

<b>CROMOSOMAS HUMANOS .....</b>	<b>5</b>
CITOGENÉTICA .....	5
MORFOLOGÍA DE CROMOSOMAS HUMANOS .....	5
<i>Estructura de los cromosomas</i> .....	6
<i>Estructura molecular</i> .....	7
TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROSCÓPICAS .....	7
<i>Técnicas de identificación</i> .....	7
Técnicas de bandeado cromosómico .....	7
Bandeo de baja resolución .....	8
Bandeo de alta resolución .....	8
<i>Técnicas moleculares</i> .....	9
<b>ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.....</b>	<b>11</b>
ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS .....	11
Poliploidía .....	11
Aneuploidía .....	11
Mixoploidía .....	12
ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES .....	12
DISOMÍA / DIPLOIDÍA UNIPARENTAL .....	14
ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS .....	15
CASOS DE ANOMALÍAS DE INTERÉS CLÍNICO .....	16
<i>Trisomía del cromosoma 21: Síndrome de Down</i> .....	16
<i>Trisomía del cromosoma 18: Síndrome de Edward</i> .....	16
<i>Trisomía del cromosoma 13: Síndrome de Patau</i> .....	17
<i>Síndrome “Cri du chat”</i> .....	17
<i>Síndrome de Wolf – Hirschhorn</i> .....	17
<i>Síndromes de microdeleciones</i> .....	17
Síndrome de Prader – Willi .....	17
Síndrome de Angelmann .....	17
<b>CROMOSOMAS SEXUALES Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL .....</b>	<b>18</b>
ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN X E Y .....	18
<i>Monosomía del cromosoma X: Síndrome de Turner</i> .....	19
<i>Síndrome de Klinefelter</i> .....	19
<i>Síndrome de los Supermachos</i> .....	20
<i>Síndrome de las Superhembras</i> .....	20
<i>Síndrome de Kallman</i> .....	20

<i>Síndrome del X frágil</i> .....	20
Expansión dinámica .....	21
FRAXA.....	21
FRAXE .....	21
BASES CROMOSÓMICAS DE LA DETERMINACIÓN DEL SEXO.....	22
<i>Hermafroditismo verdadero</i> .....	22
<i>Pseudohermafroditismo</i> .....	23
INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X .....	23
Método de inactivación.....	24
EVOLUCIÓN DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES .....	25
<b>ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y CÁNCER.....</b>	<b>26</b>
VISIÓN GENÉTICA Y HEREDITARIA.....	26
Oncogenes.....	27
Mecanismo de inicio de un tumor.....	27
Mutaciones puntuales .....	27
Anomalías cromosómicas.....	27
Genes supresores de tumores(TS).....	28
<b>GENÉTICA DE RASGOS COMPLEJOS.....</b>	<b>30</b>
APROXIMACIÓN A LA BASE GENÉTICA DE UN RASGO NO MENDELIANO .....	30
MODELO POLIGÉNICO DE CARACTERES CUANTITATIVOS .....	31
Rasgos oligogenéticos.....	31
Análisis segregacional.....	31
Identificación de genes de rasgos complejos .....	31
Análisis de ligamiento paramétrico.....	31
<b>GENOMA HUMANO.....</b>	<b>33</b>
COMPOSICIÓN .....	33
MAPAS FÍSICOS DEL GENOMA .....	34
FISH .....	35
Mapas de restricción .....	36
Mapa de clones.....	36
Vectores de clonaje para fragmentos de DNA de gran tamaño .....	36
YACs.....	36

pYAC 4 .....	37
<i>Chromosome Walking</i> .....	38
<i>Fingerprinting</i> .....	38
<b>MAPAS GENÉTICOS.....</b>	<b>39</b>
MARCADORES GENÉTICOS .....	39
RFLPs (Restriction Fragment Length Polimorfism) .....	39
SSLPs (Single Sequence Length Polimorfism).....	40
VNTRs (Variable Number Tandem Repeats).....	40
STRs (Short Tandem Repeats) .....	40
SNPs (Single Nucleotide Polimorfism).....	40
Informatividad de un marcador .....	40
MAPAS DE MÚLTIPLE PUNTOS (MULTIPOINT).....	41
<b>MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE GENES .....</b>	<b>43</b>
INSPECCIÓN INFORMÁTICA .....	43
MÉTODOS EXPERIMENTALES .....	43
<i>Zoo Blot</i> .....	43
<i>Hibridación sobre Northern</i> .....	43
<i>Exon trapping</i> .....	43
<i>cDNA selection</i> .....	43
ESTRATEGIA DE CLONACIÓN DE GENES .....	44
<i>Clonaje funcional</i> .....	44
<i>Clonaje de genes candidatos</i> .....	44
<i>Clonaje posicional</i> .....	44
<i>Clonaje de genes candidatos posicional</i> .....	44
FIBROSIS QUÍSTICA (CF) .....	45
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD).....	46



## Cromosomas humanos

El estudio de los cromosomas humanos se puede remontar como mucho a 1865, con Mendel, aunque de hecho la citogenética humana se empezó a desarrollar en 1956, momento en que se inició un avance que ha culminado con la secuenciación del genoma.

### Citogenética

Se trata del estudio de los cromosomas. Los cromosomas son estructuras filamentosas, en las que se organiza la cromatina del núcleo. Son especialmente visibles en determinadas fases del ciclo celular.

En el interior de los cromosomas están agrupados los genes, que serán los que determinen la herencia.

En 1956 Tjio y Lever identificaron el número de cromosomas humanos. Hasta ese momento se había creído que  $2n=48$ . Utilizaron un método que implicaba la inyección de una solución hipotónica en el núcleo de células en cultivo, con lo que los cromosomas se separaban.

A partir de ese momento muchos autores iniciaron estudios de diferentes enfermedades y síndromes. La época de mayor auge de la citogenética fue de 1956 a 1970. A partir de 1970 se introdujeron técnicas de bandeo cromosómico, que permiten la identificación de los cromosomas, que junto a los diferentes avances técnicos, como el microscopio electrónico, permitieron un mejor estudio. A partir de los años 90 se pueden utilizar moléculas para la tinción de cromosomas.

La citogenética sigue siendo hoy en día una herramienta de gran interés en clínica. Las anomalías cromosómicas son muy importantes, ya que 1 de cada 150 nacidos vivos tiene alguna anomalía cromosómica. Se trata de la primera causa de retraso mental, así como de muerte embrionaria temprana, 50 % de los abortos en los primeros 3 meses de gestación y 20 % de los abortos en períodos inferiores a 6 meses. Se trata también de una de las principales causas de los defectos congénitos.

### Morfología de cromosomas humanos

El ser humano tiene  $2n=46$  cromosomas, en forma de 22 autosomas y 1 cromosoma sexual, que contienen en su interior aproximadamente 3000 Mb.

Existen correlaciones entre DNA, complejidad y tamaño con número de cromosomas. No obstante existen excepciones, como puede ser la cebolla, con  $2n=8$ , pero que contiene 15000 Mb.

En una especie puede haber células con diferente número de cromosomas, como se indica en la tabla. La cantidad de DNA presenten en cada célula dependerá también de la fase del ciclo celular en la que se encuentre ésta, de su número de cromátidas. Se pensó que existiría un parecido entre el número de cromosomas de los humanos y los primates. Los Platyrrhini tienen 46 cromosomas, y los grandes simios tienen 48 cromosomas. Se cree que un cromosoma humano puede ser el resultado de la fusión de 2 cromosomas de chimpancé.

Eritrocitos	$0n$
Gametos	$1n$
Somático	$2n$
Muscular y otros	$Xn$

Cromosomas por tipo celular

El estudio de los cromosomas se suele hacer en metafase, puesto que en esa fase los cromosomas están más compactados. Tienen una constricción, que se conoce como centrómero, que determina dos brazos, uno largo, conocido como q, y otro corto, que se conoce como p. Esto permite identificar los brazos de los cromosomas, de manera que 5p es el brazo corto del cromosoma 5.

## Estructura de los cromosomas

### *Metacéntricos*

El centrómero se sitúa en el centro, formando dos brazos muy similares

### *Submetacéntricos*

El centrómero está desplazado, formando dos brazos, uno largo y otro corto

### *Acrocéntricos*

El centrómero está muy desplazado. Tienen los satélites unidos al resto del cromosoma por un pedúnculo.

### *Teloméricos*

No existen en el hombre

Los cromosomas humanos son de tamaño variable, lo que influyó también en su nomenclatura, de manera que 1 es el más grande, y su tamaño se va reduciendo, pero el 22 es más grande que el 21. La estructura también varía. Se puede expresar mediante lo que se conoce como índice centromérico, que relaciona la longitud de p y la longitud de q, multiplicadas por 100.

Existen tan solo 5 cromosomas acrocéntricos: 13, 14, 15, 21 y 22. Estos cromosomas pueden tener grados de desarrollo diferentes de los satélites. Además, aparte de numerarlos por número, existe una clasificación por categorías.

### **Clasificación de los cromosomas humanos**

Grupo A:	Metacéntricos más grandes	1, 2, 3
Grupo B:	Submetacéntricos	4, 5
Grupo C:	Submetacéntricos	6, 7, 8, 9, X, 10, 11, 12
Grupo D:	Acrocéntricos más grandes	13, 14, 15
Grupo E:	Submetacéntricos más pequeños	16, 17, 18
Grupo F:	Metacéntricos más pequeños	19, 20
Grupo G:	Acrocéntricos más pequeños	21, 22

Se ha de tener en cuenta:

Existe heterocromatina constitutiva detectable en 1, 9 y 16

Los cromosomas acrocéntricos pueden presentar diferentes grados de desarrollo entre individuos

El cromosoma Y puede variar su tamaño en individuos de una misma especie

## Estructura molecular

El DNA llega a condensarse hasta 6 niveles, pasando por los nucleosomas, formados por histonas, hasta el solenoide. El resultado final es una condensación aproximada de unas 50.000 veces. Existirán zonas más o menos condensadas, dependiendo de la expresión que se de en esa zona. Los cromosomas de las células vivas son estructuras dinámicas.

Para el correcto funcionamiento de los cromosomas son necesarios centrómero, telómeros y orígenes de replicación.

Se ha observado que los centrómeros son estructuras intercambiables. Están formados por DNA repetitivo muy condensado. Los telómeros son básicos, ya que se sitúan en los extremos de los cromosomas. Van perdiendo fragmentos a medida que se suceden las divisiones. En el ser humano la síntesis de DNA se inicia en distintos puntos repartidos por todo el cromosoma.

## Técnicas de análisis microscópicas

Existen diferentes tipos de técnicas.

### Técnicas de identificación

Permiten la identificación de los cromosomas. Pueden ser mediante la presencia de bandas o por colores.

### Técnicas de bandeo cromosómico

Se basan en la técnica usada en el 56 por Tjio y Lever. Existen 3 bases:

- Uso de inhibidores de la división, del ciclo celular, como puede ser la colchicina.
- Tratamiento hipotónico de los núcleos, para su rotura y separación de cromosomas.
- Utilización de colorantes de absorción diferencial por las distintas partes del cromosoma.

