica	Hipotálamo	Señal neuronal

\*Principal tejido en el cual se expresa cada gen. Entre paréntesis, la sigla del gen humano homólogo.



**Fig. 16-6.** Interacciones postulas entre los adipocitos y las neuronas hipotálamicas. AD: adipocitos; NPY: neuropéptido Y; R4MC: receptor 4 de melanocortinas; POMC: pro-opiomelanocortina.

tor codifica una proteína de membrana, de 894 aa., que pertenece a una familia de receptores de citoquinas. El gen db tiene señales para empalmes alternativos; y en efecto, hay variantes de esta proteína receptora que tienen su origen en estos empalmes.

El tercero de los genes asociado con la obesidad del ratón es el de la proteína “Agouti”, que en la especie humana es el gen ASIP, al cual encontramos en el estudio de la pigmentación (véase al comienzo de este capítulo). ASIP y la proteína “Agouti” antagonizan y bloquean a los receptores de melanocortinas, y de esa manera llevan a cambios en la pigmentación, por antagonizar con la hormona estimulante de los melanocitos (MHS). Sin embargo, aparte del receptor 1 de melanocortinas (R1MC) que interviene en la melanogénesis, hay otros receptores de melanocortinas con funciones diferentes; en especial, el receptor 4 (R4MC), que se encuentra en el hipotálamo y que está vinculado a la obesidad experimental del ratón “Agouti”. Estos receptores intervienen en un circuito de regulación del peso corporal, de donde se ha deducido que su activación normal, o su activación inducida por drogas, disminuye el apetito.<sup>9</sup>

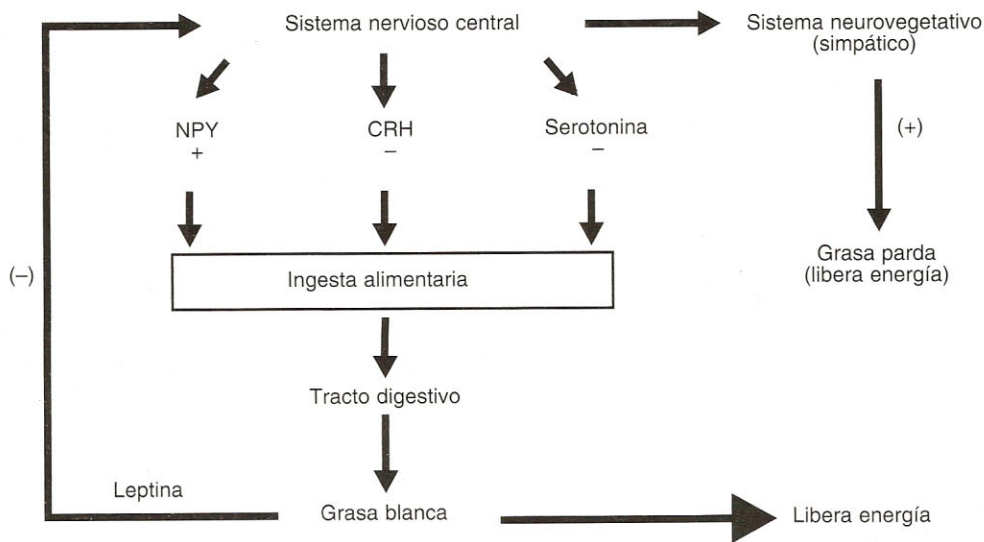
Los otros genes que figuran en el cuadro 16-2 tienen funciones secundarias y son menos conocidos. En resumen, en la actualidad se postula un esquema de regulación del peso corporal con diversos pasos hormonales, en los cuales la leptina, producida por los adipocitos en proporción a su masa, indica a las neuronas hipotálamicas el nivel de reservas adiposas; estas neuronas, que sintetizan un péptido de 36 aa., llamado neuropéptido Y (NPY), estimulador poderoso del apetito, son frenadas por la leptina; mientras otras neuronas, que poseen el receptor 4 de melanocortinas (R4MC) y que son estimuladas por péptidos derivados de la proteína precursor-

ra POMC, producen una señal, no identificada aún, que deprime el apetito (fig. 16-6).

### La regulación del peso corporal (o de la energía) en la especie humana

En las personas adultas existe un balance normal entre la ingesta de alimentos (que puede equipararse a un ingreso de energía química) y la suma del gasto energético, dado por el metabolismo basal más la actividad realizada. Es decir que la masa corporal se mantiene constante, incluyendo en ella el tejido adiposo. Esta regulación se mantiene por años, de tal manera que requiere un mecanismo de ajuste muy bien controlado, en donde el tejido adiposo es mantenido en un nivel constante, cuyo punto de equilibrio está influenciado por el genoma del individuo; es decir que el genoma puede influir sobre un punto de equilibrio hacia la esbeltez o hacia el redondeamiento, ambos constitucionales o fisiológicos. Es poco probable que el genoma, por sí mismo, lleve al exceso de las obesidades patológicas, es decir, las que deterioran las funciones normales, favorecen la diabetes, propician las artrosis y otros problemas articulares, predisponen a la hipertensión y reducen las actividades normales, y que además plantean un problema estético y psicológico a los afectados. Este último aspecto (el psicológico o estético) es muchas veces el principal planteo de los pacientes, afectados real o imaginariamente por una obesidad que puede no ser patológica, la cual debería deslindarse con claridad de las tendencias constitucionales a la magritud o al rellenamiento, que contienen un factor genético y no requieren tratamiento médico ni una ingeniería genética a medida de los solicitantes. Nuevamente, conviene recordar que la esbeltez o el rellenamiento constitucionales son varian-





**Fig. 16-7.** Algunas relaciones entre los circuitos que regulan la masa del tejido adiposo. NPY: neuropeptido Y; CRH: hormona liberadora de corticotrofina.

tes génicas *normales*, que la especie humana atesora como un acervo de variación, esencial para la evolución, y que resulta poco razonable, por ejemplo, que quienes heredan mejillas con mofletes se sientan obligados a hundir sus mejillas para estar de acuerdo con las modas (que por razones lucrativas propician la uniformidad, en vez de la variedad).

El tejido adiposo, además de cumplir otras funciones, es particularmente una reserva energética, con matices diferentes en sus dos variedades: la grasa parda es una reserva energética de uso inmediato y rápido, que se convierte esencialmente en calor y que está destinada a ser usada en la época perinatal; mientras la grasa blanca es una reserva de larga duración, de utilización más lenta y esencialmente del adulto.

Para mantener estable la masa de tejido graso es necesario un sistema de control, en el cual exista una medida de la masa adiposa, que sea comunicada a los centros nerviosos, donde a su vez se regulan, por un lado, el apetito y, por otro, el grado de actividad física del organismo. Estos centros están fundamentalmente en el hipotálamo, algunas de cuyas lesiones producen alteraciones drásticas del apetito. Sin embargo, las sensaciones de hambre y de saciedad son complejas y sería una sobresimplificación extrema reducir estos comportamientos y sensaciones a un mecanismo simple. Desde ya, numerosas secreciones internas intervienen en este equilibrio, en especial las hormonas tiroideas,

los corticoides y la insulina, y también el sistema nervioso vegetativo y el sistema nervioso central. Por consiguiente, existen necesariamente diversos niveles de retroalimentación en los mecanismos de equilibrio de la grasa corporal, y superposiciones y conexiones entre diversos circuitos (fig. 16-7).

### Obesidad humana: su heredabilidad

La definición de obesidad mórbida no ha sido establecida en forma unánime. Una definición la establece como la desviación en más de 10 kg/m<sup>2</sup> de sobrepeso respecto de padres o de hermanos; como índice del fenotipo se usa el índice de masa corporal (IMC).<sup>10</sup> Este índice es igual al cociente del peso en kilogramos y el cuadrado de la altura en metros; los índices óptimos se sitúan entre 25 y 27. Los estudios en gemelos han mostrado cifras de heredabilidad variable, pero más altas que los estudios en adopciones. En estos últimos se ha mostrado que hay una mayor correlación del peso de los adoptados con el de sus padres biológicos que la correlación con el peso de los padres adoptivos, es decir que el factor ambiental compartido con los padres adoptivos, no alcanza a borrar una similitud con los padres biológicos. Sin embargo, las estimaciones de heredabilidad sugieren que sólo entre un 25 y un 40% de las diferencias de IMC son contribuciones genéticas.<sup>10</sup> Los estudios con gemelos no indican ningún patrón

mendeliano básico, sino más bien la posible influencia de numerosos genes, y entre ellos no se aprecia la asociación de los loci correspondientes al gen de la leptina ni de su receptor, pero sí se puede demostrar una asociación con el gen del receptor adrenérgico  $\beta_3$ , que está relacionado con la lipólisis de la grasa parda.

En resumen, la obesidad humana es un claro ejemplo de un fenotipo multifactorial, donde hay importantes factores ambientales y varios componentes genéticos, sin que se distinga ninguno decisivo. Es decir, no hay un destino genético de gordura, sino simplemente una propensión.

### Definiciones de "envejecimiento", longevidad y lapso de vida

Hoy puede decirse, aunque parezca paradójico, que la gerontología es la medicina del futuro. Esto se debe al rápido y sustancial crecimiento de los sectores añosos en las poblaciones de la mayor parte de los países, donde la expectativa de vida prácticamente se ha duplicado, desde los 40 años en el siglo XIX a cerca de 80 en la actualidad (véase más adelante).<sup>11</sup> En la actualidad, se dispone de una terminología más precisa y conceptos definidos referentes a los cambios biológicos relacionados con la edad. *Envejecimiento humano* es el conjunto de modificaciones en las funciones fisiológicas, en las capacidades físicas y mentales y en la predisposición o riesgo a enfermedades, que se suceden a partir de la adultez y que muestran una relación con el incremento de la edad cronológica. El envejecimiento debe referirse a un organismo o especie en particular (*humano* en el presente caso), ya que es esencialmente variable de una especie a otra (un ratón de tres años presenta cambios similares a los de una persona centenaria). Los cambios que conforman el envejecimiento en general consisten en *disminuciones* de las funciones y de las capacidades y en un *incremento de los riesgos*, aunque esto no es cierto en todas las áreas; si las funciones orgánicas, como la acomodación del cristalino, la cicatrización y la soldadura de fracturas, se realizan más lentamente o con menor eficacia, por otro lado las funciones afectivas son más estables, la experiencia en conocimientos y en habilidades es mayor, la propensión o riesgo de accidentes es menor, y para quienes tienen la fortuna de integrar una familia, las posibilidades de sustraerse de las tensiones y llevar una vida afectiva satisfactoria y serena son posiblemente máximas durante la vejez. Por consiguiente, la vejez

no puede ser considerada como un estado anormal o de enfermedad: es uno de los períodos normales de la vida, y como tal, el organismo se *adapta* a condiciones de menor eficacia orgánica pero de mayor estabilidad. Además, muchas veces la persona accede al grado de juicio sereno y prudente que lo hace más útil a quienes lo rodean.

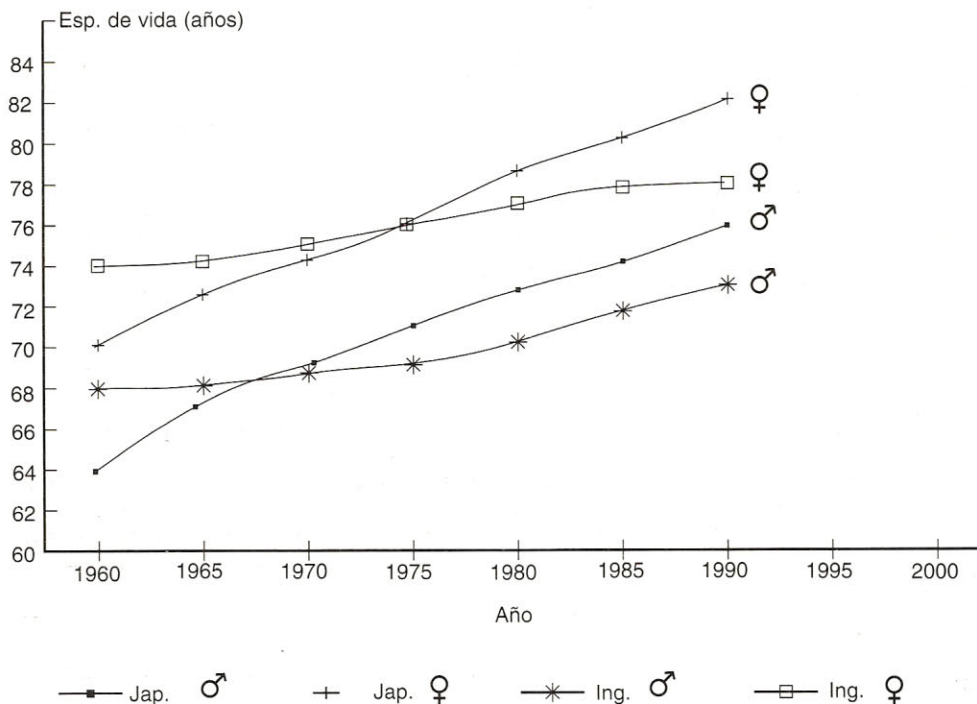
Se denomina *lapso de vida* a la duración en años de la vida de cada individuo; de tal modo, es un carácter cuantitativo, como la estatura. El *lapso de vida medio* es la media estadística del lapso de vida en una población determinada. Mientras los datos anteriores son concretos y medibles una vez ocurridos, la *esperanza de vida* (o expectativa de vida) es una cifra *calculada* y sujeta a diversos errores, pero que es de la mayor significación social. La esperanza de vida es el número promedio de años que viven los componentes de una población determinada, tomando como base los índices de mortalidad en esa área geográfica dada y en un período establecido. La esperanza de vida es *diferente para varones y mujeres*, y varía según los grupos raciales dentro de la misma población. La esperanza de vida más usual es la de los recién nacidos en un año determinado y en una población dada. La esperanza de vida es variable con el tiempo, y se ha observado su incremento paulatino durante todo el presente siglo (fig. 16-8).

Si bien la esperanza de vida se ha incrementado significativamente en pocas décadas, la longevidad, como característica biológica, permanece prácticamente inalterada.<sup>11</sup> La *longevidad* es el potencial de lapso de vida promedio cuando se eliminan los casos de muerte no relacionados con la edad; sería la capacidad de lograr el lapso de vida máximo una vez descartados los factores accidentales de mortalidad. La longevidad, como carácter fenotípico, depende de factores ambientales y de factores genéticos; en este capítulo se analizan en especial estos últimos y su proporción relativa con respecto a los factores ambientales (el estilo de vida, principalmente).

Al decir que la esperanza de vida se ha incrementado pero la longevidad permanece estable, se está expresando que los cambios del lapso de vida se han realizado en esencia con la participación de factores ambientales, tales como la prevención de enfermedades infecciosas, cuidados materno-infantiles y mejoras en la nutrición, mientras que una característica biológica, parcialmente codificada en el genoma, sólo varía en períodos incomparablemente más largos (millares de generaciones). Por ello, la primera noción en este tema es que la



### Esperanza de vida en Japón e Inglaterra



**Fig. 16-8.** Gráfico de la esperanza de vida en Japón e Inglaterra desde 1960 a 1990. La cifra es variable según el sexo, y es mayor en las mujeres japonesas (jap.) que en las inglesas (ing.).<sup>12</sup>

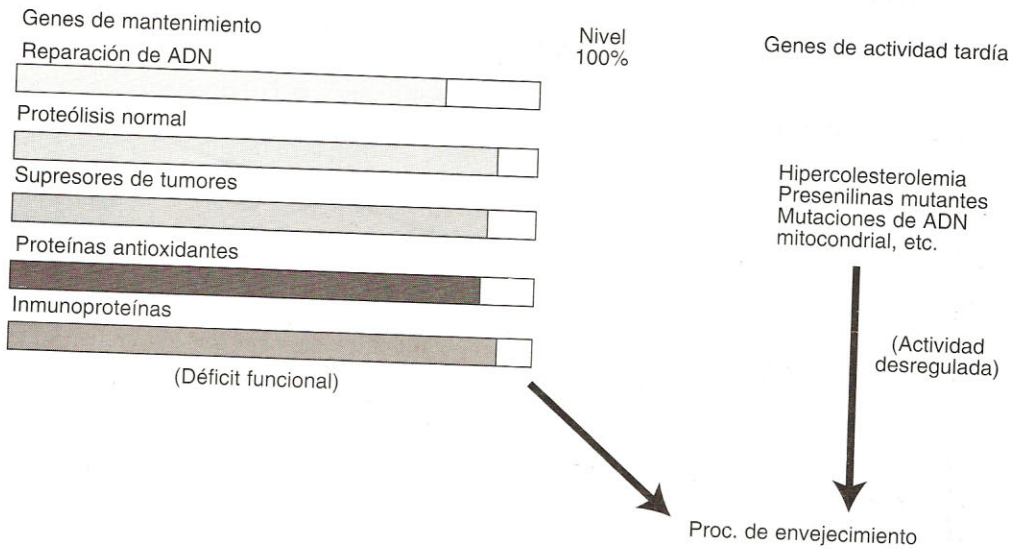
longevidad humana, en sus aspectos génicos, no ha sido básicamente alterada por los recientes adelantos médicos y sociales.

### Causas del envejecimiento. Aspectos evolutivos

En la naturaleza, es improbable encontrar suficientes individuos envejecidos de la misma especie como para realizar comparaciones con el envejecimiento humano, pero si a un grupo de animales se los mantiene en un ámbito protegido de las causas de mortalidad traumáticas, infecciosas y otras de naturaleza ambiental, se pueden observar cambios similares a los del envejecimiento humano, por ejemplo, en zoológicos o entre mascotas. Por consiguiente, los procesos de envejecimiento son compartidos con otros mamíferos y vertebrados.

Como otros fenómenos biológicos generales, el envejecimiento puede analizarse a la luz de la evolución biológica.<sup>11,13</sup>

Existe un consenso de que el envejecimiento no obedece a un programa genético, de tipo determinante, como el de los procesos del desarrollo.<sup>14</sup> Si bien en el envejecimiento intervienen factores genéticos, su desencadenamiento no está planificado genéticamente, no existe una regulación para el envejecimiento ni hay un esquema génico que lo codifique; más bien, el envejecimiento es un proceso estocástico, es decir, que resulta de numerosos cambios que obedecen esencialmente al azar. En efecto, la teoría de la evolución establece que la selección natural actúa poco, porque tiene poca utilidad, en los estadios posreproductivos de la vida y, por consiguiente, no existe una ventaja selectiva (un "aliciente") para el acopio de genes del envejecimiento y para su organización como sistemas reguladores de este proceso y de la longevidad. Por otra parte, todo incremento de la longevidad en una especie involucra un costo; dicho costo, por ejemplo, puede estar representado por un diferimiento temporal de la reproducción (el ser humano tiene un estadio prerreproductivo superior a una década).



**Fig. 16-9.** Los dos grupos de genes involucrados en procesos de envejecimiento; los genes de mantenimiento muestran un desempeño relativamente parejo entre sí, mientras que los de actividad tardía son muy variables entre individuos e independientes uno de otro. El grado de funcionalidad de cada gen de mantenimiento se representa mediante la longitud de su rectángulo; todos ellos son aproximadamente parejos y no se alejan mucho del nivel funcional normal (100%).

Al no existir un “programa genético del envejecimiento”, los genes involucrados en la longevidad deben pertenecer a otras funciones, que, sin embargo, resultan especialmente afectadas durante el transcurso del tiempo. Dos grandes grupos de genes se involucran en este proceso: los genes de mantenimiento y reparación, y los genes que actúan (o que modifican su actividad) en las etapas avanzadas de la vida, genes de actividad tardía (tales como los que determinan acumulación de colesterol o de amiloide). Estos dos grupos de genes tienen características diferentes: mientras los genes de mantenimiento son esenciales y se encuentran distribuidos más bien homogéneamente en las poblaciones, los de actividad tardía tienen variaciones grandes en distintos individuos; por eso se ha dicho que los primeros son de “propiedad pública” o grupal, mientras que los segundos son “privados” o individuales (fig. 16-9).

Las disfunciones de los genes de mantenimiento tienden a equipararse entre sí por un mecanismo de balance evolutivo; dado que cada uno de ellos es esencial, a partir de un umbral de actividad, para la vida del organismo, un déficit intenso en uno de ellos tiende a ser compensado, por selección, hacia un incremento de su actividad, y este proceso se repite para cada uno de estos genes.

A su vez, las disfunciones de los genes de mantenimiento y las activaciones tardías de

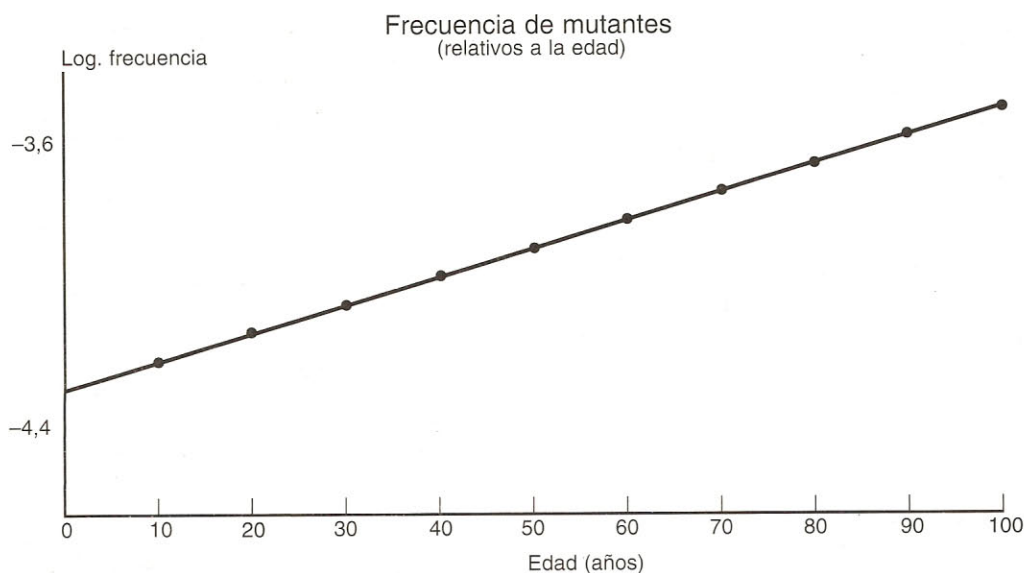
genes de envejecimiento obedecen a mecanismos celulares.

### Mecanismos del envejecimiento: acumulación de mutaciones somáticas y cambios en el ADN

Se han postulado varias hipótesis sobre los mecanismos del envejecimiento: acumulación de daños por oxidaciones celulares,<sup>15</sup> acumulación de proteínas extrañas por alteración de la síntesis de proteínas y su degradación normal, alteraciones del sistema inmunológico,<sup>16</sup> envejecimiento celular relacionado con la replicación limitada de los telómeros,<sup>17</sup> y otras. A pesar del interés de estas concepciones, no contemplan el conjunto de los procesos del envejecimiento, a diferencia de la que postula la acumulación de mutaciones somáticas y cambios en la metilación del ADN con el decurso del tiempo. Ésta es la concepción más abarcadora, ya que incluye a otras de las mencionadas antes.

De acuerdo con la hipótesis de la acumulación de mutaciones, las células somáticas del organismo van sumando mutaciones, en distintos segmentos de su ADN y dispuestas al azar, a medida que avanza la edad cronológica del organismo. Cada una de estas mutaciones son ligeramente desfavorables, puesto que las muta-





**Fig. 16-10.** Frecuencia de clones mutantes de células renales en función de la edad de los donantes (datos tomados de Martin GM, Ogburn CE, Colgin LM, Gown AM, Edland SD, Monnat RY: Somatic mutations are frequent and increase with age in human kidney epithelial cells. *Hum Molec Genet* 1996; 5:215-221).

ciones graves, que no son compensadas por otros mecanismos celulares, llevan a la muerte individual de la célula, y además, son mucho más improbables que las mutaciones de efectos leves. El conjunto de estas mutaciones es compensado por los mecanismos normales de la célula, durante un tiempo, que en la especie humana es prolongado, de años o décadas; por ejemplo, una mutación que disminuye ligeramente la actividad de una enzima es compensada por un aumento de la transcripción de su gen. Dichas mutaciones ocurren independientemente, en número y en calidad, en cada célula, pero puede conceptualizarse que en la población de todas las células de un tejido existe un promedio de carga mutacional. Cuando este promedio no puede compensarse totalmente, comienzan a aparecer déficit funcionales, no ya en una célula en particular, sino en el tejido o en el organismo; y estos déficit, al ser el producto de muchas mutaciones leves ocurridas en una gran población celular, son necesariamente graduales para el organismo. Una predicción concreta de esta hipótesis es que a medida que aumenta la edad de las personas, debe existir una frecuencia mayor de mutantes de cada gen específico en una población celular dada. Esta predicción ha sido comprobada en linfocitos y en otros tipos celulares.<sup>18</sup>

En un estudio de células renales cultivadas, provenientes de 72 donantes cuyas edades os-

cilaban entre 2 y 94 años, la frecuencia de mutantes del gen HPRT aumentó *exponencialmente* con la edad, con un promedio de incremento del 1% de frecuencia de mutantes por año agregado de edad cronológica del donante (fig. 16-10) (el incremento exponencial de las mutaciones implica una probabilidad mayor de expresarse finalmente como daño orgánico).