Debemos distinguir entre:

- Cariotipo: cromosomas en preparación
- Cariograma: ordenación de los cromosomas por tamaño y homología
- Idiograma: esquematización de las bandas

Las bandas pueden ser llamadas isocoras. Las técnicas de bandeo se iniciaron en 1969, con Casperson, que hizo una tinción con mostaza de quinacrina. Existe correspondencia entre los patrones de bandas de las diferentes técnicas.

Para hacer un bandeo, será necesario, antes de nada, obtener los cromosomas a bandear. Para esto serán necesarias células. El método más usado es la sangre, ya que se trata de un método poco invasivo, y las células obtenidas crecen rápidamente. Otra opción sería usar fibroblastos de la piel, pero su crecimiento sería muy lento. Un método muy invasivo es usar médula ósea, que tiene la ventaja de que no es necesario hacer crecer las células. El bandeo de células germinales humanas es muy complejo. Los mejores resultados se han obtenido en el bandeo de oocitos de rata.

Las células deben estar al inicio de la metafase. Para obtener el máximo número de células en esa fase se suelen usar inductores de la división, que unidos a algún agente que inhiba el huso mitótico, como la colchicina, provocarán el bloqueo en esa fase.

Entonces se lisan las células, fijándose también los cromosomas. Se pasa a una solución hipotónica, momento en que se monta y se hace la tinción.

#### *Bandeo de baja resolución*

El tipo de bandeo más utilizado es el que se conoce como bandas G. En muchos casos se usa junto con tripsina, que actuará reduciendo las proteínas de la muestra. La tinción se realiza con Giensa. El resultado son unas bandas oscuras (G+) y unas bandas claras (G-).

Mediante el uso de quinacrina se pueden obtener resultados similares. Se usan colorantes fluorescentes que tienen afinidad por zonas ricas en A y T, como pueden ser la quinacrina, el DAPI,....

Las bandas Q fluorescentes se corresponden a las bandas G.

Otro método existente es el que se conoce como las bandas R. Implica la desnaturalización de los cromosomas en medio salino, para realizar después una tinción con Giensa. Una opción que se usa a veces es usar colorantes con afinidad por G/C, como la cromomicina. El resultado es un patrón de bandas inverso al que vería con las G. Lo que se ve claro con una técnica se ve oscuro con la otra.

Existen algunos procedimientos de bandeo especiales, como puede ser el C. Consiste en la desnaturalización en hidróxido de Bario, y su posterior tinción en Giensa. Es idóneo para identificar heterocromatina constitutiva, como pueden ser los centrómeros, o las regiones proximales de 1q, 9q o 16q.

En general implican la desnaturalización severa de los cromosomas, y su tinción con colorantes o fluorescentes.

#### *Bandeo de alta resolución*

El bandeo típico suele oscilar entre 400 – 500 bases por cariotipo, mediante el uso de las técnicas anteriores. En ocasiones puede ser necesario llegar a obtener más bandas, una mayor resolución. Mediante las técnicas que se listarán ahora, se puede llegar a conseguir una resolución de 800 – 1000 bandas.

Se puede hacer con Giensa, siempre y cuando los cromosomas estén menos condensados. Se suelen emplear cromosomas profásicos o en fases tempranas de la metafase. Se deberán sincronizar todas las divisiones, mediante un antagonista del ácido fólico que bloquee la división. Se provoca entonces la división, a la vez que se da un tratamiento corto con colcemil, que es un inhibidor de la división.

Existe una terminología internacionalmente establecida para nombrar las bandas. La numeración va de proximal a distal, en cada brazo. Dentro de cada banda se pueden detectar en ocasiones otras bandas, de manera que una banda puede ser identificada como: 5p 12.10.

Existen algunas anomalías que se pueden detectar mediante el bandeo, como puede ser el síndrome del X frágil, que es la causa principal del retraso mental en varones humanos. Para detectarlo se hace un cultivo en medio con timidina y la tinción con Giensa.

En las bandas G se usan colorantes que se unen a regiones ricas en AT, que contengan entre un 55 – 60%. Se usan colorantes como Giensa o Quinacrina. Las bandas R se detectan mediante colorantes que se unen a GC, en regiones que contengan entre 50 – 60%. Las diferencias en los porcentajes de bases no serán suficientes para explicar las diferencias. Existen autores que han propuesto un modelo que postula que las diferencias se deberán posiblemente a diferencias estructurales. Se cree que algunas proteínas podrían unirse a regiones específicas del DNA.

Se observa una menor condensación de la cromatina en las bandas R. Las bandas G se condensan rápidamente en el ciclo celular, pero se replican de manera tardía, a diferencia de las bandas R. Las bandas G parece ser más resistentes a la acción de las nucleasas. Las bandas R parecen tener más genes, mientras que en las bandas G hay una menor frecuencia, y parecen ser específicos de tejidos. Se ha observado que las bandas G parecen ser más ricas en LINES, pero pobres en Alus, a diferencia de las R, donde sucede lo contrario. El tamaño de los genes que encontramos en ambos tipos de bandas es también diferente. En las bandas G, en Xp21, podemos encontrar la distrofina, un gen de 2,4 Mb. En las bandas R, en 6p21.3, se ha localizado el HLA, con 70 genes en 0,9 Mb, lo que hace 1 gen cada 1,3 Kb.

### Técnicas moleculares

La base de estas técnicas está en el marcaje de hebras de DNA con fluorocromos, y en el uso de microscopios adecuados. También pueden usarse sondas radioactivas, así como técnicas indirectas que conllevan el uso de anticuerpos marcados.

Una de las técnicas más empleadas es la FISH, Fluorescent In Situ Hybridation. El material de partida ha de ser una preparación metafásica. Se ha de hacer un tratamiento con RNAasa y proteína K (corto), para limpiar la muestra. Además, se debe hacer una desnaturalización con formamida. Por otro lado se tiene que preparar la sonda. Existen 4 colores básicos: verde, rojo, amarillo y azul. Se usan sondas marcadoras bastante largas, de unas 40 Kb. Se usan zonas largas, ya que existe mucho DNA repetitivo, así que cuanto más larga sea la sonda, más especificidad tendrá. Para evitar la unión a zonas repetitivas, con sondas cortas, haremos una hibridación competitiva. La gran ventaja del FISH es que los resultados son rápidos.

Se permite observar fácilmente los cromosomas. La resolución dependerá del origen de la muestra, como se ve en la tabla de la derecha.

Una de las características más importantes es el pintado de cromosomas. Con sondas adecuadas se puede pintar todo el cromosoma. Mediante el uso de diferentes combinaciones de fluorocromos se pueden conseguir diferentes colores.

#### Resolución de FISH en función de la muestra

Metafase	Similar al bandeo
Metafase temprana	Hasta 1Mb
Interfase	Unas 500 Kb
Técnicas de estiramiento de cromosomas	Unas 5 Kb

Después, mediante un análisis digital de imágenes se estudiará la imagen. El FISH ha desplazado al M-FISH, más antiguo.

Otra técnica que se puede usar es la SKY, Spectral Karyotyping. La imagen es recogida y enviada a un interferómetro, que la analiza.

Todas estas técnicas son de gran utilidad en el campo médico. Se ha de tener en cuenta que muchos casos tumorosos pueden deberse a anomalías cromosómicas muy pequeñas, detectables con estos métodos.

También pueden ser útiles en el ámbito de estudios evolutivos, permitiendo comparar diferentes especies, como los géneros *Gorilla*, *Pan*, *Pongo* y *Homo*. El gorila y el chimpancé son muy similares al hombre. Existe una homología genética muy elevada. La diferencia entre el hombre y el chimpancé es de solo el 1,23 %, lo que sería según los últimos datos 18 Mb, según Wildman, en *Bioessays* 2002. Las principales diferencias es posible que aún no se hayan detectado y se corresponderán con regiones con diferencias cromosómicas. Se ha de tener en cuenta que los grandes primates tienen más cromosomas que el hombre. El cromosoma 2 del hombre es el resultado de la fusión de los cromosomas 12 y 13 de chimpancé, orangután y gorila. Se cree que a lo largo del proceso se pueden haber dado diferentes inversiones,

translocaciones,... Además, en primates se ha visto que se puede dar elongación telomérica adicional. El desarrollo del cromosoma Y es también muy variable. Además, se puede haber dado diferenciación en el cromosoma X.

## Anomalías cromosómicas

Se trata de cambios que resultan en alteraciones cromosómicas visibles. Son mutaciones genómicas a gran escala. Se originan en fallos en mecanismos cromosómicos muy específicos. Pueden implicar:

Pérdida o ganancia de material cromosómico

Reorganizaciones cromosómicas

El número de células afectadas puede variar. Si se trata de anomalías constitucionales resultarán afectadas todas las líneas celulares. Si se da en líneas somáticas, tan solo afectará a algunas líneas, dando lugar a mosaicos.

Mosaico: células con diferente contenido genético de un mismo cigoto

Quimera: Células con diferente contenido genético de dos cigotos

### Anomalías cromosómicas numéricas

El número de cromosomas resulta afectado.

#### *Poliploidía*

Hay una copia extra de cada cromosoma. La triploidía es muy frecuente, entre el 1 – 3% de los embarazos. La causa más frecuente es la dispermia, en un 66% de los casos, mientras que la fusión de gametos  $n$  con  $2n$  se da en el 34% de los casos, de los cuales un 24% es por causa paterna, mientras que el 10% es por causa materna.

La tetraploidía se debe a errores en la primera división cigótica. Tienen una mortalidad muy elevada; suelen morir en las primeras etapas después de la concepción.

#### *Aneuploidía*

Se trata de pérdida o ganancia de un homólogo, por lo que se pueden originar trisomías o monosomías.

Se trata de las anomalías cromosómicas más comunes y de mayor significado clínico. Se puede deber a la no disyunción de los cromosomas en MI o MII de la meiosis o en la primera división postzigótica. Otra causa que se conoce es la llamada anafase lag. Consiste en que un cromosoma se retrasa en la mitosis y acaba en el mismo polo que su homólogo.

Se ha observado, sólo en los cromosomas sexuales, casos que afectan a más de un par de homólogos, que son más compatibles con la viabilidad que los autosómicos.

Sólo llegan a nacer trisomías del 13, 18 y 21, además de los sexuales. Se trata básicamente de un problema de dosis génica.

No se conoce ninguna monosomía autosómica. Sólo hay una monosomía conocida viable, que es el síndrome de Turner, el XO.

### *Mixoploidía*

El individuo presenta varias líneas celulares con diferentes contenidos cromosómicos. Se pueden dar mosaicos y quimeras.

#### Mosaico poliploide

El individuo tiene algunas células diploides, mientras que otras células son poliploides. La causa más frecuente suele ser la fusión de un núcleo resultante de la primera división con un corpúsculo polar.

#### Mosaico aneuploide

El individuo tiene algunas células diploides y otras aneuploides. Se puede tratar de mosaicos comunes. Pueden ser debidos a fallos en la disyunción de los cromosomas.

### **Anomalías cromosómicas estructurales**

Se producen reordenaciones resultantes de la rotura y reparación de los cromosomas.

Son menos frecuentes que las aneuploidías. El tipo más común suele presentar una incidencia de 1 cada 500 nacimientos.

Las causas son fallos en los sistemas de reparación de roturas o fallos en la recombinación. Además, se pueden dar fallos en los sistemas de control de los cromosomas.

Los fallos en la recombinación son las más frecuentes causas de anomalías estructurales en la gametogénesis, especialmente en la masculina.

Se dice que una anomalía cromosómica es equilibrada si no hay ni pérdida ni ganancia de material cromosómico. Además, existen algunas anomalías estables, que se podrán transmitir a la descendencia.

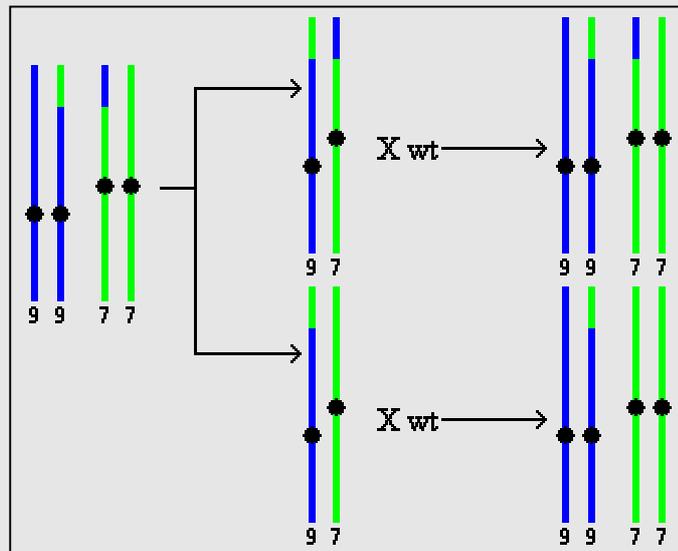
Los efectos fenotípicos de las anomalías estructurales son diversos. Puede suceder que no presenten ninguna característica especial, o bien que si afecta a algún gen del desarrollo, presenten alguna característica especial. Si se producen translocaciones entre autosomas y cromosoma X sí que habrá efectos, debido a la inactivación que se da del cromosoma X.

#### Deleciones terminales

No equilibradas. Inestables. 1 rotura en 1 cromosoma

### Translocación recíproca

Se dan 2 roturas en 2 cromosomas distintos. Es equilibrada, y puede ser estable en mitosis. Incrementa el riesgo de la descendencia de padecer monosomías y/o trisomías parciales. Si los gametos no son equilibrados, se formarán trisomías de uno de los cromosomas y monosomías del otro.

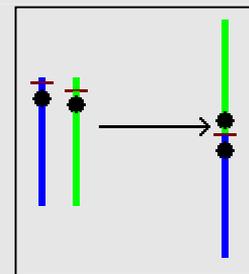


### Translocación robertsoniana

Rotura en el brazo corto, en posición proximal, de 2 cromosomas acrocéntricos. El resultado es que tenemos 2 centrómeros que funcionan como uno solo.

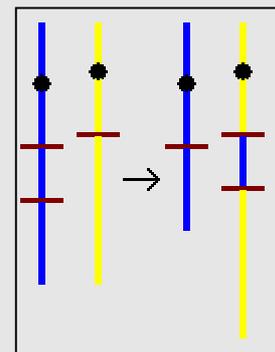
En teoría no es equilibrada, pero a efectos prácticos sí que lo es porque los satélites están formados por DNA repetitivo.

A nivel mitótico no hay problema, pero a nivel meiótico puede suceder como en el caso anterior, que se formen trisomías y/o monosomías parciales.



### Translocación Insercional

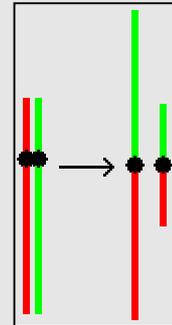
Riesgo de que se produzcan gametos no equilibrados.



### Isocromosomas

Se debe a errores en la recombinación. Si se da en el cromosoma X se producirá el síndrome de Turner y el i(21q) provoca el síndrome de Down.

Se ha visto en carcinomas sólidos y células hematopoyéticas malignas.



### **Disomía / Diploidía Uniparental**

Los cromosomas tendrán un origen parental único.

#### Diploidía

Todos los cromosomas provienen del mismo progenitor. No progresarán nunca.

Tienen fenotipos clínicos característicos dependiendo del progenitor.

**Padre:** El feto no se desarrolla nunca, pero sí los tejidos extraembrionarios.

Se originan a causa de la degeneración del pronúcleo femenino, con lo que los cromosomas del padre se duplicarán.

**Madre:** Desarrollo durante unas cuantas etapas, pero no se forman los tejidos extraembrionarios. El embrión no progresará.

Puede tener lugar una activación de un oocito no fecundado, lo que provocará esta diploidía.

#### Disomía

Los miembros de un par de homólogos provienen de un mismo padre. Se conocen como UPD, uniparental disomy.

Conocemos como isodisomías cuando los dos cromosomas tienen el mismo origen parental, pero además son idénticos.

**Disomías:** Es el resultado de la eliminación de un cromosoma de una célula trisómica.

**Isodisomías:** Se debe al restablecimiento del segundo cromosoma a partir de una célula monosómica.

Las consecuencias clínicas pueden ser asintomáticas o no, según los cromosomas que se vean afectados, en función de si tiene impronta genética.

Se ha de tener en cuenta que existen genes que se expresan de manera diferencial en función de su origen parental. Se pueden producir alteraciones del desarrollo y/o de los rasgos conductuales.

Parece ser que la metilación diferencial en las citosinas de las islas CpG puede afectar a la expresión de los genes. La metilación deberá ser eliminada en cada generación por acción de metilasas.

En el caso de la IGF2, el factor de crecimiento sólo se expresa a partir de la copia paterna. El receptor de la IGF2, IGF2R, que promueve la eliminación de IGF2, sólo se expresa en las copias maternas. Es necesaria la expresión de ambos.

### **Anomalías cromosómicas**

Se trata de una de las principales causas de enfermedad. Se conocen más de 60.

Presentarán fenotipos clínicos diversos y variados.

La mayoría de las alteraciones provocan retraso en el desarrollo mental.  
Muchas provocarán también alteraciones en la morfología facial.  
Suelen implicar también alteraciones en el desarrollo físico.

La frecuencia de anomalías cromosómicas entre nacidos vivos parece ser de 1/160. El 60% son numéricas y el 40% estructurales.

Sólo existen 3 trisomías autosómicas que sean compatibles con el nacimiento de un individuo vivo, en los cromosomas 14, 18 y 21. Las monosomías parecen tener mayor gravedad que las trisomías.

Se han propuesto muchas posibles etiologías para explicar las aneuploidías: radiación ionizante, contraconceptivos orales, drogas fertilizantes, tabaco, autoinmunidad tiroidea, heterogeneidad HLA parental reducida, asociaciones nucleolares persistentes,... El único factor inequívoco es la **edad materna**. El riesgo de tener un hijo con síndrome de Down oscila desde un 0,05% en madres menores a 20 años a un 3% en madres mayores de 45 años.

Se puede determinar el origen parental de los cromosomas con el uso de marcadores. Actualmente se usan polimorfismos moleculares.

También se ha conseguido determinar la división celular de origen de la alteración. Casi siempre se trata de mutaciones “de novo”. El error puede ocurrir en la mitosis I o II, o en las divisiones post-zigóticas.

Para buscar el origen se buscará un polimorfismo para el que la madre sea heterocigota, de manera que cuanto más próximo al centrómero más adecuado será. Si el error ocurre en M1, el polimorfismo no se reducirá, pero si es en M2 o PZ, sí se reduce. Se compararán diferentes marcadores, con el hecho de si se han producido recombinaciones o no. Dependiendo de si se ha reducido, entonces podremos determinar la división de origen.

Los patrones de recombinación en aneuploidías pueden ser normales o no serlo, de manera que puede reducirse la recombinación o estar totalmente ausente. Suele tener asociación con la edad materna. No es el caso de patrones de recombinación alterados en exceso. Se cree que puede tener relación con la edad de liberación de los oocitos.

Existe la teoría que afirma que la liberación de oocitos se da en el orden en que se realizó la meiosis. Otra teoría afirma que la edad de la madre favorecería la maduración subóptima de los oocitos.

## **Casos de anomalías de interés clínico**

### **Trisomía del cromosoma 21: Síndrome de Down**

47, XX/XY +21

Descrito hacia 1866. La frecuencia es de 1/800 nacidos vivos en todas las etnias. Hasta 1959 no se conocieron las bases genéticas.

Desde el punto de vista dermatoglífico existen diferencias. El pliego simiano es más frecuente. Además hay una frecuencia más elevada de tener presillas manos.

Tienen un mayor riesgo de padecer leucemia. Los riesgos cardíacos son muy elevados, con una cierta propensión a sufrir hipertensión pulmonar. Sufren retraso mental, con cocientes de inteligencia de 25 – 60.

La supervivencia de estos niños ha mejorado mucho con los años. Hace años sólo el 50% llegaba a los 5 años. Actualmente el 80% alcanza los 10 años.

La mayoría son estériles. Las hembras no ovulan en su mayoría.

La mayoría es debida a trisomías completas. Puede ser debido a mosaicismo en un 1-2%. En un 3% puede ser debido a translocaciones.

En un 95% de los casos es por causas maternas. El 75% de los errores se da en la M1, y el 25% en la M2.

Los casos de mosaicismo son difíciles de detectar precozmente.

La región responsable parece ser la **21q22.2**

### **Trisomía del cromosoma 18: Síndrome de Edward**

47, XX/XY +18

La frecuencia es de 1 cada 6000 nacimientos, pero la frecuencia en embriones es más alta.

Se trata de la segunda trisomía autosómica más frecuente.

Se producen anomalías a nivel de las manos, en los dedos, en los que se produce un encabalgamiento, tanto en manos como en pies. Tienen un patrón de crecimiento alterado. Las orejas, boca y esternón son pequeños.

Padecen defectos cardíacos congénitos, ya que se da malformación en los septos.

La supervivencia es mucho menor a los que sufren síndrome de Down. El 5% sobreviven al nacimiento. El 50% mueren antes del primer mes. El 12% no pasa del año de vida.

El 95% de los casos se pueden explicar por causa de trisomías completas. El 5% restante es debido a mosaicismo.

El 90% de los casos es debido a error materno, a una no disyunción. En 2/3 es en M2, y en 1/3 es debido a la M1.

Se cree que hay una relación con la edad.

Además, se da una profusión del intestino hacia el cordón umbilical.

**Trisomía del cromosoma 13: Síndrome de Patau**

47, XX/XY +13

La frecuencia es la menor de las trisomías autosómicas, dándose en 1 de cada 10.000.

Los que sufren este síndrome presentan fisuras orofaciales, malformación del sistema nervioso, polidactilia postaxial y microftalmia, ojos pequeños y malformados.