La frecuencia de mutantes se incrementa de  $5 \times 10^{-5}$ , para el tejido de donantes menores de 10 años, a  $2,5 \times 10^{-4}$ , para el tejido de donantes en la octava década de la vida (todos estos datos están referidos a un único sitio o gen, el HPRT). De las 14 mutaciones analizadas, ocho representan *cambios pequeños* (transición o transversión de una base, etc.). Además, ocho de estas mutaciones son completamente nuevas (diferentes de las registradas en la línea germinal y asociadas al síndrome de Lesch-Nyhan, véase cap. 8), y 13 de las 14 aparecieron como fenómenos mutacionales independientes. Todos estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de la acumulación de mutaciones con la edad, y coinciden con la noción del incremento de anomalías cromosómicas celulares a medida que aumenta la edad del organismo (véase cap. 14).

La *pérdida de cromosomas* asociada con la edad probablemente no es responsable de fenómenos de envejecimiento, pero es demostrativa de que las células, a medida que aumenta la

edad cronológica del organismo, pierden en forma aleatoria algunos elementos de su genoma. Numerosas experiencias han demostrado que los linfocitos de la sangre de varones y mujeres de distintas edades muestran la pérdida, progresiva con la edad cronológica del donante, del cromosoma Y en varones (se incrementa del 0,05 al 1,34%); y del cromosoma X lyonizado en las mujeres (se incrementa del 1,5% en mujeres prepúberes al 5% en mujeres mayores de 75 años).<sup>19</sup>

El *deterioro genético mitocondrial* tampoco es un probable responsable de los fenómenos generales del envejecimiento, pero también es demostrativo de la acumulación progresiva de mutaciones con la edad: específicamente, existe un incremento de las deleciones del ADN mitocondrial acompasado a la edad.<sup>20</sup> Aunque la proporción del ADN perdido en estas deleciones del ADN<sub>m</sub> es generalmente menor del 0,1% y, por lo tanto, se lo ha considerado insuficiente para expresarse en el fenotipo,<sup>21</sup> estas mutaciones demuestran la existencia de los mecanismos aleatorios de acumulación de mutaciones. Esto es más evidente en el ADN<sub>m</sub>, que es pequeño, no cuenta con un sistema reparativo tan sofisticado como el del ADN nuclear, se transmite exclusivamente por vía materna y se encuentra más expuesto al daño oxidativo, precisamente por su localización (véase cap. 10).

Las *modificaciones en la metilación del ADN* asociadas con la edad constituyen un concepto estrechamente vinculado a la hipótesis de la acumulación de mutaciones. La metilación de bases del ADN, en especial la citosina (5-M-citosina), es un cambio heredable y asociado con la actividad transcripcional, en especial de los genes "de mantenimiento" (véase cap. 4), que poseen las islas CpG en su región promotora, con un nivel normalmente muy bajo de metilación; en cambio, los genes transcripcionalmente inactivos, como los del cromosoma X lyonizado, presentan grados altos de metilación. Se han observado cambios graduales de la metilación del ADN asociados con la edad, en general (pero no exclusivamente) de pérdida de metilación.<sup>22</sup>

## Definición molecular del envejecimiento

Es posible formular una definición provisoria del envejecimiento a nivel molecular: se trata de la acumulación progresiva con la edad del organismo de errores en la codificación genómica nuclear (o de modificaciones de la metilación), en las células *somáticas* replicativas y no

replicativas, y que usualmente es de tipo irreversible. Este concepto permite superar la contradicción aparente de la existencia del envejecimiento en células de organismos que poseen las capacidades de autorregularse, de eliminar proteínas residuales o alteradas, de reparar sus estructuras y de controlar la fidelidad de los procesos de replicación, transcripción y traducción de la información genética (estas capacidades se han mencionado a lo largo de este texto). La contradicción se resuelve cuando se admite que en las células somáticas no existe un programa genético de revisión de los errores en las instrucciones génicas y en la metilación del ADN relacionada con la diferenciación celular, que puedan haberse introducido gradualmente con el tiempo y que no son eliminados por la muerte individual de la célula, al no transgredir las funciones básicas de ésta ni el envío de señales básicas entre las células. En cambio, en la línea germinal existe un proceso general de revisión del genoma en la *meiosis*. En ella existe una concentración de factores de reparación genómica (como la proteína Rad51; véase cap. 9) a lo largo de los cromosomas apareados en el estadio paquiteno, y esta presencia de las maquinarias de reparación del ADN se da simultáneamente con una estrecha interacción entre dos moléculas de ADN *homólogas* (no idénticas, como en la replicación), que incluye la transferencia de codificación de una molécula a otra (conversión génica). Además, durante la *meiosis* existe una *reprogramación* del grado de metilación del ADN, que lleva a la formación de las "improntas genómicas" (véase cap. 9). Estos aspectos reparativos y de reprogramación de la *meiosis* son intensamente estudiados en la actualidad.

Esta concepción de modificaciones del ADN como mecanismo del envejecimiento lleva a considerar que ciertos genes son de mayor importancia en estos procesos: los genes involucrados en los procesos de reparación del ADN, cuanto más eficientes sean, más retrasarán el envejecimiento, y los genes de las enzimas antagonistas de metabolitos de las oxidaciones celulares, como las superóxido dismutasas, también estarán asociados a menores tasas de envejecimiento, ya que disminuyen la concentración de estos metabolitos que pueden dañar el ADN.

## Enfermedades que aparentan un envejecimiento precoz

De acuerdo con lo expresado antes, las mutaciones que afectan genes involucrados en pro-



cesos reparativos podrían provocar una aparente aceleración del envejecimiento. Esta predicción parece haberse confirmado recientemente en el estudio de ciertas enfermedades genéticas, como el síndrome de Werner y el síndrome de Cockayne (véase cap. 5).

El síndrome de Cockayne, o “enanismo caquéctico”, es una enfermedad hereditaria, de tipo autosómico recesivo, que presenta dos variedades (A y B), las cuales se diferencian por la precocidad e intensidad de los síntomas: falta de crecimiento, microcefalia, pérdida de tejido adiposo subcutáneo, aspecto caquéctico, pelo escaso, aspecto senil, desmielinización, calcificaciones encefálicas, osteoporosis, retardo mental, anomalías dentarias, cataratas y extraordinaria fotosensibilidad, en especial a la luz solar; dado que estos pacientes viven poco tiempo y generalmente fallecen en la infancia, no se ha determinado si poseen una mayor incidencia de tumores malignos. Las células provenientes de estos pacientes muestran un *retardo* en la recuperación luego de ser irradiadas con luz UV; en especial está retrasada la síntesis de ADN y de ARN. La *reparación de ADN asociada a la transcripción* (RAT, véase cap. 5) está alterada. El producto del gen de la forma A (proteína reguladora de 44 kDa, con repeticiones de tipo WD y que probablemente estimula la formación de complejos multiproteicos) y el de la forma B, una helicasa de 168 kDa, interaccionan ambos con los componentes del factor de transcripción TFIIH, de tal manera que se los supone integrantes del complejo de transcripción y, por consiguiente, del sistema de reparación del ADN acoplado a la transcripción.<sup>23</sup> En el síndrome de Cockayne está preservado el sistema de reparación global del ADN (el REN en el que intervienen genes del xeroderma pigmentoso, que no están alterados en el síndrome de Cockayne), de modo tal que al ser defectuoso sólo el tipo de reparación asociada a la transcripción, los daños en el ADN se reparan, pero más lentamente, y producen el retraso típico de este síndrome; algunos de los defectos del ADN, sin embargo, no se reparan, se van acumulando y provocan la sintomatología del síndrome, que se localiza preferencialmente en células posmitóticas, como las del sistema nervioso.

El síndrome de Werner o progeria del adulto es una enfermedad mendeliana recesiva con una incidencia de 1 en 100.000 nacimientos y que se considera como el síndrome de mayor interés para el envejecimiento. Hay un retraso del crecimiento puberal, cuando se hace aparente el síndrome; luego empiezan a aparecer signos precoces de envejecimiento, el cabello se vuel-

ve gris, se desarrollan diabetes (no insulino dependiente), cataratas, osteoporosis, alopecia, atrofia del tejido subcutáneo, calcificaciones de tejidos blandos, arteriosclerosis generalizada y puede haber varios tipos de tumores, con una incidencia poco común de sarcomas. Los pacientes fallecen generalmente por infartos de miocardio o tumores, y es posible que alcancen la cuarta o la quinta década. En este síndrome hay inestabilidad genómica, evidenciada en una alta incidencia de rearrreglos cromosómicos y una disminución del potencial replicativo (defecto de la replicación de telómeros). El gen responsable se localiza en 8p12 y codifica una *helicasa*, la cual se supone que interviene en la replicación y en la reparación del ADN.

Tanto el síndrome de Cockayne como el de Werner no conforman un cuadro global de envejecimiento, aunque comparten *algunas* de sus manifestaciones; por ello, no son considerados como envejecimiento precoz, sino como “caricaturas” del envejecimiento.<sup>14</sup> De todos modos, apoyan la hipótesis de la acumulación de modificaciones del ADN en el envejecimiento.

Esta hipótesis, a su vez, está relacionada con la concepción del origen de los tumores por “mutaciones múltiples” (véase cap. 13). En esta teoría, algunos de los pasos importantes son la mutación de genes supresores de tumores y la de los reguladores de crecimiento.

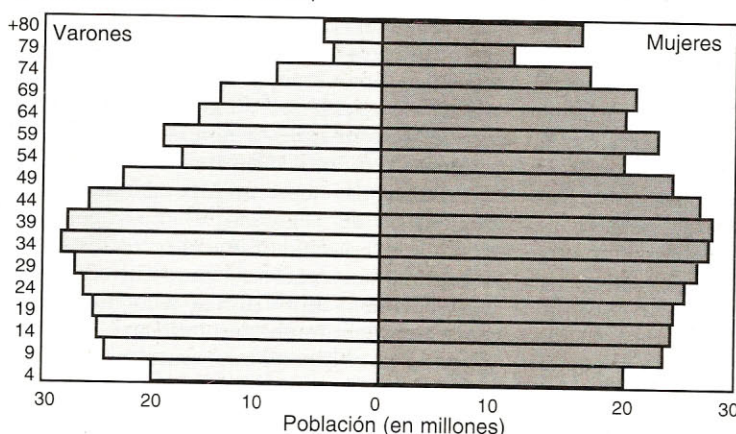
## Heredabilidad de la longevidad

Si la longevidad es la capacidad de alcanzar los plazos de vida máximos, en la concepción molecular del envejecimiento los factores genéticos que la favorecen podrán ser los genes que integran los sistemas de reparación (estudiados en el cap. 5); los genes que codifican sistemas de mantenimiento, como los que evitan los daños oxidativos, o los que eliminan las proteínas anormales por proteólisis, como los constituyentes de los proteosomas; los genes codificantes de un sistema inmunitario robusto, que controla las infecciones comunes, y otros ya mencionados. De tal manera que, por fuerza, la longevidad debe ser un carácter *poligénico*, no mendeliano, y más aún, dada la importancia del factor ambiental, debe ser considerada un carácter multifactorial.

En efecto, los estudios con gemelos muestran la naturaleza poligénica y no muy intensa del factor genético en la longevidad.<sup>24</sup> El estudio de 2.872 gemelos mostró una heredabilidad de la longevidad de 0,26 para varones y de 0,23 para mujeres. El factor genético, de acuerdo con es-



Segmentos etarios (de 5 años c/u)



**Fig. 16-11.** Distribución poblacional en Europa Occidental. En vez de la clásica pirámide, la distribución se vuelve de tipo "tonel".<sup>12</sup>

tos datos, es poligénico y no aditivo, es decir que hay genes de mayor importancia; el grado de heredabilidad es moderado, menor que el del factor genético de la estatura y otros factores poligénicos. Se ha sugerido, sobre la base de estos resultados, que existen factores importantes que afectan la longevidad por acentuar los riesgos de mortalidad a diversas edades, más que por determinar directamente una edad máxima. Por otro lado, el ambiente familiar compartido parece tener un impacto limitado sobre la longevidad. Sin embargo, y dada la moderada tasa de heredabilidad, es obvia la gran importancia general del factor ambiental. El "estilo de vida" resume en gran medida el factor ambiental; comprende la nutrición (siendo la hiponutrición un factor de deterioro con mayor impacto, comparada con la sobrenutrición moderada), el ejercicio moderado, los hábitos tóxicos (el hábito de fumar es un poderoso y notorio destructor de longevidad) y otros factores.