La mortalidad intrauterina es muy elevada. El 90% muere durante el primer mes.

Parece deberse a un error materno en la disyunción. El 80% de los casos es debido a trisomías completas, mientras que el 20% es debido a translocación del 13q.

Se ha visto que hay influencia de la edad materna.

**Síndrome “Cri du chat”**

47, XX/XY del(5p)

Se trata de una delección casi completa del brazo corto del cromosoma. La frecuencia es de 1 cada 50.000 nacidos vivos.

Padecen retraso mental considerable, con microcefalia. La cara es característica, con repliegue en los párpados, retrognatia.

La supervivencia es compleja, aunque pueden llegar hasta la edad adulta.

Suelen venir de individuos que tienen translocaciones recíprocas.

**Síndrome de Wolf – Hirschhorn**

47, XX/XY del(4p)

Es suficiente con una delección parcial para que suceda.

Separación entre los ojos.

Sufren cierto retraso mental, no muy acusado.

**Síndromes de microdelecciones**

Sólo son observables mediante FISH.

Síndrome de Prader – Willi y Síndrome de Angelmann: En ambos casos es una microdelección en 15q11-13

*Síndrome de Prader – Willi*

Estatura baja, con tendencia a la obesidad. Presentan cierto retraso mental e hipogonadismo.

*Síndrome de Angelmann*

Estatura alta. Sufren alteración en el sistema nervioso, además de un comportamiento atáxico.

El hecho de que se uno u otro síndrome dependerá de qué progenitor haya pasado el cromosoma alterado, ya que existe impronta genética.

## Cromosomas sexuales y diferenciación sexual

El contenido de cromosomas sexuales varía en función de los sexos. Tienen estructuras diferentes, lo que puede provocar problemas en la recombinación y en las dosis génica. Los cromosomas sexuales están implicados en la determinación sexual primaria.

X	Y
Submetacéntrico	Acrocéntrico
Más largo 165 Mb (5% del genoma)	Corto 60 Mb (2% del genoma)
Podría tener muchos genes, pero es pobre en islas GC, aproximadamente se cree que unos 400 genes funcionales.	Muy pocos genes, compuesto por DNA repetitivo. Tiene el gen SRY

Existen regiones de homología entre los dos cromosomas, las PAR (Pseudo Autosomic Region) 1 y 2.

**PAR 1:** 2,6 Mb. Es más grande que PAR 2. Existe un lugar de entrecruzamiento obligado en esta región durante la meiosis masculina, que coincide con un gen.

La tasa de recombinación en este fragmento es 10 veces la de los autosomas.

Los mapas genéticos basados en mapas de recombinación pueden ser diferentes. En XX, la frecuencia es del 7%, en XY es del 50%.

La PAR 1 termina en medio de 1 gen, el XG, que determina la formación de antígenos eritrocitarios XG. En mujeres puede ser funcional, pero no en hombres.

**PAR 2:** Más corta, 320 Kb. Se han identificado 2 genes IL9R y SYBL1. No es un punto de entrecruzamiento obligado.

Parece ser que los dos cromosomas pueden provenir de 2 cromosomas homomórficos ancestrales.

### Anomalías cromosómicas en X e Y

Pueden darse también en estos cromosomas anomalías numéricas y estructurales. Son más frecuentes que las anomalías autosómicas. Se trata de fenotipos más suaves. Puede ser debido a la inactivación de X y al bajo contenido en genes de Y.

Las trisomías son especialmente abundantes en el nacimiento, pero no en el aborto. La mortalidad fetal es escasa. La monosomía de X es muy letal en la etapa fetal, entre el 98 – 99%. Sólo sobrevive el 1%. Conlleva problemas en las etapas anteriores a la inactivación de X.

La principal causa de las anomalías es la no disyunción meiótica. Está ligado a la madre, pero también a las características de los cromosomas.

## Monosomía del cromosoma X: Síndrome de Turner

### 45, XO

Descrito por H. Turner en 1939. En 1959 se conoció la base cromosómica.

Es la anomalía cromosómica más frecuente en embriones. Se da en el 7% de los abortos espontáneos. La frecuencia es de 1 de cada 2500 nacimientos femeninos.

Los principales rasgos son una cara triangular. Además, tienen las orejas rotadas en sentido posterior. Se observan pliegues adicionales en el cuello. Presentan linfedemas, edemas en manos o pies. El 20% presenta defectos cardíacos congénitos, como puede ser un estrechamiento de la aorta. El 50% de los casos sufre además alteraciones estructurales renales.

Suelen presentar un cierto retraso mental, pero con mucha variabilidad en su severidad. No pasan por el crecimiento puberal, por lo que son de baja estatura. Además, pueden sufrir disgenesia de ovarios. No forman estructuras sexuales secundarias. El 5 - 10% tiene ciclos ováricos regulares.

Las causas genéticas pueden ser muy variadas, como se ve en la tabla.

53 %	45, XO
15 %	45, XO / 46, XX → Mosaicos
10 %	46 X i(xq)
8 %	45, XO / 46, X i(xq) → Mosaicos
6 %	46, XX q <sup>-</sup> o 46 XX p <sup>-</sup>
8 %	45, XO / ? → Mosaicos

Puede darse a causa de no disyunción paterna.

En algunos casos puede afectar a hombres, con testículos, pero que serán estériles. Suelen ser 45, XO / 46, XY, aunque con ese genotipo pueden ser también mujeres, ya que se formarán testículos, pero se perderán de nuevo.

## Síndrome de Klinefelter

### ♂ 47,XXY

Afecta a uno de cada 830 nacidos.

Presentan rasgos asimétricos. Son de elevada estatura, con extremidades muy largas. Además, suelen presentar hipogonadismo, testículos pequeños.

Entre 30 – 50 % desarrollan mamas, con elevado riesgo de sufrir cáncer en ellas.

Sufren esterilidad por atrofia de los vasos seminíferos.

El coeficiente de inteligencia es inferior.

Influye mucho la edad de la madre.

Existen diferentes variantes, pero a más X, mayor severidad del síndrome.

### **Síndrome de los Supermachos**

♂ 47, XYY

La frecuencia es de 1 cada 1000 nacidos vivos.

Se cree que pueden tener una mayor predisposición a un comportamiento violento, aunque no hay evidencias claras. El único indicio es que el 10% de los reclusos en USA lo eran.

Son hiperactivos, con dificultades de aprendizaje normalmente.

Es a causa paterna, por una no disyunción meiótica en la segunda meiosis.

### **Síndrome de las Superhembras**

♀ 47, XXX

La frecuencia es de 1 cada 1000 nacidas.

El fenotipo puede ser normal, de hecho pueden pasar inadvertidas. Pueden presentar problemas en la reproducción, ya sea esterilidad o irregularidad menstrual. Además, pueden sufrir abortos repetidos. Pueden existir individuos con más X. Cuantas más copias, mayor será la gravedad del síndrome.

Aparte de las anomalías numéricas, se pueden dar muchas anomalías estructurales, como isocromosomas,... Se conoce muchos síndromes muy heterogéneos, tanto a nivel clínico como en su origen. Se pueden dar translocaciones entre X y algunos autosomas. Algunas deleciones en X pueden provocar displasia. Otros síndromes pueden provocar disgenesia gonadal en Xp21 y en Xp22.

### **Síndrome de Kallman**

Xp22. No funciona el gen KAL 1, una anosmina.

### **Síndrome del X frágil**

Produce retraso mental en hombres. Es responsable del 40% del retraso mental asociado a X. Afecta a 1 de cada 1000 varones y a 1 de cada 2000 mujeres.

Los que sufren este síndrome tiene la cara alargada, orejas sobresalientes, bien desarrolladas, además de mandíbula prominente. Se da también macroorquidismo, volumen testicular incrementado.

Se puede detectar mediante un cariotipo, en un cultivo carente de timidina o ácido fólico. Se observa una prolongación del Xq.

La penetrancia es variable, según los sexos: 80% en ♂ y 20% en ♀. Las madres transmiten la enfermedad a sus hijos varones.

Se observó lo que se conoce como la paradoja de Sherman.

La base genómica es una mutación dinámica de un trinucleótido de un gen localizado en el extremo de Xq.

### *Expansión dinámica*

En el ser humano se pueden dar una expansión dinámica del número de copias que componen un microsatélite. Se puede tratar de mutaciones estables, que se pueden transmitir a la descendencia, como es el caso de la sinpolidactilia, que es una poliA del gen HOX D13 que aumenta en número. También se pueden dar mutaciones inestables, cuya cantidad varía al transmitirse. Suelen afectar a trinucleótidos, excepto en el gen de la cistatina B, en cuyo caso se ven afectadas 12 bases.

Las más conocidas son las que afectan a trinucleótidos. Se desconoce aún el mecanismo subyacente de estas expansiones, así como se desconoce la causa de la aparición de la enfermedad.

Existen una serie de rasgos comunes. Si el número de copias es bajo se habla de alelos estables, de entre 5 y 50 copias. A partir de un número de copias umbral pasa a ser inestable. De manera que en la descendencia aumentará progresivamente el número de copias.

Existen 2 tipos básicos conocidos:

#### Genes con algunas repeticiones de (CAG) en la región codificante

La forma normal tiene entre 10 y 30 copias, la afectada tiene entre 40 y 200.

Se produce una acumulación de glutaminas en la proteína que provocan la agregación de ésta y la muerte celular.

Algunos ejemplos pueden ser el síndrome de Kennedy y algunas ataxias.

#### Genes con largas repeticiones de trinucleótidos en regiones no codificantes

La forma estable tiene entre 5 y 50 repeticiones, mientras que la inestable tiene entre 200 y 1000.

En estos casos actuarán distorsionando la expresión del gen, ya que pueden estar incluso en el promotor.

Algunos ejemplos pueden ser el síndrome del X frágil A, o FRAXA, localizado en Xq27.3, que es una repetición de CCG. Otros ejemplos son la corea de Huntington o algunas ataxias.

No se sabe por qué se producen, se cree que puede ser debido a emparejamiento y entrecruzamiento desigual. Pero se cree que en determinadas ocasiones puede haber incluso inestabilidad mitótica.

#### *FRAXA*

Localizado en Xq27.3.

Los alelos estables suelen oscilar entre 6 y 60, mientras que los inestables van de 200 a 1000 repeticiones. Hay individuos que estarán entre 60 y 200 repeticiones, en lo que se conoce como premutación. Las mutaciones van pasando de madres a hijos, debido a recombinación diferencial. Se va incrementando el número de copias.

#### *FRAXE*

X Frágil de tipo E. Localizado en Xq28. (GCC)<sub>n</sub>.

### Bases cromosómicas de la determinación del sexo

Consiste en la formación de estructuras fenotípicas que llevarán a la diferenciación sexual.

Se sabe que Y tiene un papel predominante en el proceso, pero aún no está del todo claro, ya que es muy complejo.

Se pueden llegar a dar discrepancias entre el sexo gonadal y el sexo cromosómico. Normalmente XY son hombre y XX mujeres, pero se puede dar el caso de que XY sean mujeres.