### Consecuencias sociales del aumento del lapso de vida

Insistiendo en expresar que si bien ha aumentado el lapso de vida medio, no se ha modificado ninguna propiedad biológica como la longevidad, cabe interrogarse acerca de las consecuencias de este notable incremento de vida en muchos países.

Estas consecuencias son visibles en la estructura etaria de las poblaciones: en vez de pirámides poblacionales, se han establecido distribuciones de edades de tipo "tonel" debido al crecimiento relativo de los segmentos más añosos y a una relativa disminución de la natalidad, con un achicamiento de la base (fig. 16-11).

El problema que se plantea, desde el punto de vista biológico, es que, en oposición a la noción habitual, no se ha logrado ningún cambio en el genoma humano, sino que simplemente se han mejorado las condiciones ambientales, de donde se desprende que se ha incrementado (y cada vez en mayor grado) la presencia de las enfermedades de aparición tardía, como los tumores, las artropatías y las insuficiencias pulmonares crónicas. Sin embargo, algunas de estas afecciones propias de la edad avanzada, como la depresión, tienen importantes componentes ambientales, y como tales, son susceptibles de prevención, mejoramiento o alivio. Por supuesto que esto requerirá que las pautas culturales del futuro asignen prioridad a la solidaridad con todos los seres humanos, lo cual es uno de los mandatos históricos de la Medicina.

### RESUMEN

La pigmentación de la piel, el cabello, el iris y el epitelio pigmentario de la retina, depende de una serie de procesos, en cuyo inicio se destaca el gen de la enzima tirosinasa. El defecto genético de esta enzima ocurre por azar en todas las razas y lugares, para dar lugar al albinismo más común (albinismo oculocutáneo 1A, AOC-1A). La síntesis del pigmento (los dos tipos de melanina, eumelanina y feomelanina) ocurre en organoides especializados (melanosomas) que se encuentran en el citoplasma de células especiales, los melanocitos, ubicados en la epidermis y en el cabello y que se forman a partir de células precursoras, los melanoblastos, los cuales derivan de células de la cresta neural del embrión y realizan una larga migración desde esa cresta hasta la piel en la época embrionaria.



En el embrión, el gen PAX3 mutado afecta a los precursores de los melanoblastos (síndrome de Waardenburg de tipo I) y el gen MITF ("Factor de Transcripción asociado a Microftalmía"), cuya mutación determina el síndrome de Waardenburg de tipo II, con despigmentación en parches y sordera, codifica un factor de transcripción que es considerado decisivo en la diferenciación de los melanocitos. La melanogénesis posee varios tipos de regulación: en lo espacial, las diferentes zonas de la piel y faneras; en lo funcional, el tipo de pigmento, feomelanina o eumelanina, y en lo cuantitativo, la capacidad de incrementar el pigmento (tostado de la piel). La regulación de la localización es muy obvia por las diferencias entre la pigmentación de la piel y la del epitelio pigmentario de la retina, que permite discriminar a los albinismos en los dos grandes tipos, oculocutáneo y ocular (simple). En el albinismo ocular (AO-1) está alterada una glucoproteína integral de membrana de los melanosomas, de 404 aa., cuyo gen (gen OA-1) es ligado al sexo (está en Xp22.3) y cuya mutación provoca la formación de "macro-melanosomas", anormalmente grandes e hipofuncionales en el epitelio pigmentario de la retina. La regulación del tipo de melanina determina la formación de pelirrojos, y en ese sentido es decisivo el papel de las variantes alélicas del gen del receptor 1 de melanocortinas (R1MC); casi todos los alelos mutantes de este receptor determinan la predominancia de feomelaninas y el consiguiente pelo rojizo; también tiene un papel secundario el gen ASIP, codificante de una proteína antagonista de la acción melanocitoestimulante de la hormona MSH sobre el receptor R1MC.

La obesidad humana se relaciona con el sistema de regulación del peso corporal o de los intercambios de energía, que en el adulto regula la cantidad de tejido adiposo. Este tejido tiene dos variedades: pardo, que es una reserva energética de uso inmediato e importante en el infante, y blanco, que es una reserva energética de uso lento. El adipocito pardo tiene un marcador molecular, la proteína desacoplante (PDA); el blanco tiene varios marcadores específicos, siendo el más importante la proteína secretora "leptina". En la diferenciación de los adipocitos intervienen numerosos agentes y hormonas inductoras (insulina, glucocorticoides, etc.), y receptores celulares, que activan factores de transcripción, de los cuales son importantes el receptor activado por (agentes) proliferantes de peroxisomas (RAPP) y el receptor activado por ácidos grasos (RAAG); estos factores activan genes específicos del adipo-

cito, como el de la leptina y el de la PDA. La leptina es una proteína de 167 aa. segregada por los adipocitos blancos y cuyo nivel en la sangre es usado por el organismo en el control del equilibrio energético. El gen de la leptina está en 7q31, pero no está mutado en la obesidad humana común. La leptina tiene como blanco de acción a las neuronas hipotalámicas (núcleo arcuato) que segregan el neuropéptido Y (NPY); la leptina deprime la secreción de NPY y suprime la reacción adaptativa frente al ayuno (suprime la inhibición de secreción de gonadotrofinas y hormonas esteroideas). El NPY segregado en el hipotálamo, entre otras acciones, estimula el apetito. El gen del receptor de la leptina (LEPR) de las neuronas hipotalámicas tampoco está mutado en la obesidad humana. El gen ASIP, antagonista de los receptores de melanocortinas, sólo se ha verificado que está alterado en obesidades experimentales (los derivados del precursor de melanocortinas estimulan el apetito). El sistema de regulación normal del equilibrio energético utiliza la leptina como índice de la masa de tejido adiposo; la leptina frena la activación hipotalámica del apetito con el NPY, y se regula también la secreción de hormona liberadora de corticotrofina y la secreción de serotonina, que influyen disminuyendo la ingesta alimentaria. La grasa parda está regulada en forma independiente y es influenciada por el sistema simpático. La heredabilidad de la obesidad humana es poligénica y oscila alrededor de 0,25, por lo cual los factores ambientales (principalmente la conducta) son decisivos.

El envejecimiento humano es el conjunto de cambios estructurales, funcionales y de predisposición a enfermedades relacionados con el incremento de la edad cronológica. En el último siglo ha habido notables aumentos en el "lapso de vida medio", sin que se haya modificado significativamente la longevidad, que es un carácter fenotípico multifactorial con componente genético poligénico. El envejecimiento no es causado por un programa genético, como el desarrollo embrionario, sino que es un conjunto de procesos aleatorios (determinados por el azar). Los genes de mantenimiento y de reparación están involucrados en el envejecimiento: si forman un sistema robusto, la longevidad es mayor; si están alterados, la longevidad disminuye. Además, hay genes particulares de ciertos individuos que predisponen a enfermedades de aparición tardía, del tipo de la hipercolesterolemia. El mecanismo más probable del envejecimiento es la acumulación, con la edad, de mutaciones al azar y modificaciones, también aleatorias, de la metilación normal del

ADN en células diferenciadas. Tanto la tasa de mutaciones, como los cambios cromosómicos y las modificaciones del ADN mitocondrial, se incrementan exponencialmente con la edad del organismo. Se postula que la meiosis revierte la mayoría de estos cambios en las células germinales. Las enfermedades que aparentan un envejecimiento "precoz" no presentan todos los procesos del envejecimiento, pero son modelos de investigación útiles, como el síndrome de Cockayne (falla mutacional del sistema de reparación del ADN acoplado a la transcripción) y el síndrome de Werner (mutación de una helicasa que influye en la replicación y reparación del ADN). La heredabilidad de la longevidad es moderada (0,26-0,23) y de tipo poligénico; los factores ambientales (estilo de vida) son muy importantes. Las consecuencias sociales y médicas del aumento del lapso de vida son de gran importancia y se encuentran en pleno desarrollo.

## REFERENCIAS

- Barsh GS. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends in Genet* 1996; 12:229-305.
- Hearing VJ. Invited editorial: Unraveling the melanocyte. *Am J Hum Genet* 1993; 52:1-7.
- Schiaffino MV, Baschiroto C, Pellegrini G, Montalti S, Tachetti C, De Luca M, Ballabio A. The ocular albinism type 1 gene product is a membrane glycoprotein localized to melanosomes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93:9055-9060.
- Bassi MT, Schiaffino MV et al. Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome. *Nature Genet* 1995; 10:13-19.
- Tachibana M, Takeda K et al. Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nature Genet* 1996; 14:50-54.
- Klaus S. Functional differentiation of white and brown adipocytes. *BioEssays* 1997; 19:215-223.
- Weigle DS, Kuijper JL. Obesity genes and the regulation of fat content. *BioEssays* 1996; 18:867-874.
- Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 1996; 87:377-389.
- Naggert J, Harris T, North M. The genetics of obesity. *Curr Op Genet Develop* 1997; 7:398-404.
- Bouchard C. Genetics of obesity in humans: current issues. En: Chadwick CJ, Cardew G (eds.) *The Origin and Consequences of Obesity*. Ciba Foundation Symposium 201, Chichester: J Wiley & Sons, 1996.
- Kirkwood TBL. Human senescence. *BioEssays* 1996; 18:1009-1016.
- Roush W. Live long and prosper? *Science* 1996; 273:42-48.
- Rose MR. *Evolutionary Biology of Aging*. New York: Oxford University Press, 1991.
- Jazwinski SM. Longevity, genes and aging. *Science* 1996; 273:54-59.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273:59-63.
- Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 1996; 273:70-73.
- Chiu C-P, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214:99-106.
- Martin GM, Ogburn CE, Colgin LM, Gown AM, Eland SD, Monnat RJ. Somatic mutations are frequent and increase with age in human kidney epithelial cells. *Hum Molec Genet* 1996; 5:215-221.
- Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T, Schmid M. Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet* 1995; 57:1143-1150.
- Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. Pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992; 89:7370-7374.
- Grossman LI, Shoubridge EA. Mitochondrial genetics and human disease. *BioEssays* 1996; 18:983-991.
- Slagboom PE, Vijg J. Genetic instability and aging: theories, facts and future prospects. *Genome* 1989; 31:373-385.
- Gool AJV, Horst GTJ, Citterio E, Hoeijmakers JH. Cockayne syndrome: defective repair of transcription. *EMBO J* 1997; 16:4155-4162.
- Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen T, Harvald B, Vaupel JW. The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum Genet* 1996; 97:319-323.

## BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

- Kiberstis PA, Marx J. Regulation of body weight. *Science* 1998; 280:1363-1390. (Conjunto de artículos sobre obesidad humana, con actualizaciones sobre el tema.)



**Acéntrico:** Referido a un fragmento cromosómico desprovisto de centrómero.

**Aceptor (sitio):** Extremo posterior o 3' de un intrón, que actúa durante el procesamiento del ARN transcrito 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. 13).

**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. 4).

**Adipocito:** Célula adiposa especializada en la acumulación de grasas; sus variedades son el adipocito **blanco** y el **pardo** (véase cap. 16).

**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-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 copia, ADN complementario:** ADN sintetizado a partir de ARNm mediante la transcriptasa inversa, que es comple-

mentario al ARNm y carece de intrones (véase cap. 2).

**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. 3).

**Agarosa (electroforesis en geles de):** Sustancia péptica derivada del agar-agar (de algas) cuyos geles son muy usados para separar fragmentos de ácidos nucleicos en electroforesis.

**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 O, 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. 3).

**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. 4).
- 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. 3).
- $\alpha$ -Amanitina:** Octapéptido extraído del hongo *Amanita phalloides*, altamente tóxico e inhibidor de la transcripción por la polimerasa II.
- "Ámbar":** Nombre dado en genética de procariotes 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.
- 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.
- 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. 3).
- Aneuploidia:** Condición de no poseer el número normal de cromosomas (el conjunto "euploide"), que determina un defecto o un exceso de cromosomas.
- 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 severidad de sus síntomas se incrementa en generaciones sucesivas (véase cap. 6).
- 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:** Fenómeno de tener orientaciones opuestas (las dos hélices complementarias de una molécula de ADN) (véase cap. 3).
- 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 secuciar ADN se escribe la secuencia complementaria (de sentido o negativa). **ARN de antisentido** es un ARN complementario a un ARNm y que, por consiguiente, hibrida con ese mensajero inactivándolo.
- 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. 1).
- Autosoma:** Cualquier cromosoma que no sea un cromosoma sexual.
- Azoospermia:** Ausencia de espermatozoides en el semen.
- 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. 14).
- 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 es usada en técnicas de hibridación "HISYF" (véase cap. 14).
- Bivalente:** Par de cromosomas homólogos, que conforman una unidad durante la primera división meiótica (véase cap. 9).
- Blastocisto:** Embrión esférico muy temprano, que aún está libre (no implantado en el útero) y posee una cavidad central.
- Cadena molde, templado, patrón, antisentido o positiva** (del ADN de cadena doble): Es la cadena que es 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" o "negativa", porque en ella se lee la misma secuencia que en el ARNm y en la misma dirección, lo cual es muy práctico.



- 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. 4).
- "Caja homeótica", "homeocaja":** Secuencia conservada de 180 pb que está presente en importantes genes reguladores del desarrollo embrionario temprano (véase cap. 13).
- "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. 2).
- "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.
- 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. 14).
- 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. 8).
- 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".
- 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. 9).
- 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. 3).
- Cis (configuración de "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. P. ej.: acción en cis del gen XIST sobre el mismo cromosoma X que lo aloja.
- 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".
- 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.
- Coefficiente de correlación:** Coeficiente estadístico que mide el grado de asociación entre dos (o más) variables.
- 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 interactúan 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. 4).



**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. 9).

**Complementariedad (de estructuras):** Capacidad de ajustarse espacialmente dos estructuras moleculares, como molde y pieza moldeada, 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. 1).

**Consenso (secuencia consensuada o secuencia consenso):** Secuencia teórica (promedio) de bases de ADN que es encontrada, 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. 3).

**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. 7). **Genes constitutivos o de mantenimiento** son aquellos que funcionan constantemente. **Heterocromatina constitutiva** es aquella mayormente desprovista de genes, que contiene secuencias muy repetidas.

**Contiguo (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 a 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. 2). 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. 3).

**CpG:** Dinucleótido de citosina y guanina, que es muy frecuente en regiones reguladoras de un gen (p. ej., "islas CpG"; véase cap. 4).

**"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. 13).

**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).

**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** es 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.

**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. 8).

**"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. 13).



- Generado** (código): 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. 6).
- 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. 8).
- Ectópico**: Fuera de su localización normal (célula ectópica).
- 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.
- Empalmosoma**, "spliceosoma": Estructura compleja formada por partículas pequeñas y nucleares de ribonucleoproteína, que interviene en el proceso de empalme.
- Endonucleasas**: Enzimas que cortan ácidos nucleicos en lugares intersticiales (no en los extremos). Endonucleasas de restricción = enzimas de restricción (véase cap. 2).
- 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. 9).
- Delegado** (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. 4).
- Delección** (deficiencia): Aberración cromosómica en la que falta un segmento de cromosoma. **Delección 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. 1).
- 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. 8).
- 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. 3).
- 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.
- Didesoxinucleótidos** (dideoxinucleótidos): Nucleótidos desprovistos del oxhidrilo en la posición 3', usados en el método de secuenciación del ADN (véase cap. 4).
- 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  $2n = 46$ , teniendo 23 parejas de cromosomas homólogos.
- 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. 9).



Entrecruzamiento ilegítimo es aquel que ocurre entre dos segmentos que no son correctamente homólogos y que con frecuencia origina fenómenos patológicos.

**Epigenético (efecto):** 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, que inhibe la expresión del gen, o por la presencia de proteínas activadoras o represoras.

**Episoma:** 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, etc.

**Espectro mutacional:** Representación del conjunto de mutaciones que pueden afectar a un gen, que muestra su ubicación dentro del gen y el tipo de alteración mutacional (véase cap. 5).

**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.

**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 118 exones en el gen de colágeno COL7A1) 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.

**Vector de expresión** es un vector construido de tal forma que permite la transcripción y la traducción del gen vehiculizado (véase cap. 2).

**Factores de crecimiento:** Cualquiera del numeroso grupo de polipéptidos que estimula específicamente un tejido o tipo celular.

**Factores de crecimiento y transformación  $\beta$  (TGF- $\beta$ ):** 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 anti-mülleriana y otras. La familia TGF- $\beta$  estricta está codificada al menos por 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.

**Fenocopia:** Cambio fenotípico inducido por factores ambientales, que remeda los efectos fenotípicos de una mutación (véase cap. 1).

**Fenotipo:** Conjunto de caracteres observables del organismo o de sus componentes.

**"FISH":** Véase hibridación in situ y fluorescencia (HISYF).

**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. 14).

**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 (hibridado).

**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, con sus secuencias de control, intrones y secuencias reguladoras (véase cap. 4). Cada cromosoma humano



contiene más de genes y el total de genes humanos oscila en alrededor de 70.000. Gen de mantenimiento ("housekeeping") es aquel que funciona permanentemente.

**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.

**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. Los 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. 1).

**Girasa:** Enzima del tipo de las topoisomerasas II, que puede inducir superenrollamiento negativo en el ADN.

**Haploide (del griego haplos: mitad):** Que posee un solo juego de cromosomas (no hay parejas). El número haploide humano es  $n = 23$ .

**Haplotipo:** Cualquiera 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. 5).

**$\alpha$ -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.

**Hemicigoto:** 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.

**Heredabilidad:** Parte de la varianza fenotípica que corresponde a un origen genético (véase cap. 1).

**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. 7).

**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. 9).

**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 **intraalélica**) y en mutaciones de más de un gen (heterogeneidad **interalélica**) y, por consiguiente, es infrecuente el origen único de una enfermedad hereditaria (véase cap. 1).

**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 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. 3).



**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. 14).

**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. 13).

**Homocigota, homocigoto, homocigota:** 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.

**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. 2).

**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. 9).

**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 es unido artificialmente a un "vector" y es vehiculado por éste, durante la clonación de ADN y otras manipulaciones del ADN (véase cap. 2).

**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.

**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.

**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 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".

**Isocromosoma:** Cromosoma anormal, resultado de la pérdida de un brazo y la duplicación del restante (véase cap. 14).

**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.

**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. 8). 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. 8).

**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. 3).

**Ionización, 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. 8).

**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 ó 2 en la escala de "lods" indica ligamiento (véase cap. 8).

**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. 5).

**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 al 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. 4).

**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 confec-



ción 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. 8).

**Marco abierto de lectura (MAL), cuadro de lectura, "open reading frame" (ORF):** Secuencia codificadora del ADN que no está interrumpida precozmente por un triplete de terminación y, por consiguiente, sugiere la existencia de un gen funcional (véase cap. 4).

**Meiocito:** Célula germinal que ingresa en meiosis, ya sea masculina (espermatozoides) 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. 9).

**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.

**Metacéntrico:** Cromosoma con brazos de aproximadamente la misma longitud porque su centrómero está en posición mediana.

**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.

**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 "marca-

dores", aunque menos eficientes que los microsatélites.

**Monogénica:** 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. 14).

**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 anomalía 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. 14).

**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 anomalía 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 anomalía, 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. 5).

**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. 5).

**Mutágeno:** Todo agente capaz de inducir mutaciones. La prueba o test de Ames generalmente es usada para detectar la mutagenicidad de sustancias sospechosas (véase cap. 5).

**Neutralista (teoría):** Teoría que postula que la mayoría de los cambios mutacionales, en el curso de la evolución, son mutaciones neutrales (véase cap. 5).

**No-disyunción:** Error celular causante de anomalías del número cromosómico (véanse "disyunción" y cap. 9). 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.



**“Noqueo génico”, anulaci3n génica, “knock-out”** en inglés: Manipulaci3n 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 a un gen induciendo la recombinaci3n artificial hom3loga de ese gen con un vector que contiene una secuencia muy parecida (hom3loga) a la del gen pero que es inactiva. El noqueo génico permite estudiar la funci3n de un único gen en un organismo completo, especialmente durante el desarrollo embrionario (véase cap. 5).

**NOR, organizador nucleolar, regi3n organizadora del nucléolo:** Regi3n de ciertos cromosomas que contiene los genes ribos3micos, o del ARNr y que es detectable por las técnicas para NORs y tambi3n como constricciones secundarias en esos cromosomas.

**Nuécleolo:** Estructura intranuclear redondeada, sitio de s3ntesis y pre-ensamblamiento de los ribosomas.

**Nulo (gen, alelo):** Aquel que no es funcional por efecto de una mutaci3n o por una delec3n.

**Oligonucle3tidos, oligos:** Fragmentos cortos de polinucle3tidos, de 12 a 20 bases y de secuencia definida, que son fabricados para servir como sondas para la detecci3n de mutaciones o con otros prop3sitos.

**Oncogén:** Gen productor de crecimiento celular desregulado, originado en una mutaci3n de un gen normal (protooncogén) que codifica se3ales reguladoras o factores de crecimiento. Varios oncogenes son codificantes de quinasas de tirosinas, de ligadoras de guanositrifosfato (GTP) o de factores prote3nicos de crecimiento.

**Palíndromo:** Repetici3n 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. 2 y 3). Hay numerosas secuencias palindr3micas en el ADN, que pueden ser blanco para el ataque de las enzimas de restricci3n.

**Paquinema, paquiteno, estadio paquiténico:** Tercer estadio de la profase meiótica I, en el cual los cromosomas hom3logos est3n completamente apareados y sufren los fenómenos de recombinaci3n meiótica (véase cap. 9).

**Parálogo:** Genes correspondientes u hom3logos en las cuatro series de genes home3ticos humanos, los genes HOX (véase cap. 13).

**Patogenia:** Mecanismo por el cual una enfermedad causa da3os org3nicos, mediante los

cuales surgen los signos y s3ntomas de la enfermedad.

**Plásmido:** Molécula peque3a (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 extracromos3mico 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 or3genes (véase cap. 2).

**Pleiotropía:** Expresi3n de un gen normal o mutante que produce efectos aparentemente no relacionados entre sí; manifestaciones múltiples y aparentemente independientes, de la expresi3n de un único gen.

**Ploidia:** Número de copias de conjuntos cromos3micos (diploide, poliploide, etc.).

**Poliadenilaci3n:** Agregado de una “cola” de docenas de residuos de adenosina al extremo 3’ del ARN transcripto, al final del proceso de maduraci3n de éste.

**Poligénico:** Rasgo o enfermedad originado por la acci3n de varios genes normales o mutados; tiene un patr3n no mendeliano de herencia.

**Polimerasas:** Enzimas que sintetizan polinucle3tidos (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 “reacci3n en cadena de la polimerasa”.

**Polimorfismo (de ADN):** Presencia en la poblaci3n humana de variantes inocuas, y en número significativo, de secuencias de ADN en loci determinados; por ejemplo, variantes en el número de repeticiones de microsátélites. Estos polimorfismos, para ser útiles en el mapeo génico, deben ser frecuentes en la poblaci3n (véase cap. 8). **Polimorfismos cromos3micos** son la presencia simultánea, en una poblaci3n, de variantes cariotípicas inocuas; por ejemplo, duplicaciones de la heterocromatina del cromosoma Y.