Si se producen alteraciones a 5Kb del PAR 1 no se producirá la diferenciación.

En Y existe un gen que se conoce como SRY que determina la formación de TDF. En las primeras etapas de desarrollo, las células germinales migrarán hacia las crestas gonadales. Cuando está TDF se induce la diferenciación de la zona medular, que dará lugar a las células de Leydig, que generarán andrógenos. Esto inducirá la formación de los conductos de Wolf, así como la diferenciación en el tejido germinal de las células de Sertoli, que producirán hormona antimülleriana, que provoca la regresión de los conductos de Müller. En presencia de TDF se forman por lo tanto las gónadas masculinas. En caso de que no haya TDF, se producirá la regresión de los conductos de Wolf, así como el desarrollo de los conductos de Müller. Se producirán entonces los folículos y las oogonias. Se forman en este caso las gónadas femeninas. La meiosis de los oocitos se detiene en dictioteno, para continuar a partir de la menarquia. Se cree que aproximadamente habrá unos 400 oocitos.

Actualmente se sabe que hay muchos genes más implicados en la determinación del sexo.

Cresta genital

WT1, SF1, Lim 1, Emx 2 → Su papel en hombres es desconocido, pero se conoce en ratones.

Gonada bipotencial

SRY

DAX 1

SOX 9

Wnt 4

DMRT 1/2

Se han encontrado genes que se expresan en ratones, pero también se expresan en otros tejidos.

Testículo Ovario

Pueden existir anomalías en la determinación del sexo pese a ser 46XX.

### Hermafroditismo verdadero

Tienen tejido gonadal de ambos sexos. La mayoría de los casos son 46XX, aunque también hay 46XY. Se cree que se deberá a algún problema en la vía de diferenciación.

### Pseudohermafroditismo

Sólo poseen gónadas de 1 tipo. El tejido gonadal es de un sexo, pero los genitales son de sexo contrario. Puede tener diferentes causas genéticas.

Puede ser a causa de disgenesias, anomalías en las hormonas, o bien en los receptores de éstas. El gen AR, receptor de andrógenos, está situado en el cromosoma X. Mutaciones en este gen provocarán problemas en la diferenciación, pudiendo provocar pseudohermafroditismo.

Las causas del pseudohermafroditismo masculino pueden ser a causa de insensibilidad a andrógenos, en una frecuencia de 1 cada 20.000. Otros casos de pseudohermafroditismo pueden ser debidos a deficiencias en la  $5\alpha$  reductasa, lo que provoca un déficit de dihidrotestosterona.

El caso más conocido de pseudohermafroditismo femenino es el de la hiperplasia adrenal congénita, que afecta a 1 de cada 12.000. Es una deficiencia en una 21 – hidroxilasa. Falla el cortisol y hay un exceso de andrógenos. También se puede dar pseudohermafroditismo por una excesiva producción de andrógenos en la madre.

### Inactivación del cromosoma X

En todos los organismos que tienen la determinación cromosómica del sexo existe el problema de la dosis génica. Existen dos opciones para solucionar el problema. Mayor de expresión de X en caso de que sea XY, o menor expresión de X en caso de que sea XX.

En mamíferos se inactiva un cromosoma X en hembras. También se conoce como Lyonización por su descubridor.

La inactivación del cromosoma tiene una serie de rasgos generales básicos:

#### Temprana

Se da entre la primera y la segunda semana, en la fase de blastocisto tardía.

#### Aleatoria

La inactivación afecta en la mitad de los casos al cromosoma paterno y en la otra mitad al materno. En los tejidos extraembrionarios siempre se inactiva la copia paterna.

Aleatoria  
ICX  
Imprinted (Placenta)

#### Clonal

Una vez se ha inactivado un determinado cromosoma, ese cromosoma estará inactivado en las células hijas.

#### Estable

Es estable, excepto en la línea germinal. En hombres se inactiva transitoriamente el cromosoma X en la espermatogénesis temprana.

Se da en mamíferos y en marsupiales, pero en estos siempre con impronta

Como consecuencia de la inactivación se compensa la dosis génica. Otra consecuencia es que en mujeres hay mosaicismo. En las células femeninas se puede observar el corpúsculo de Barr, correspondiente con la heterocromatina del cromosoma inactivado.

En estos cromosomas se da replicación tardía e hipoacetilación de las histonas. En euterios se ha visto que el grado de metilación de las islas CpG es superior a lo normal, en células embrionarias.

Número de cromosomas X que se inactivan	
Aneuploidías	Todos menos 1
	XO 0
	XX 1
	XXY 1
Triploidías	1 o 2 activos
Tetraploidías	2 activos

Se trata de una inactivación incompleta. Los genes que tienen homólogos funcionales en Y escapan a la inactivación. Es un proceso bien regulado. No se inactivan las zonas PAR. La excepción es el SYBL1 en PAR, que sí que se inactiva. Aparte de las regiones PAR puede haber otros genes homólogos, que no serán inactivados.

Hay algunas excepciones a esto. UBE1 y SB1.8 no se inactivan y no tienen homólogo en Y. KAL1 y STS no se inactivan, pese a que el homólogo de Y es un pseudogen.

Parece por lo tanto que algunas diferencias en la dosis sí que pueden ser tolerables.

### *Método de inactivación*

Ha de existir un método que permita contar el número de X, para ver así la relación entre los X y los autosomas.

En los años 90 se descubrió una zona en X, entre Xq11 y Xq21 donde se iniciaba la inactivación, que fue denominada XIC. Cromosomas que no tengan XIC no se inactivarán. En el 91 se descubrió el gen XIST, que era un mRNA de 15 a 17 Kb, que va recubriendo el cromosoma. Se expresa en los dos cromosomas, pero en una fase en uno de ellos se estabiliza mientras que en el otro se inactiva la expresión. El cromosoma sobre el que se estabiliza es el que se inactivará.

La presencia de XIST es necesaria para la inactivación. Por translocación de XIST a autosomas, se vio que estos sufrían inactivación incipiente en presencia de XIST. El mecanismo clave para la inactivación de X aun se desconoce. Lyon ha propuesto que no se requieren secuencias especiales para la inactivación.

Existen diferencias en el contenido de DNA repetitivo entre cromosoma X y autosomas. Los LINEs de tipo 1 son más frecuentes en X (26%) que en los autosomas (13%). Los LINEs están especialmente metilados e hipoacetilados. Se cree que pueden estar implicados en la progresión de la inactivación.

El mantenimiento de la inactivación se desconoce, pero sí se sabe que el gen XIST no es necesario para mantener la inactivación.

Se cree que la metilación del cromosoma en exceso, en las islas CpG puede estar implicada en el mantenimiento de la inactivación. También la replicación más tardía en la fase S puede intervenir en el proceso.

XIST no parece estar implicado en el proceso de recuento de cromosomas X. En el 99 se descubrió el gen Tsix, que se transcribe en dirección contraria a XIST. Actúa de manera similar a un antagonista de XIST. Se cree que puede estar implicado en la inactivación, pero que no es un mecanismo necesario y suficiente para determinar qué cromosoma será el inactivado. El gen Xce parece estar implicado en la expresión de XIST, sin embargo no es suficiente para la inactivación de X.

Falta por determinar un factor desconocido que determinará qué cromosoma se inactivará. Se trata de un factor de desarrollo o de bloque.

### ***Evolución de los cromosomas sexuales***

Las homologías existentes entre X e Y parecen indicar que ambos provienen de un par homomórfico ancestral. Posiblemente la aparición de un mecanismo de determinación del sexo forzó una limitación de la recombinación, ya que SRY debe permanecer en un cromosomas. Los demás genes de Y pierden su importancia y empiezan a perder funciones. Se van acumulando mutaciones y se van produciendo pérdidas de fragmentos. Cabe entonces preguntarse si el futuro que le espera al cromosoma Y es la desaparición.

Existen regiones en el Xp que parecen provenir de translocaciones recientes, de hace unos 100 millones de años, cuando sucedió la separación de los monotremas. La región contiene genes que escapan a la inactivación.

Ohno enunció una ley que afirma que hay una gran similitud entre los cromosomas X de los distintos mamíferos. Sería una región que provendría de cromosomas autosómicos, ya que la distribución de LINEs es diferente a la del resto del cromosoma.

## Alteraciones cromosómicas y cáncer

Se trata de un problema muy grave. Provoca el 20% de las muertes y el 10% del gasto sanitario. Se cree que podrá llegar a producir el 30- 40% de las muertes en el futuro.

El cáncer es una enfermedad extremadamente compleja, ya que existen muchos tipos de tumores diferentes, pero una característica común es la proliferación celular descontrolada, lo que se conoce como neoplasia. Dependiendo del tipo de neoplasia pueden sufrir metástasis. Distinguimos muchos tipos de tumores, en función del tejido al que afectan, como se puede ver en la tabla de la derecha.

Normalmente se darán en la vida adulta, aunque se pueden dar en la época infantil, con mayor gravedad en ese caso. Tienen un carácter clónico, todos provienen de una misma célula.

Tumor	Tejido
Carcinoma	Epitelial
Sarcoma	Conjuntivo
Linfoma	Tejido linfoide
Glioma	Sistema nervioso
Leucemia	Sangre o células hematopoyéticas

### Visión genética y hereditaria

Existe un componente genético y ambiental.

Los sucesos genéticos son la base de la carcinogénesis. Se trata de sucesos genético somáticos, no heredables. Tan solo en menos del 5% son heredables.

Los sucesos genéticos, las mutaciones, son inevitables, debido a la tasa de mutación  $10^{-6}$  x el número de células  $10^{14}$ , lo que da una frecuencia de  $10^8$ . Se cree que deben darse 6 mutaciones para que se inicie el proceso, por lo que  $10^{(-6)6} \times 10^{14} = 10^{-22}$ .

La relevancia de estos sucesos genéticos será variable. Los problemas serán las mutaciones que afecten a la proliferación celular, porque a más divisiones, más riesgo de mutación. Además, otras mutaciones peligrosas son las que afectan a la estabilidad del genoma, ya que incrementan la tasa de mutación.

La mayoría de los cánceres afectan a células somáticas. Como ya se ha dicho serán especialmente sensibles los genes del ciclo celular y los encargados de regular la estabilidad del genoma.

Existe la posibilidad de que se pueda heredar una cierta susceptibilidad a sufrir un tumor, pero no el tumor en sí, tan solo en el 5% de los casos. La susceptibilidad no será en ningún caso según un patrón de herencia monogénica mendeliana, siempre se tratará de patrones poligénicos, muy complejos. Además, normalmente habrá penetrancia incompleta. Por último, se ha de considerar que existen determinados agentes cancerígenos, que inciden en las posibilidades. Para estudiar esto es de especial interés la inmigración.

	USA	Japón	Inmigrantes japoneses en USA
Cáncer de colon	5%	0,5%	5%
Cáncer gástrico	Riesgo bajo	Riesgo elevado	Riesgo bajo

Como se observa en la tabla habrá aspectos sociales que influirán.