**Polimorfismos de longitudes de fragmentos de restricci3n (PLFR):** Véanse “restricci3n, polimorfismos” y cap. 8).

**Poliploidia:** Presencia de más de dos conjuntos cromos3micos. Es letal en la especie humana.

**Prímoro:** Oligonucle3tido, 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 reacci3n en cadena de la polimerasa.

**Prímoro delantero** es el que se ubica al prin-



- cipio y **primeros** posterior o **trасero** el que se ubica al final del fragmento a copiar. La secuencia de los primeros es complementaria de los extremos 3' del fragmento a 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. 2).
- 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, propósitos:** Miembro de la familia afectado por la enfermedad, con el que se inicia la investigación de una genealogía.
- Proteosoma, proteasoma:** Estructura cilíndrica multimérica presente en células eucariontes, cuya función es la degradación enzimática de proteínas celulares, marcadas por la ubiquitina para su destrucción.
- Pseudogén:** 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 pseudogenes en las "familias génicas", por ejemplo, de las  $\alpha$  y  $\beta$  globinas.
- Pseudogén procesado:** Pseudogén de origen especial, producido por retroposición de una secuencia de ARNm. Se caracterizan por una secuencia poliadenilica en 3' y frecuentemente están truncados en el extremo 5' (véase cap. 3).
- Pseudohermafroditismo:** 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. 7).
- 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. 9).
- Rad:** Unidad de radiación ionizante absorbida por el organismo, aproximadamente igual a 1 Roentgen (véase cap. 5).
- 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. 2).
- 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).
- Receptor nuclear:** Proteínas que se unen a un ligando y que migran al núcleo donde se asocian específicamente a ciertos segmentos de ADN.
- Recesividad:** Condición de una mutación por la cual, para su expresión en el fenotipo, es necesario que sea homocigoto (que esté en dosis doble).
- 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. 9).
- Recombinasas:** Enzimas involucradas específicamente en la recombinación meiótica (RecA, RecBCD y otras; véase cap. 9).
- REN, reparación por escisión nucleotídica:** Mecanismo fundamental de reparación de errores y cambios en el ADN (véase cap. 5). 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; ver "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. 3).
- 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. 2).
- 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 transcrito procede a su "autoempalme", cortando y repegando su propia molécula.
- Roentgen:** Unidad de dosis de radiación ionizante (aproximadamente  $2 \times 10^9$  pares de iones en  $1 \text{ cm}^3$  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. 5).
- Sanger (método de):** Método de secuenciar el ADN mediante enzimas y **didesoxirribonucleótidos** (véase cap. 4).
- 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 del 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. 3).
- Secuencias repetidas cortas y dispersas (SINEs):** En la especie humana, representadas por la familia de secuencias **Alu** (véanse **Alu** y cap. 3).
- 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 genéticos 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.
- 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:** Anomalia 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.

**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.

**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.

**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. 3).

**Talasemias:** Grupo de enfermedades hereditarias de la sangre, caracterizadas por deficiencias de globinas  $\alpha$  o  $\beta$  (véase cap. 12).

**Talidomida:** Medicamento usado como tranquilizante hasta 1963, cuando se probó que tenía un poderoso efecto teratogénico (véase cap. 1).

**Telomerasa:** Enzima ribonucleoproteínica, necesaria para replicar los extremos teloméricos mediante un proceso específico para esas regiones.

**Telómero:** 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. 3).

**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. 11).

**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").

**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.

**Triploidia:** Presencia de tres conjuntos cromosómicos. Es letal en la especie humana.



**Irrradio:** Punto de convergencia de tres áreas de crestas dérmicas y las tres crestas limitantes, formando un dibujo en Y (véanse "dermatoglifos" y cap. 1).

**Trisomía:** Presencia por triplicado de un cromosoma; la más frecuente es la del cromosoma 21, que causa el síndrome de Down.

**Vector:** Cualquiera de los diferentes tipos de moléculas de ADN utilizadas para vehicular fragmentos de ADN al interior de una bacteria o de otra célula, con el fin de clonar

el fragmento vehiculado. Los principales vectores son "plásmidos", "cósmidos" y "cromosomas artificiales" (véase cap. 2).

**X-frágil** (síndrome del): Véanse frágil y cap. 14.

## BIBLIOGRAFÍA

Lewin B: Genes V. Oxford, UK: Oxford University Press, 1994.

Rieger R, Michaelis A, Green MM: Glossary of Genetics. Classical and Molecular, 5<sup>ta</sup> ed. Berlín: Springer-Verlag, 1991.

# Índice analítico

## A

Ácido  
  desoxirribonucleico. Véase ADN  
  homogentísico, 214  
  retinoico, 255  
Acondroplasia, 260  
Activadores, 76  
Actividad de la telomerasa, 55  
Adenina, 35  
Adipsina, 326  
ADN, 35  
  alfoide, 47, 50  
  anónimo, 156  
  circular, 41  
  clasificación de las secuencias, 45  
  clonación o multiplicación de fragmentos, 28  
  complementario, 70  
  componentes del, 35  
  cruciforme, 42  
  desnaturalización, 43  
  "desperdicio", 46  
  "egoísta", 46, 68  
  empaquetamiento del, 50  
  estructura del, 35  
  forma  
    B, 37  
    Z, 37  
  genotecas de, 29  
  hibridación, 43  
  mitocondrial, 208  
  molécula de, 37  
  morfología del, 39  
  polimerasa, 84  
  propiedades funcionales, 43  
  recombinante, 19  
  de las regiones centroméricas, 47, 50  
  reparación, 85  
  ruptura de las dos cadenas, 270  
  satélites, 46  
  secuenciación del, 31  
  de secuencias accesorias, 47  
  sondas de, 30  
  técnicas de replicación, corte y repegado, 19  
  telomérico, 47, 52  
  de triple hélice, 43  
  visualización de los fragmentos, 24  
Agentes mutagénicos, 95  
  químicos, 97  
Agregados, 307  
Ajuste sináptico, 180  
Albinismos  
  oculares, 119, 323  
  oculocutáneos, 119  
Alcaptonuria, 214

Alelos, 152  
Amelia, 3  
Análisis posicional, 14  
Anemia  
  falciforme, 245  
  de Fanconi, 93  
Anencefalias, 204  
Aneuploidia, 187, 281  
Angiogénesis, 313  
Angiopoyetinas 1 y 2, 314  
Anticodón, 63  
Antígeno leucocitario humano (HLA), 199  
Antioncogenes, 266  
Apolipoproteína E, 205  
Apoptosis, 260  
Aquirropodia, 3  
Aracnodactilia, 238  
Arboles genealógicos, 103  
ARN, 59  
  mundo de, 61  
  nucleares pequeños, 68  
  polimerasas, 74  
  de transferencia, 50  
Ataxia espinocerebelar I, 106  
Atrofia muscular espinobulbar, 139  
Autosomas, 102

## B

Bacteriófagos, 20, 27  
Balanceo, 67  
  reglas de, 67  
Bandeado cromosómico, 276  
  C, 277  
  G, 277  
  N, 277  
  Q, 276  
  R, 277  
Bebés colodión, 300  
Blot. Véase Impronta  
Bromuro de etidio, 24

## C

Caja  
  de CENP-B, 51  
  GAM, 135, 142  
Cambios premutacionales, 86  
Caminos metabólicos, 213  
Canales iónicos  
  del cloro, 115  
  genética, 304  
  de sodio, gen de la subunidad  $\alpha$ , 318  
Cáncer de colon hereditario, 88, 90  
Cap, 65



Caracteres  
   cuantitativos, 4  
   discretos, 4  
 Carga mutacional total, 69  
 Cariotipo humano, 50, 275, 278  
   clasificación de SINCH, 278  
 Cartilago, formación, 305  
 Cascadas regulatorias, 252  
 Ceguera para los colores, 165  
 Célula(s)  
   de Leydig, 129  
   precursoras de Sertoli, 128  
   satélites miogénicas, 161  
   terminales primitivas, 128  
 Centimorgan, 153  
 Cicladador térmico, 32  
 Cigoteno, 177  
 Cinetocoros, 51  
 Citosina, 35  
 Clatrina, 239  
 Clonación, 28  
 Clonado posicional, 150  
 Clonamiento direccional, 26  
 Código(s)  
   sin comas, 65  
   degenerado, 66  
   genético, 62  
   imbricados, 63  
   de principios éticos, 357  
   redundancia del, 66  
 Codón(es), 63  
   sinónimos, 66  
   de terminación, 66  
 Colágeno, 235, 307  
   genes, 235  
   tipos, 235  
 Colchicina, 276  
 Compensación de dosis génica, 170  
 Complejidad del genoma, 44  
 Complejo distrofina-proteínas asociadas, 162  
 Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), 199  
 Complejo de Origen de Replicación (COR), 57  
 Complejo sinaptonémico, 177  
   cariotipos, 180  
   estructura, 178  
   síntesis de los componentes, 179  
 Complejo de transcripción, 74  
   basal, 75  
   funcional, 75  
 Concordancia, 6  
 Condición XYY, 291  
 Condrodisplasias, 309  
 Condrodistrofia metafisaria de Jansen, 310  
 Conducto(s)  
   mesonefricos (de Wolff), 129  
   paramesonefricos (de Müller), 130  
 Conversión génica, 185  
 Corpúsculo de Barr, 168  
 Cósmidos, 27  
 Crecimiento  
   de las metafisis, 309  
   tumoral, naturaleza genética, 262  
 Cremallera de leucinas, 254  
 Crestas gonadales, 129  
 Cromátidas, 50  
 Cromosoma(s), 275  
   alteraciones estructurales, 282  
   anomalías estructurales, 292  
   anomalías numéricas, 283  
     de los cromosomas sexuales, 288  
   artificiales de levadura (cal), 28  
   autosomas, 102  
   bandeado cromosómico, 276  
   hibridación in situ y fluorescencia, 277  
   homólogos, 102  
   métodos de estudio, 276  
   pérdida de, con la edad, 334  
   plumulados, 182

sexuales, 102, 131  
 comportamiento meiótico, 131  
 contenido génico, 133  
 morfología, 131  
 X  
   inactivación, 168  
   ligamiento, 158  
   ionización, 170  
 Cromosopatías, 101, 280  
   clasificación, 281  
 Crossing-over, 152  
 Cuerpo XY, 132, 189  
 Cultivo de linfocitos, 276

## D

Daltonismo, 165, 167  
 Dedos de zinc, 254  
 Defectos de cierre del tubo neural, 204  
 Déficit de 21-hidroxilasa, 227  
 Degeneraciones maculares, 318  
 Deleciones, 282  
 Deriva génica, 94  
 Dermatoglifos, 7  
   alteraciones de los patrones de dibujo, 9  
 Dermatitis y mutaciones de la queratina, 235  
 Desarrollo  
   embrionario, 251  
   vascular, genética, 311  
 Desnaturalización del ADN, 43  
 Desoxirribosa, 36  
 Deterioro genético mitocondrial, 335  
 Determinación sexual, 125  
 Deuteranómalos, 165  
 Deuteranopes, 165  
 Diabetes insípida, 305  
 Diabetes mellitus  
   insulinodependiente, 198  
   no insulinodependiente, 200  
 Diacinesis, 177  
 Diandria, 281  
 Diginia, 282  
 Dihidrotestosterona, 139  
 Diminutos dobles, 57  
 Dineína, 51, 255  
 Diploteno, 177  
 Discordancia, 6  
 Disgenesia ovárica, 289  
 Disomía uniparental, 190  
 Displasia  
   campomélica, 142  
   cleidocraneal, 311  
   distrófica, 308  
   ectodérmica anhidrótica, 169  
 Distrofia(s)  
   de las cinturas escapulares y pelvianas, 162  
   de los miembros, 162  
   miotónica, 106  
   musculares distales, 162  
   seudohipertrófica de Duchenne, 159  
 Distrofina, 159  
   dominios, 160  
 Disyunción, 187  
 Dominancia, mecanismos, 117  
 Duplicación(es), 283  
   de genes, 49

## E

EcoRI, 20  
 Edad  
   frecuencia de mutaciones, 334  
   pérdida de cromosomas, 334  
 Efecto  
   dominante negativo, 238  
   fundador, 224  
 Ejes  
   del embrión, 254

meióticos, 177  
 Elemento(s)  
   central, 179  
   laterales, 178  
   Z, 138  
 Embriopatía por fenilcetonuria materna, 219  
 Empalme alternativo de ARNs, 69  
 Empaquetamiento del ADN, 50  
 Encefalopatía mitocondrial, 209  
 Endonucleasas de restricción. Véase *Enzimas de restricción*  
 Endopeptidasa neutra, 3  
 Enfermedad(es)  
   de Alzheimer, 205  
     forma esporádica, 206  
     formas mendelianas, 206  
     papel de las presenilinas, 207  
     patología, 205  
   de Charcot-Marie-Tooth, 14  
   de Christmas, 162  
   fibroquística, 113  
   de Gaucher, 225  
   genéticas  
     de herencia multifactorial, 101  
     monogénicas, 101  
     de origen cromosómico, 101  
     tipos, 101  
   hereditarias  
     enfoque molecular, 13  
     heterogeneidad genética, 13  
   de Huntington, 105  
   de Kennedy, 106, 139  
   lisosómicas, 222  
   pulmonar obstructiva crónica, 114  
   de Sandhoff, 224  
   de los sistemas reparativos del ADN, 85  
   de Stargardt, 318  
   de Tay-Sachs, 222  
   de von Recklinghausen, 110  
 Entrecruzamiento, 152  
 Entropía, 61  
 Envejecimiento, 331  
   causas, 332  
   definición molecular, 335  
   definiciones, 331  
   mecanismos, 333  
   precoz, enfermedades que aparentan, 336  
 Envejecimiento celular  
   replicativo, 56  
   y telómeros, 55  
 Enzimas de restricción, 19  
   de alta y baja frecuencia de corte, 23  
   mecanismo de acción, 20  
   nomenclatura, 20  
   propiedades, 22  
   tipos, 24  
 Epidermis  
   descamación, 303  
   envoltura córnea, 303  
   genética, 299  
   histofisiología, 302  
 Epidermolisis ampollar  
   atrófica, 33  
   distrófica, 235  
   simple, 234  
   de la unión, 235  
 Epilepsia mioclónica y fibras musculares deshilachadas, 208  
 Epiloia, 264  
 Epistasis, 119  
 Errores congénitos del metabolismo, 213  
   mecanismos patogénicos, 215  
 Esclerosis tuberosa, 264  
 Esperanza de vida, 331  
 Esquizofrenia, 205  
 Estatura, 10  
 Estigmas de Turner, 144, 289  
 Eumelanina, 321  
 Eumelanosomas, 323

Exon(es), 69  
 Expansión  
   de repeticiones de trinucleótidos, 106, 293  
   de tripletes, 139  
 Extremos  
   colgantes, 21  
   pegajosos, 21

## F

Factor(es)  
   ambiental, 1  
   de azoospermia, 190  
    $\beta$  de crecimiento y transformación, 138, 309  
   de crecimiento endotelial vascular, 314  
   de crecimiento fibroblástico 4 (FCF-4), 258  
   determinante de testículo (TDF), 135  
   esteroidogénico 1, 141  
   hereditario, 5  
   de transcripción, 14, 75, 89  
   VIII de la coagulación, 162  
   Z, 140  
 Fago lambda, 27  
 Familias génicas de globinas, 49, 243  
 Favismo, 163  
 Fenilcetonuria, 219  
   camino metabólico y bloqueo, 220  
   gen de la fenilalanina-hidroxilasa, 221  
   patogenia y tratamiento, 222  
 Fenocopias, 2  
   interpretación, 4  
   en malformaciones, 3  
 Fenómeno de la anticipación, 107  
 Fenotipo, 1, 101  
   sexual, 126  
 Feomelanina, 321  
 Feomelanosomas, 323  
 Fibrilina, 238  
 Filagrina, 302  
 Filamentos  
   intermedios, 231  
   transversales, 178  
 Formas tautoméricas de bases, 83  
 Formil-metionina, 65  
 Fotorreceptores, genética, 316  
 Fractura de la cadena doble, 184  
 Fragmentos de restricción, 20  
 Frecuencia de corte, 23

## G

Galactitol, 217  
 Galactosa-1-fosfato, 217  
 Galactosemia, 216  
   camino metabólico de la galactosa, 217  
   gen de GAL, 218  
   mecanismos patogénicos, 217  
   transmisión y tratamiento, 218  
 Gangliósido G(M2), 223  
 Geles de agarosa, 24  
 Gemelos monocigóticos, 5  
 Gen(es)  
   ABCR, 318  
   de actividad tardía, 333  
   de la acuaporina 2, 305  
   de la amelogenina Y, 143  
   del angiotensinógeno, 202  
   ANT3, 133  
   anti-Turner, 290  
   APOE, 208  
   arca de Noé, 95  
   ASIP, 323, 329  
   ASMT, 133  
   AZF, 190  
   blanco, 252  
   del canal de sodio del epitelio tubular, 201  
   COL1A1, 238  
   de colágeno (COL), 235



para el color de la piel, 10  
 conceptos de, 68  
 conmutadores, 252  
 CSA, 92  
 CSB, 92  
 CSF2RA, 133  
 CYP21B, 228  
 de la distrofina, 82, 159  
 duplicación de, 49  
 de la enfermedad fibroquística, 114  
 env, 265  
 erizo  
   desértico, 310  
   índico, 309  
   sónico, 258, 310  
 esquema general, 69  
 para la estatura, 10  
 de expresividad variable, 13  
 del factor VIII, 163  
 familias, 49  
 de la fenilalanina-hidroxilasa (SAH), 221  
 FMR-1, 294  
 de la fosfodiesterasa, 117  
 G6PD, 163  
 gag, 265  
 de la  $\beta$ -galactosidasa, 27  
 GALT, 218  
 de globinas, 244  
 de la glucoquinasa, 200  
 de la  $\beta$ -glucosidasa (GBA), 225  
 de la HAM, 138  
 HEXB, 224  
 de la hexosaminidasa A (HEXA), 223  
 HGO, 214  
 de la 11-hidroxilasa, 146  
 de la 21-hidroxilasa, 146, 228  
 hipostático, 119  
 homeóticos, 251  
 HOX, 255  
 HOX D13, 260  
 Hox1, 255  
 Hoxb1, 255  
 HPRT, 165  
 de la Hungtintina, 107  
 HYP, 2  
 IDS, 168, 226  
 IL3RA, 133  
 interruptores, 252  
 KVLQT1, 305  
 LEPR, 328  
 de la leptina, 327  
 LQT2, 305  
 de mantenimiento, 69, 252, 333  
 MIC2, 133  
 MITF, 325  
 NF-1, 110  
 NF-2, 110  
 noquear el, 14, 98  
 número en el genoma humano, 69  
 OA-1, 324  
 OSF2/CBFA1, 311  
 P, variantes alélicas, 322  
 p21, 271  
 PAX, 256  
 PAX3, 257, 325  
 PAX6, 257  
 de la periferina, 318  
 PEX, 2  
 de pigmento de conos sensibles al rojo (PCR), 164  
 de pigmento de conos sensibles al verde (PCV), 164  
 pol, 265  
 PPA, 206  
 de la presenilina 1 (PS1), 206  
 de la presenilina 2 (PS2), 206  
 de la proteína marginal, 318  
 de la Proteína de Mielina Periférica (PMP 22), 14  
 de la Q2e, 302

R3FCF, 261  
 RA, 139  
 RBM1, 190  
 RBM2, 190  
 del receptor 1 de la melanocortina, 322  
 del receptor de LBD, 239  
 regulador transmembranoso de la fibrosis quística (RTFQ),  
   114  
 de reparación del ADN, 264, 333  
 del retinoblastoma, 266  
 de la rodopsina, 117, 317  
 RPS4X, 171  
 sintéticos, 150  
 SOD-1, 288  
 SOX, 142  
 SOX9, 142, 309  
 SRY, 128, 131, 252  
 STS, 300  
 de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la fosfodiesterasa de GMPc,  
   318  
 supresores de tumores, 264  
 de la susceptibilidad al cáncer de mama familiar (BRCA1),  
   271  
 Syn1, 179  
 TGM1, 301  
 para la tirosinasa IA, 119  
 transductores de señales, 252  
 TSC1, 264  
 TSC2, 264  
 WNR, 94  
 Wnt7a, 259  
 XIST, 168, 189  
 Z, 144  
 GENE CARDS, 361  
 Genealogías, 103  
 Genoma humano  
   número de genes, 69  
   proyecto del, 70  
 Genoteca(s)  
   de ADN complementario, 29  
   genómicas, 29  
 Genotipo, 1  
 Globinas, 241  
   estructura de los genes, 244  
   familias génicas, 243  
 Glucocerebrosidasa, 225  
 Glucoproteína asociada a la distrofina (GAD), 160  
 Gónada primitiva, 126  
   diferenciación, 126  
 Gonocitos, 128  
 Gráficos "Cor", 45  
 Gray, 95  
 Guanina, 35

## H

Helicasas, 92, 336  
 Hélice(s)  
   antiparalelas, 38  
   de antisentido, 38  
   derecha, 37  
   grado de torsión, 39  
   molde, 38  
   negativa, 38  
   positiva, 38  
   de sentido, 38  
   triples, 43  
 Hemofilia  
   A, 1, 48, 159  
   B, 162  
 Hemoglobina(s), 241  
   Barths, 247  
   estructura, 242  
   fetal, 242  
   persistencia hereditaria, 246  
   humanas normales, 242  
   S, 245

Herencia  
   de caracteres cuantitativos, 7  
   humana, 101  
     autosómica dominante, 103  
     autosómica recesiva, 104  
     intermedia, 102  
     mendeliana, 102  
     multifactorial, 101, 195  
     tipos, 101  
   mitocondrial, 208  
   monogénica, 5  
 Hermafrodita(s)  
   fértil, 146  
   verdadero, 144  
 Hermafroditismo  
   lateral, 144  
   verdadero, 144  
 Heterocigosidad, pérdida de la, 90, 264  
 Heterocigota, 102  
 Heterodímeros, 218, 232  
 Heterodúplex, formación de, 185  
 Heterogametismo masculino, 131  
 Heterogeneidad  
   de causas genéticas, 3, 13, 99  
   interalélica, 13, 117  
   intraalélica, 13, 117  
 Heteroplasma, 208  
 Hexanucleótido TTAGGG, 52  
 Hexosaminidasa B, 223  
 Hibridación del ADN, 44  
   estricta de las condiciones, 44  
   pasos de la, 44  
 Hibridación in situ y fluorescencia (HISYF), 188, 277  
   detección de aneuploidia en espermatozoides, 188  
 Hipercolesterolemia familiar, 241  
 Hiper Cromicidad, 36  
 Hiperfenilalaninemia, 219  
 Hiperplasia adrenal congénita, 227  
 Hiperqueratosis epidermolítica, 301  
 Hipertensión  
   esencial, 200  
   mendeliana, 200  
 Hipótesis  
   multifactorial, 197  
   de las mutaciones múltiples, 263  
 HLA, 199  
 Holoenzima, 75  
 Hombres XX, 141  
 Homeobox, 255  
 Homeocaja, 255  
 Homeodominios, 254  
 Homocigota, 102  
 Hormona(s)  
   anti-mülleriana, 128, 138  
   esteroideas, 139  
   estimulante de los melanocitos, 324  
 HpaII, 23  
 Huntingtina, 107

## I

Ictiosis, 299  
   ampollar de Siemens, 302  
   lamelar, 300  
   ligada al sexo, 300  
 Idiocia amaurotica, 222  
 Iduronato-2-sulfatasa, 226  
 Impronta(s), 30  
   génica, 170, 190  
   de Northern, 31  
   puntuales, 33  
   de Southern, 31  
   Western, 31  
 Inactivación del cromosoma X, 168  
 Índice de masa corporal, 330  
 Inestabilidad de microsatélites, 86, 90  
 Infertilidad humana masculina, 189

Información genética, 59  
   circuitos, 60  
   no traducible, 60  
   transcriptible, 60  
 Información, concepto, 61  
 Inserto, 26  
 Insuficiencia haploide, 142, 258  
 Intensificador, 69  
 Interacción alélica, 119  
 Intercambio entre cromátidas hermanas, 150  
 Interfase premeiótica, 176  
 Intermediario de Holliday, 183  
 INTERNET, 361  
   sitios de la Red, 361  
 Intrones, 69  
   mutaciones en, 224  
 Inversiones  
   paracéntricas, 283  
   pericéntricas, 283  
 Islas CpG, 69  
 Isocromosoma, 283

## J

Junk DNA, 46

## K

Kinesina, 51

## L

Labio leporino, 204  
 Lapso de vida, 331  
   consecuencias sociales del aumento, 337  
   medio, 331  
 Lazos  
   D, 41, 208  
   deslizantes, 43  
   R, 41  
 Lenguajes genéticos formales, 68  
 Leptina, 326  
 Leptoteno, 177  
 Ligamiento, 149  
   desequilibrio de, 157  
   equilibrio de, 157  
   fases, 156  
   grupos de, 153  
   longitud total del mapa, 153  
   mapa femenino de, 153  
   marcadores para el estudio, 154  
   uso de lods, 157  
 Ligasa, 22  
 Límite de Hayflick, 56  
 LINEs, 48  
 Lionización, 170  
 Lipoproteínas de baja densidad, 239  
 Locus, 68  
 Longevidad, 331  
   heredabilidad, 336

## M

Macromelanosomas, 323  
 Mapa de restricción, 24  
 Mapa(s)  
   de desnaturalización, 41  
   físico, 70, 73  
   de fragmentos superponibles o contiguos, 73  
   de sitios de restricción, 73  
   de sitios rotulados por secuencias conocidas, 73  
   de ligamiento o genéticos, 73, 150  
 Marcadores moleculares, 154  
   microsatélites, 154  
   minisatélites, 154  
   polimorfismos, 155  
 Marco de lectura, 65  
   abierto, 15, 68  
   determinación, 65