Desde el punto de vista genético podemos clasificar los genes susceptibles en oncogenes y genes supresores de tumores. Normalmente puede bastar una mutación Gain Of Function (GOF) en un oncogen para que aparezca el tumor. Será necesaria una mutación Loss Of Function (LOF) en los dos alelos de un gen supresor de tumores para que se manifieste el tumor.

### *Oncogenes*

Las copias no mutadas de estos genes se conocen como protooncogenes. En la forma no mutada podrán tener diferentes funciones, muchas de ellas ligadas a diferentes vías de señalización. El cambio GOF puede ser cuantitativo o cualitativo. Normalmente serán mutaciones dominantes las que producirán tumores.

Se han estudiado muchos oncogenes por estudios de transducción in vitro. Una fuente de conocimiento adicional serán los virus que provocan tumores en los animales. Los más importantes de estos son los retrovirus. Se observó mediante estos estudios que muchos virus llevaban genes similares a los humanos, pero mutados.

La activación de los oncogenes se debe a cambios somáticos en la mayoría de los casos, aunque hay algunas excepciones, como en el caso de RET, donde se produce una mutación GOF de carácter hereditario.

### *Mecanismo de inicio de un tumor*

#### **Mutaciones puntuales**

**H- RAS 1.** Se trata de un factor de transducción. Está en su forma activa acoplado al receptor. Se conoce mutaciones que ralentizan o inhiben la inactivación de RAS. Se han visto mutaciones en este gen en cáncer de colon, de mama, de vejiga,....

#### **Anomalías cromosómicas**

Es un factor común, en muchos cánceres, sobre todo en las etapas más violentas y tardías. Se conocen desde hace mucho. Se observó que había reorganizaciones cromosómicas ligadas a tumores.

Un ejemplo puede ser lo que se conoce como cromosoma Philadelphia, que es responsable de más del 95% de los casos de leucemia mieloide crónica (CML). Se produce una translocación entre 9 y 22. El cromosoma 22 cede un fragmento de su brazo largo por un fragmento distal de 9q, con lo que se crea el cromosoma. Se ha trasladado un protooncogen, una proteína tirosina kinasa hacia una región conocida como BCR. Se pierde el primer exón con este cambio, y se crea un nuevo gen, que se transcribirá, dando lugar a una quimera, con función tirosina kinasa y propiedades transformantes aberrantes.

Se conocen muchos genes quiméricos asociados a tumores.

También se pueden dar translocaciones que resulten en la aparición de un tumor. Se puede trasladar un protooncogen a un dominio de cromatina activa. Esto es lo que sucede en el caso del linfoma de Burkitt, con el gen myc. Si se da una translocación, la expresión del gen se dispara. Myc se expresa mucho en linfocitos

En otros casos se ha detectado un proceso que se conoce como amplificación. Este proceso implica un aumento de copias del gen. Pueden aparecer como pequeños cromosomas, o bien como amplificaciones en tándem, en zonas de tinción homogénea (HSR). Estos cambios se pueden detectar por CGH, hibridación genética comparativa, técnica con un poder de resolución de 5 a 10 Mb.

### *Genes supresores de tumores(TS)*

Deberán inactivarse ambas copias para que se inicie un proceso tumoral. Normalmente intervienen en procesos clave del ciclo celular.

Se conocen muchos genes TS. Han sido identificados y descubiertos a partir de clonaje posicional en algunos cánceres hereditarios. Se han determinado también por pérdida de heterocigosidad.

El caso más conocido es el del retinoblastoma. Se trata de un cáncer juvenil. En la mayoría de los casos, 60%, es espontáneo y unilateral, mientras que en el 40% de los casos es hereditario y bilateral. A nivel celular se comporta de manera recesiva, pero a nivel del organismo será dominante, pero con penetrancia incompleta. Si un individuo es sano, será difícil que sufra el tumor, pero tiene una copia será muy posible.

Knudson estableció la teoría que se conoce como de “two hits”. La pérdida del alelo salvaje se puede dar de muchas maneras, como se ve en los esquemas de las fotocopias (17.9). Existe una reducción de la heterocigosidad en los procesos tumorales. En muchos casos, mutaciones que afecten a TS implicarán que sucedan grandes deleciones. Los marcadores pasarán a tener entonces una única copia. Podremos comprar con células sanas para ver los marcadores normales.

Se ha de tener en cuenta que no necesariamente todos los tumores presentarán el patrón mencionado de mutación puntual y pérdida de heterocigosidad. En tumores avanzados habrá pérdidas de heterocigosidad en todos los genes, por lo que no se podrá determinar el gen responsable. En todos los tumores habrá, entre las células cancerosas, células normales, que permitirán ver los heterocigotos.

Una alternativa sería como ya se ha dicho el uso de hibridación genómica comparativa, ya sea con cromosomas enteros o bien con microarrays.

La segunda pérdida de función podría deberse a una pérdida de función de un TS, debido a metilación del marcador. En este caso podría volverse a la situación anterior por desmetilación.

La alteración de la proteína p53 puede dar lugar al inicio de un proceso canceroso, ya que p53 controla la calidad del DNA en la célula. Se ha de tener en cuenta que las células sólo se dividirán si la integridad del DNA es la adecuada. Si no lo es, se entrará en un proceso de reparación, que si se lleva a cabo de manera exitosa provocará la entrada en división, pero que si fracasa provocará que la célula entre en apoptosis. Sin p53 este proceso no se realizará de manera correcta.

En algunos retinoblastomas se han encontrado mutaciones heredables de p53.

Además de oncogenes y TS se cree que puede haber otros genes implicados en la etiología del cáncer.

En algunos tumores pueden estar implicadas aneuploidías. Se están intentando identificar características comunes. En glioblastoma parece haber aneuploidías del cromosoma 10, y en carcinoma renal aneuploidías del 7. Deberá existir un mecanismo que controle la estabilidad genómica.

Existen muchos caminos que llevan a la inestabilidad

Mutación en NER (Nucleotide Excision Repair) en los 2 alelos, junto con algún agente que desestabilice en DNA. Puede ser el origen de la XP.

Mutación en MMR (Mismatch Repair) en los 2 alelos. Aumenta los errores en la replicación.

Existen determinados elementos genéticos que demuestran que hay inestabilidad genética vinculada a cáncer.

En mutaciones en NER se ha visto que se genera NIN, inestabilidad nucleotídica. Será necesario por lo tanto un impacto ambiental que provoque la mutación para que se inicie el tumor.

Las mutaciones MMR provocan MIN. Se ha visto en algunos cánceres de colon esporádicos que hay una cierta inestabilidad en los microsatélites. Se ha visto que igual ocurría en algunos cánceres hereditarios. Se creyó que igual se podía relacionar con los genes mutadores de *E.coli* (mut H y mut L). Se trata de dos enzimas de reparación. Se han identificado por lo menos 6 genes similares en el hombre, en cromosoma 2, 3 y 7. Si las dos copias están inactivas, las mutaciones se van acumulando, hasta que afecten a algún oncogen o TS.

Las mutaciones MSC producen CIN, inestabilidad cromosómica. Es mucho más frecuente que los anteriores. Puede producir aneuploidías. Parece haber además una relación antagónica con la MIN. Si se da un tipo de inestabilidad no se da el otro tipo. A través de fusiones celulares se vio que al juntar CIN y MIN, se reparaba MIN, pero que nunca se reparaba CIN. Se concluyó que había una mutación dominante que provocaba las CIN. Cuando falle alguno de los genes implicado en el control cromosómico se dará la CIN.

Actualmente se empiezan a estudiar los genes implicados en todos estos procesos. No se sabe si puede existir algún tipo de inestabilidad ligada a las translocaciones.

Se ha de tener en cuenta que pueden existir anomalías cromosómicas que no serán el origen del cáncer, sino que serán resultado de él.

## Genética de rasgos complejos

Desde antes de los años 50 se hacían estudios de ligamiento, pero eran muy limitados, debido a la escasez de marcadores. Más adelante, con los adelantos en genética molecular se han conseguido identificar todos los genes responsables de las enfermedades mendelianas.

Actualmente se ha centrado el estudio en enfermedades complejas. En estos casos no existe correspondencia unívoca entre genotipo y fenotipo, por lo que el análisis genético será complejo. Se han de tener en cuenta una serie de características.

**Penetrancia incompleta y fenocopias.** El fenotipo puede venir o bien del genotipo o del ambiente. En el caso del cáncer de mama se da una mutación en el gen BRCA1

**Heterogeneidad genética.** La enfermedad puede estar causada por distintos loci.

**Herencia poligénica.** Se trata en muchos casos de fenotipos cuantitativos, cualitativos.

**Elevada frecuencia poblacional de los alelos implicados.** Se cree que la APO E4 puede estar relacionada con enfermedades coronarias, e incluso con Alzheimer. La frecuencia del alelo varía en función de las poblaciones. En el norte de Europa es del 15%, en el Mediterráneo es del 25%, mientras que en África es del 35%. Es posible que se trate de mutaciones con orígenes diferentes. Al considerarlas todas en conjunto perdemos poder de resolución.

**Mecanismos de transmisión particulares.** X frágil,...

**Factores ambientales.** El mismo genotipo, en ambientes diferentes, puede dar lugar a fenotipos diferentes.

### ***Aproximación a la base genética de un rasgo no mendeliano***

Lo primero que se debe hacer es saber si tiene base genética. Para hacer esto se hacen estudios familiares, midiendo lo que se conoce como Riesgo Relativo ( $\lambda_R$ ). Es el riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad si tiene un pariente afectado, respecto a un individuo que no tenga ningún familiar enfermo. Siempre se referirá a un grado de parentesco determinado. Si el  $\lambda_R$  es mayor de 10, será fácil encontrar la base genética, pero si es menor de 10, como ocurre en la mayoría de los casos, será más complejo. Se deben hacer estudios de epidemiología genética, buscando los patrones de incidencia familiar y poblacional.

Se ha estudiado en muchos casos también la heredabilidad. Para eso se han hecho estudios de gemelos. Se comparan los grados de incidencia de la enfermedad entre gemelos monocigóticos y dicigóticos. Además, también se pueden comparar los grados de incidencia en monocigóticos que hayan crecido juntos y monocigóticos que crecieran separados. Esto permitirá comprar los rasgos, ya sean cualitativos o cuantitativos. A partir de ensayos con diferentes gemelos se pueden obtener las diferentes penetrancias. Todos estos estudios tienen graves limitaciones. El efectivo muestral es muy reducido. La separación entre los gemelos puede no ser total. Además, se pueden dar sesgos de discernimiento, ya que en muchos casos se potencian las similitudes de manera artificial. Por último, estos estudios no diferencian entre los rasgos genéticos y los efectos ambientales intrauterinos.

Se han hecho también lo que se conoce como estudios de adopción. Se rastrean niños que sufran una enfermedad, y los compararán con los padres, tanto biológicos, como adoptivos. También se puede comparar una familia con algún miembro que sufra la enfermedad con los niños adoptados, para ver si sufren al enfermedad. Estos estudios tienen limitaciones, ya que en muchos casos faltará información de la familia biológica. Además, la elección de los padres adoptivos no se hace de manera aleatoria.