Meiosis, 175  
 fases, 176  
 no-disyunción, 187  
 Melanosoma, 120, 323  
 Meromelia, 3  
 Metil guanosina, 65  
 Metionina, 65  
 Microdeleciones, 282  
 Microsatélites, 154  
 Minisatélites, 154  
 Molécula de ADN, 37  
 Mongolismo. Véase *Síndrome de Down*  
 Monosomía, 281  
 Morfología del ADN, 39  
 Mosaicismo, 282  
 funcional, 146  
 $X_m/X_p$ , 171  
 Mosaicos cigóticos, 144  
 Motivo(s), 253  
 dedos de zinc, 254  
 hélice-vuelta-hélice (HVH), 253  
 Mucopolisacaridosis de tipo II, 168, 226  
 Mujer XY, 144  
 Mundo de ARN, 61  
 Mutación(es), 79  
 de cambio de encuadre, 80  
 de cambio de sentido, 81  
 condicional, 115  
 delta-F-508, 115  
 de elementos de control, 81  
 espontáneas, 81  
 de expansión de repetición de triplete, 81  
 de extensión variable, 79  
 del gen de GALT, 218  
 del gen del R-LBD, 240  
 del gen RTFQ, 115  
 del gen SRY, 137  
 de los genes COL, 236  
 inducción, 95  
 inducidas, 81  
 mecanismos, 83  
 de la neurofibromina, 111  
 de novo, 103, 112  
 puntuales, 79  
 Q188R, 218  
 sin sentido, 81  
 silenciosas, 79  
 somáticas, 81  
 tasas, 81  
 tipos, 79  
 Mutante condicional, 164

## N

Neurofibromatosis I, 110  
 Neurofibromina, 111  
 Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), 208  
 Neuropeptido Y, 327  
 No-disyunción, 187  
 de cromosomas sexuales, 189  
 materna, 188  
 meiótica, 187  
 mitótica, 187  
 paterna, 188  
 Nódulo de recombinación, 132, 181  
 NotI, 23  
 Nucleótidos, 35

## O

Obesidad  
 experimental en el ratón, 327  
 humana, heredabilidad, 330  
 Ocronosis, 214  
 OMIM, 361  
 Oncogén(es), 264  
 celular, 265

Opsinas, 316  
 Optanucleótido "chi", 185  
 Ordenes de compactación, 50  
 fibra de cromatina, 50  
 lazos de fibra de cromatina, 50  
 nucleosómico, 50  
 Organizadores nucleolares, 50  
 Orígenes de replicación potenciales, 57  
 Osteocalcina, 311  
 Osteogénesis, 310  
 imperfecta, 237  
 Osteonectina, 311  
 Osteopontina, 311  
 Ovillo neurofibrilar, 205  
 Ovotestis, 142, 144

## P

Paladar hendido, 197, 204  
 Paludismo, 164  
 Paquioniquia congénita, 303  
 forma Jackson-Lawler, 304  
 forma Jadassohn-Lewandowsky, 304  
 Paquitenio, 177  
 PCR, 31  
 Penetrancia, 12, 103  
 Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal, 246  
 Peso corporal, regulación, 329  
 Piebald, 121, 257  
 Pigmentación humana, genética, 321  
 Pintado cromosómico, 278  
 Pirimidinas, 35  
 Plásmidos, 25  
 comerciales, 26  
 Pleiotropía, 12, 237  
 Pliegue simiano, 9  
 Polaridad, 36  
 Polianión, 37  
 Polimerasa termorresistente Taq, 32  
 Polimorfismos de longitudes en fragmentos de restricción, 19, 154  
 Polinucleótido, 35  
 Polisomías del cromosoma X, 290  
 Potencialidad bisexual, 144  
 Premutación, 294  
 transmisión de la, 294  
 Presenilinas, 206  
 Prímeros oligonucleotídicos degenerados, 279  
 Principios éticos, 357  
 Pro-opiomelanocortina, 324  
 Probabilidad, concepto, 61  
 Progeria del adulto, 336  
 Programa de eugenesia, 357  
 Promotor, 69  
 Propósito, 103  
 Protanómalos, 165  
 Protanopes, 165  
 Proteína(s)  
 activadora de GTPasa, 111  
 alostérica, 241  
 antagonista del receptor R1MC, 322  
 centroméricas, 51  
 CENP-B, 51  
 CENP-C, 52  
 CENP-E, 51  
 Cor1, 179  
 desacoplante, 326  
 estructurales, anomalías, 231  
 FMR-1, 296  
 de fusión, 27  
 hMSH2, 88  
 hsRad51, 185  
 ligadora de lípidos del adipocito, 326  
 ligadora de TATA, 75  
 ligantes de ADN, 179  
 marginal, 318  
 morfogenéticas del hueso, 308

p51, 180  
 p53, 269  
 pRB, 267  
 precursora de amiloide (PPA), 205  
 Rad51, 180, 185  
 RecA, 185  
 relacionada con la paratohormona, 309  
 revolvases, 185  
 RTFQ, 115  
 SCP2, 180  
 Syn1, 179  
 tau, 205  
 topoisomerasa II, 180  
 transportadora de sulfato, 308  
 XY40, 180  
 Proteoma, 71  
 Protooncogenes, 265  
 Prueba de Ames, 98  
 Pseudogenes, 48  
   procesados, 48  
 Pseudohermafroditismo, 146, 227  
 Punto de restricción, 268  
 Purinas, 35

## Q

Queratinas, 232  
   dermatosis, 235  
   familias génicas, 234  
   función normal, 233  
   mutaciones de los genes, 234  
   organización, 232  
   duras o tricocíticas Q16 y Q17, 233, 304  
   Q1-Q10, 301  
 Queratinocitos, 234  
 Quiasma, 152, 181  
 Quimeras, 144

## R

Rad, 95  
 Ranura  
   mayor, 38  
   menor, 38  
 Raquitismo  
   hipofosfatémico, 2  
   nutricional, 2  
 Rasgos  
   complejos, 5  
   cuantitativos, 6  
   discontinuos, 6  
   heredabilidad, 6  
   métricos, 5  
 Rasgo de células falciformes, 245  
 RCP-TI, 33  
 Reacción en cadena de las polimerasas (RCP), 31  
 Reacción p53, 270  
 Receptor(es)  
   activado por proliferantes de peroxisomas, 326  
   de andrógenos, 139  
   3 para el factor de crecimiento fibroblástico, 261  
   de hormonas esteroideas, 139  
   R1FCF, 258  
 Recesividad, mecanismos, 117  
 Recombinación meiótica, 151, 182  
   alineamiento, 184  
   conversión génica, 185  
   formación de heterodúplex, 185  
   fractura de la cadena doble, 184  
   modelo molecular de Holliday, 183  
   nódulos de recombinación tardíos, 186  
 Recuento total de crestas, 8, 196  
 5- $\alpha$ -reductasa, 130  
 Reemplazo génico dirigido, 98  
 Región  
   controladora de locus, 244  
   determinante sexual del Y, 135

retrocromatina Iqit, 134  
 pseudoautosómica, 133, 189  
   de tinción homogénea, 57  
 Reglas del balanceo, 67  
 Reloj molecular, 94  
 Renaturalización, 44  
 Reparación del ADN  
   acoplada a la transcripción (RAT), 92, 336  
   de daños por radiación UV, 87  
   en la desaminación y alquilación de bases, 87  
   por escisión de bases (REBA), 86, 87  
   por escisión nucleotídica (REN), 86, 88  
   de mal apareamiento de bases (REMA), 85, 88  
   de ruptura de doble cadena, 86  
 Repeticiones en tándem de número variable (RTNV), 154  
 Replicones, 57  
 Repliegue ectodérmico apical, 258  
 Retinitis pigmentaria, 117, 317  
 Retinoblastoma, 266  
 Retroposones, 47, 163  
 Retrovirus, 265  
 Reversión sexual, 142  
 Ribozimas, 61  
 Rotulación combinatoria por múltiples fluorocromos, 279  
 Rótulos de secuencias expresadas, 71

## S

*Saccharomyces cerevisiae*, 71  
 Secuencia(s)  
   de alto grado de repetición, 45  
   Alu, 47  
   anterior no traducida (SANT), 69  
   clasificación, 45  
   codificantes, 45  
   consenso autónoma (SCA), 57  
   conservadas de ADN, 95  
   divergentes, 95  
   DXYS14, 133  
   L1Hs, 48  
   de moderado grado de repetición, 45  
   motivo, 135  
   no codificantes, 45  
   palindrómicas, 20  
   posterior no traducida (SPNP), 69  
   reguladoras  
     alejadas, 69  
     inmediatas, 69  
   reiteradas, 44  
   repetidas, 45  
   repetidas cortas y dispersas (SINEs), 47  
   repetidas largas y dispersas (LINEs), 48  
   de replicación autónoma (SRA), 57  
   de respuesta al ácido retinoico, 255  
   de Shine-Dalgarno, 65  
   TATA, 76  
   de tipo conservada, 70  
   únicas, 45  
 Secuenciación del ADN, 31, 70  
   métodos  
     de base enzimática de Sanger, 71  
     de los dideoxinucleótidos (ddNTP), 71  
 Segunda ley de Mendel, 150  
 Sexo  
   constitutivo, 140  
   criterios de asignación, 126  
   por defecto, 135, 140  
   determinación genética, 125  
   homologías embrionarias, 126  
 Sievert, 95  
 Silenciador, 69  
 Simpodactilia, 260  
 Sinapsis  
   cromosómica, 177  
   parcial, 132  
 Sindactilia de tipo II, 260  
 Síndrome(s)  
   adrenogenital, 146, 227



SINES, 47  
 Síntesis  
   diferida de ADN cigoténica, 177  
   premeiótica de ADN, 177  
 Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana, 278  
 Sitio(s)  
   3' de corte y empalme, 77  
   5' de corte y empalme, 77  
   alternativos o críticos, 77  
   de clonación múltiple, 27  
   frágiles, 292  
     FRAXA, 292  
     FRAXE, 293  
     FRAXF, 293  
   de restricción, 24  
 Sonda  
   de ADN, 30  
   de pintado cromosómico, 279  
 Sordera  
   congénita, 4  
   hereditaria, 257  
 Suicidio proteínico, 237  
 Sulfatasa esteroidea STS, 300  
 Superenrollamiento  
   negativo, 41  
   número de enlace, 41  
   positivo, 41  
 Sustancias intercalantes, 39

## T

Talasemias, 247  
 Talidomida, 3  
 Tasas de mutación espontánea, 81  
   medición molecular, 83

Tasa, 50  
 Tasa, 85  
 Tasa, 325  
 Tasa, 54  
 Tasa, 50  
 Tasa y envejecimiento celular, 55  
 Temperatura  
   de fusión, 43  
   de separación de cadenas, 43  
 Tempus gémica, 118  
 Tesaurinos, 212  
 Testosterona, 139  
 Tetrahydrobiopterina (BH4), 221  
 Timina, 35  
 Tirosinasa, 325  
 Traducción, 59  
 Transcripción, 59  
 Transcriptasa inversa, 33, 48, 49, 265  
 Transglutaminasa TGM1, 301  
 Translocaciones  
   recíprocas, 283  
   robertsonianas, 283  
 Transposones, 47  
 Triplete de iniciación, 65  
 Triirradió, 8  
   axial, 9  
 Trisomía, 281  
   del cromosoma 13, 288  
   del cromosoma 18, 288  
   del cromosoma 21, 283. Véase también *Síndrome de Down*  
   del cromosoma X, 292  
 Tuberina, 264  
 Tumores  
   benignos, 264  
   malignos, 262

## U

Unidad(es)  
   Roentgen, 95  
   de transcripción, 68  
 Uniones  
   hidrógeno, 38  
   de Hoogsteen, 43, 52  
 Uñas, alteraciones hereditarias, 303  
 Uridindifosfogalactosa-4-epimerasa, 217  
 Utrofina, 161

## V

Valores de Z, 157  
 Varianza genotípica, 6  
 Varones XX, 143  
 Vasculogénesis, 313  
 Vectores, 25  
   bacteriófagos como, 27  
   de expresión, 27  
 Virus  
   de la leucosis aviaria, 264  
   del sarcoma de Rous, 264  
   del SIDA, 85, 265  
   hipermutabilidad, 85  
 Vitamina D, deficiencia, 2

## X

Xeroderma pigmentoso, 76, 91

## Z

Zona  
   de actividad polarizante, 258  
   mesenquimática de progreso, 258