Otras aproximaciones a esto se han hecho a partir de grupos migratorios. Se busca un grupo migratorio, y se mira si en el rasgo a estudiar se parece más a la población inicial, con lo que sería un rasgo predominantemente genético, o a la población de acogida, con lo que será principalmente ambiental.

### **Modelo poligénico de caracteres cuantitativos**

Se trata normalmente de diferentes genes aditivos e independientes, que inciden de manera similar sobre el fenotipo. Se da el fenómeno que se conoce como regresión a la media. La heredabilidad es:  $h^2 = V_G/V_T$ . Se conoce como medida de los efectos génicos al desplazamiento y/o proporción de varianza explicada por un locus.

Se ha creado el modelo umbral. Se trata de la extensión del modelo poligénico a rasgos discontinuos o dicotómicos. En cierta manera se trata de medir una variable de susceptibilidad. A partir de un cierto valor umbral de susceptibilidad, se sufrirá la enfermedad.

Puede medirse fácilmente el efecto de los genes independientes. Se conoce como GRR al riesgo relativo asociado a genotipo.

### *Rasgos oligogenéticos*

Tan solo están implicados unos pocos genes en la parte genética del rasgo. De estos genes, algunos tendrán una influencia mayor.

### *Análisis segregacional*

Es la principal herramienta estadística para análisis de la herencia de rasgos no mendelianos. Son métodos complejos, con diseños muy complicados. Pueden dar información de la presencia de un gen dominante o codominante que explique un alto porcentaje de la enfermedad.

### *Identificación de genes de rasgos complejos*

Es necesaria una definición precisa del rasgo. Se ha de identificar bien, mediante fenotipos homogéneos, con una caracterización clara de la edad de aparición, así como de la historia familiar. Será necesario conocer la severidad del rasgo. Es de utilidad conocer su presencia en grupos genéticamente aislados.

### *Análisis de ligamiento paramétrico*

Se ha de considerar si existe cosegregación entre un marcador y el gen de la enfermedad. A partir de un pedigrí se podrán elaborar modelos:

$$LR = \frac{\text{Probabilidad (Datos/H1)}}{\text{Probabilidad (Datos/H0)}} \rightarrow Z = \log LR$$

Si Z es mayor a 3, entonces existirá alguna indicación de que puede haber ligamiento. Este es un modelo muy potente para caracteres mendelianos, pero no para caracteres complejos. Se han desarrollado métodos de análisis no paramétricos. En estos métodos se preguntan si los

parientes enfermos comparten un mismo gen, si lo hacen con la frecuencia esperada. Se trata del allele sharing.

Las regiones candidatas serán demasiado grandes para pasar a hacer un análisis poblacional. La interpretación de los resultados será muy importante.

Se conoce como asociación a la relación estadística entre 2 fenómenos. La asociación entre alelos y fenotipos es diferente al ligamiento. Asociación será ligamiento si la familia abarca toda la población.

## Genoma humano

Genoma nuclear	99,9995%	Aprox. $3 \times 10^9$ pb (n)	30.000 genes?
Genoma mitocondrial	0,0005%	$16,6 \times 10^3$ pb	37 genes

Nos centraremos solo en el genoma nuclear. Está distribuido en 24 moléculas diferentes, los cromosomas. Son de tamaño variable, desde las 45 Mb del cromosoma 21 a las 279 Mb del cromosoma 1. Cada célula tiene sus copias de los cromosomas.  $2n$  en las somáticas y  $n$  en las germinales.

### Composición

Aproximadamente el 41% del genoma son G+C. La distribución de las bases no es homogénea. Normalmente los genes están situados en regiones ricas en GC, no en regiones con AT. Hay muy pocos dinucleótidos CpG, menos de los esperados, tan solo un 5%. En vertebrados, CpG es una señal de metilación. La C metilada puede ser inestable y desaminada a T.

Existen islas CpG, donde si que encontramos el dinucleótido en la frecuencia esperada. Suelen estar en regiones promotoras de genes, donde encontramos frecuencias de más del 50%. Esas islas tienen entre 500 y 1500 pb. Hacia 3' de las islas habrá normalmente un gen, ya que la isla está en el promotor. Las CpG de las islas no suelen estar metiladas, porque los genes estarán activos. Se ha calculado que aproximadamente hay unas 28.000 islas en el genoma.

El número de genes que componen el genoma humano ha generado controversia en los últimos tiempos. Existen actualmente 2 proyectos que todavía tratan de determinar el número exacto, el IHGSC y Celera Genomics. Estima que puede haber entre 30.000 y 40.000 genes. Dada la diferencia con la previsión, parece ser que el splicing diferencial tendrá más importancia de la que se le atribuía.

Un método usado para la secuenciación son las EST, Expressed Sequence Tags. Son secuencias cortas, de unas 300 pb de cDNA. Sirven de marcadores de genes que se expresan.

La densidad génica del genoma humano es muy variable. Podemos encontrar zonas ricas, con 1 gen cada 20 Kb, y otras regiones pobres, con 1 gen cada 200 Kb. La estima según la secuenciación es de unos 9 – 14 genes por Mb.

Aproximadamente el 44,8% del genoma está formado por elementos repetitivos, como SINES, LINES, LTPs y transposones.

Se pueden hacer mapas del genoma.

#### Mapa físico

Se asignan los genes a una localización, usando distancias específicas.

#### Mapa genético

Se basa en las frecuencias de recombinación entre lo que queramos mapar. Su unidad son los cM.

## Mapas físicos del genoma

Dentro de los mapas físicos hemos de considerar los diferentes métodos.

### Métodos de baja resolución

Asignan los genes a cromosomas o a regiones cromosómicas. Algunas técnicas pueden ser los híbridos celulares somáticos o las hibridaciones “in situ”, como un FISH.

### Métodos de alta resolución

Algunas de las técnicas empleadas son:

FISH de alta resolución

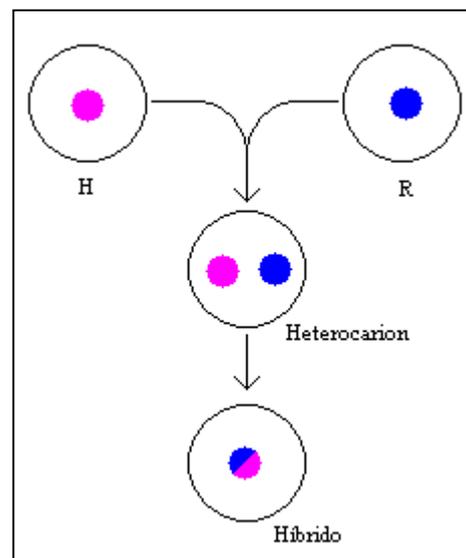
Mapaje de restricción a gran escala (PFGE)

Clonaje en BACs, YACs, cosmidios y construcción de contigs

Secuenciación

La técnica más usada para transferir cromosomas es la fusión de células somáticas. Con polietilenglicol se permeabilizan las membranas plasmáticas, provocando su fusión, aunque se trate de células de diferentes especies. Se trata del método más usado. Normalmente se usaban células humanas y células de roedor. En una primera etapa se forma un heterocarion. Después, por mitosis, se forma un híbrido. Las células híbridas son inestables. En sucesivas divisiones irán perdiendo cromosomas humanos de manera aleatoria. Cada híbrido tendrá un contenido de cromosomas humanos diferente.

La selección de las células se hace en medio HAT, Hipoxantina – Aminopterina – Timina. Las células humanas son  $HPRT^+$  y las de ratón son  $HPRT^-$ . Las células de ratón mueren porque no pueden crecer en ese medio, mientras que las humanas se dividen lentamente, por lo que morirán también. Sólo crecen los híbridos.



Para mapear un gen en un cromosoma debe existir una relación unívoca entre ellos, es decir, siempre que esté el gen deberá estar el cromosoma, y a la inversa.

La presencia del gen se puede detectar por actividad enzimática, siempre y cuando sea un enzima y se pueda diferenciar de la de ratón. También podemos hacer Southern o PCRs para detectar la presencia.

Se han conseguido obtener híbridos monocromáticos, con un único cromosoma. Para alcanzar una mayor resolución se han usado cromosomas con aberraciones cromosómicas, como deleciones, para localizar el gen dentro del cromosoma.

Para localizar los genes se pueden usar los híbridos por radiación. Mediante radiación X se provoca la rotura del DNA en las células humanas. El resultado se hibrida con células de roedor, con lo que se acaban obteniendo híbridos con tan solo un fragmento del cromosoma humano. Actualmente se pueden usar también híbridos de todo el cromosoma.

Como ya hemos dicho, el gen HPRT es esencial para la diferenciación entre las células humanas de las de ratón. El problema es que HPRT está en el cromosoma X, por lo que sólo podremos seleccionar los híbridos que tengan ese cromosoma.

Mediante estas técnicas las colecciones de híbridos son grandes. Se han conseguido elaborar mapas de marcadores para el genoma humano. El principio para hacer mapas de marcadores es similar al del ligamiento. Cuanto más próximos estén 2 genes, más improbable será que se separen por acción de la radiación, de manera que dos marcadores cercanos estarán frecuentemente en el mismo híbrido.

La frecuencia de rotura ( $\theta$ ) entre 2 marcadores va de 0 a 1. Dos fragmentos alejados pueden ver subestimada su distancia si un híbrido incorpora los dos fragmentos con los marcadores. La función de mapa en este caso es la que se presenta a la derecha. Se ha indicado siempre en la función la cantidad de radiación empleada. Un ejemplo sería  $1cR_{2000}$ . Indica una frecuencia de rotura del 1% con una dosis de 2000 cR. Existen colecciones de híbridos disponibles:

$$D = -\ln(1-\theta) \text{Centirays}$$

	Nº de híbridos	Ret. Prom. GH.	Tam. Prom. Frag.
Genebridge 4	93	32%	25Mb
Stanford 63	84	16%	2,4Mb

Las técnicas “in situ” han permitido un avance en el mapado de los cromosomas. Se suelen hacer sobre cromosomas metafásicos. Antes las sondas se marcaban con tritio  $^3H$ . Era de baja emisión y daba resultados finos, pero seguía siendo radiación y requería tiempo. Se desarrollaron entonces otras técnicas, como el FISH.

### FISH

La sonda de DNA puede estar marcada de manera directa o indirecta. Da resultados rápidos, observables mediante un microscopio de fluorescencia. La máxima resolución alcanzable mediante un FISH típico son 2 Mb. Mediante FISH se ha conseguido identificar el cromosoma que contiene el gen.

Recientes modificaciones han permitido alcanzar FISH de alta resolución. Para hacerlo no servían cromosomas metafásicos, era necesario usar cromosomas interfásicos, cuya morfología es muy compleja. La resolución en estos cromosomas interfásicos va desde las 500 hasta las 50 Kb.

Otra opción es el uso de cromatina extendida, ECF – FISH. Mediante esta técnica se alcanzan resoluciones desde 700 hasta 10 Kb. Una opción reciente es el uso de fibras de DNA extendidas, Fiber – FISH. Mediante esta técnica se puede ir más allá de las 10Kb.

Las técnicas de Chromosome painting permiten destacar un cromosoma sobre el resto, dando resultados muy espectaculares. Se usan sondas marcadas con fluorógenos. Permite ver aberraciones cromosómicas. Una última opción es el FISH multicolor, en el cual hay un color por cromosoma, mediante mezcla de colores.

### Mapas de restricción

La resolución de estos mapas varía en función de la frecuencia en la que está presente la diana en el genoma. Aproximadamente se harán cortes de 1Kb. Se han hecho para genomas pequeños, de no más de 50 Kb. Para genomas más grandes se debería usar enzimas que corten con baja frecuencia, “rare – cutters”. Reconocen dianas de 6 a 8 nucleótidos, que tengan 1 o más dinucleótidos CpG. Algunos ejemplos están en la tabla.

Sma I	5' CCC GGG 3'	Hasta 78 Kb
Bss HI	5' GCG CGC 3'	Hasta 390 Kb
Not I	5' GCGG CCGC 3'	Hasta 9 – 10 Mb

Para obtener un DNA de mayor peso se le debe incluir en agarosa. Se mezclan las células en los bloques de agarosa o “plugs”. Después se debe hacer una digestión de la membrana. Una vez eliminada la membrana se debe hacer la digestión con los enzimas de restricción. Una vez hecha la digestión se deberán separar los fragmentos en un gel de agarosa, en una electroforesis en campo pulsante, una PFGE. Se pueden separar moléculas de hasta varias Mb. El intervalo de tamaño depende de la duración de los pulsos. Para separar moléculas más grandes se deben hacer pulsos más largos.

No es posible hacer mapas de este tipo para todo el genoma humano, aunque sí para otros más pequeños.

### Mapa de clones

Se generan múltiples clones, que de manera óptima deberán solaparse, para poder hacer un contig. De manera utópica, el genoma humano debería tener 24 contigs. El principal problema radica en que existen gaps, zonas en las que no se solapan los clones.

Lo primero que se debe hacer para conseguir mapas de clones es la construcción de genotecas. Las genotecas deberán tener encabalgamientos, para lo que se realizarán en muchos casos sólo digestiones parciales. Una vez tengamos la genoteca deberemos iniciar la construcción de contigs, para lo que necesitaremos vectores que acepten fragmentos grandes.

### Vectores de clonaje para fragmentos de DNA de gran tamaño

Los más usados son los que se muestran en la tabla.

Plásmidos	Hasta 10 Kb
Cósmidos	Unas 10 Kb
Fagos λ	Hasta 45 Kb
YACs (1987)	Hasta 1 Mb

### YACs

Se trata de moléculas de DNA lineal que se introducen en levaduras y que se mantienen en ellas como si fuesen un cromosoma normal. Para su funcionamiento requieren una serie

Centrómero

Telómeros

Origen de replicación

Marcadores seleccionables

Lugar de clonación

de elementos, que ocupan unas 10 – 15 Kb. Los requerimientos se muestran en la tabla de la izquierda. Se trata de uno de los vectores con más capacidad. Se han hecho genotecas humanas, con un número de clones variable.

Uno de los YACs más usados es el pYAC 4.

## pYAC 4

Está hecho a partir de un plásmido pBR 322, con genes de levaduras.

URA 3 y TRP 1	1 de estos genes en cada brazo del YAC. Marcadores seleccionables.
ARS 1	Origen de replicación
CEN 4	Secuencia centromérica del cromosoma 4
TEL y TEL	Una en cada brazo, actúan como telómeros
SUP 4	Lugar de clonaje
Dianas Bam H1	Linealización al digerir con el enzima
Ori y Amp <sup>R</sup>	Replicación y selección en bacterias

Se usa una cepa de levaduras auxotrófica para Ura 3<sup>-</sup> y Trp 1<sup>-</sup>. Las que incorporen el vector pasarán a tener los dos genes funcionales.

La presencia del inserto se comprueba con la inactivación de SUP 4. Se formarán colonias rojas en lugar de blancas si la cepa es ade 2.1, una mutación que provoca la aparición de un codón stop ocre, con lo que se acumula un pigmento rojo. Si SUP 4 está activo, permitirá superar ese codón y las colonias serían blancas.

Pero los YACs no son perfectos, tienen algunos inconvenientes.

### Inestabilidad

Hay un elevado porcentaje de clones que tienen secuencias repetidas, que dan lugar a clones con deleciones, debido a recombinaciones. Para solucionar este problema se usan cepas deficientes en recombinación. Pese a todo tienen poca eficiencia.

### Quimerismo

El inserto puede abarcar 2 o más fragmentos, debido a la alta capacidad de los YACs. Los contigs darán como adyacentes zonas que en realidad no lo son. Esto se puede paliar si se dan redundancias.

Se han desarrollado otros posibles vectores:

Vectores derivados del fago P1	Hasta 135 Kb
Vectores BACs	Se basan en el plásmido F. Llegan hasta las 300 Kb
PACs	Unas 300 Kb, pero mejores que los BACs

Existen 2 técnicas básicas para la construcción del contig.

### **Chromosome Walking**

A partir de diferentes clones, se aíslan los extremos, que se usan como sondas para detectar otros clones que posean el mismo fragmento. Este proceso se va repitiendo con los demás clones.

El problema que plantea esta técnica es el del DNA repetido. Si se llega a un fragmento que acaba con una secuencia repetitiva, entonces no se podrá seguir el proceso, porque la sonda basada en esa secuencia se unirá a muchos clones. Esto se puede solucionar parcialmente bloqueando las secuencias repetitivas.

Normalmente con este método no se puede pasar de las 15 – 20 Kb.

### **Fingerprinting**

Se basa en buscar patrones de identificación de los clones.

Se puede hacer de diferentes maneras.

**Patrones de restricción.** Se usan enzimas de restricción.

**DNA repetitivo**

**Alu PCR.** Se usan primers en las secuencias Alu. Esto da una serie de bandas.

**STSs. (Sequence Tag Site).** Son secuencias cortas de DNA, de 100 a 500 pb. Están una única vez en el genoma. Son fácilmente detectables. Existen muchos mapas de STS. Será suficiente con mirar las STS de los clones.

**ESTs.** Son secuencias expresadas, se establecen a partir de cDNA. Existe una relación con las STS. No todas las STS son EST, pero sí la mayoría de EST serán STS, con excepción de las que pertenezcan a familias génicas.

A partir del contig no tendremos todavía la referencia en el cromosoma. Si no está mapado el cromosoma, no podremos localizar el contig.

El proyecto genoma humano se realizó a partir de BACs.

## Mapas genéticos

Se basan en la frecuencia de recombinación entre marcadores. Son análisis genéticos.

Suelen ir ligados a estudios familiares, para poder analizar la segregación de cromosomas.

Se ha de recordar siempre que la frecuencia de recombinación no puede superar el 0,5. Una frecuencia de recombinación ( $\theta$ ) de 0,5 indica independencia, mientras que una de 0 indica ligamiento total.

La fuerza del ligamiento permite saber la distancia a la que se encuentran los loci. La unidad básica de ligamiento es el Morgan, que es la longitud del genoma en la que se observa un entrecruzamiento por meiosis. Por razones prácticas se usa más a menudo el cM, que es la distancia a la que se observa recombinación del 1%.

Ha de existir relación entre la frecuencia de recombinación y la distancia genética.

$\theta$	W
10%	0,10 11 cM
40%	0,40 80 cM

Haldane enunció lo que se conoce como la función de mapa:  $w = -\frac{1}{2} \ln(1-2\theta)$ . El resultado de la función se da en Morgan. En la tabla de la izquierda se pueden ver algunos valores en distancias genéticas basados en la frecuencia de recombinación, usando la función de mapa.

También ha de haber una relación entre las distancias físicas y las distancias genéticas. El genoma humano se estimó en principio en unos 3000 cM, pero actualmente se estima más bien en 4300 cM. En función de las dos estimas 1 cM puede ser 1 Mb o 0,7 Mb, respectivamente.

El valor exacto de la relación dependerá de la localización en el genoma y del sexo, ya que en mujeres la distancia es menor, como se ve en la tabla de la izquierda. Normalmente se considerará el promedio, o bien se darán ambos valores por separado.

1 cM ♂ Aprox. 1,05 Mb

1 cM ♀ Aprox. 0,7 Mb

Para poder hacer mapas genéticos necesitaremos mapas de marcadores. Los marcadores más adecuados serán aquellos que estén lo más cerca posible del locus que queramos mapar. Cuando se inició el mapado, había marcadores de 20 a 10 de separación, repartidos por todo el genoma. Para localizar y clonar el gen, serán necesarios marcadores más cercanos, a 1 cM. Actualmente ya están disponibles estos tipos de marcadores.

### Marcadores genéticos

Es básico en un marcador genético que sea polimórfico, para que haya un elevado porcentaje de posibilidades de que una persona al azar sea heterocigota.

Los primeros marcadores que se usaban eran proteínas, pero a partir del 75 aparecieron los marcadores de DNA.

#### RFLPs (Restriction Fragment Length Polimorfism)

Se trata simplemente de polimorfismos en dianas de restricción.

Antiguamente se hacía por Southern, pero ahora se usa PCR. Se cree que puede haber unos 10.000 loci, pero el inconveniente es que son poco polimórficos, sólo tienen dos alelos.

*SSLPs (Single Sequence Length Polimorfism)*

Abarcan lo que antes se conocía como VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) o minisatélites y los STRs (Short Tandem Repeats) o microsatélites.

Se trata de series de secuencias repetidas, con variaciones en la longitud. La variación está en el número de veces que se repite.

*VNTRs (Variable Number Tandem Repeats)*

Son de 20 a 50 repeticiones de 25 pb. Presentan muchos inconvenientes. Son demasiado largas, y no están repartidas por el genoma, sino que se acumulan en los extremos.

*STRs (Short Tandem Repeats)*

Son secuencias más cortas, de 2 a 4 nucleótidos, repetidas de 10 a 20 veces. Están repartidas de manera homogénea por el genoma.

Los microsatélites más comunes son (CA)<sub>n</sub>. Están distribuidos de manera homogénea por todo el genoma. La mayoría de mapas existentes se basan en ellos.

*SNPs (Single Nucleotide Polimorfism)*

Poco polimórficos normalmente, de hecho suelen ser bialélicos. La gran ventaja que tienen es que son muy abundantes. Se calcula que debe haber 1 cada 1200/1500 pb. Los mecanismos de reconocimiento son automáticos actualmente. La mayoría suelen ser bialélicos por las escasas posibilidades de que una mutación afecte en dos ocasiones a una misma base.

Los marcadores que se usan para los mapas físicos y genéticos tienen diferencias. La clave de los marcadores que se usan para los mapas genéticos es que deben ser polimórficos, mientras que para los físicos no es necesario que lo sean. El gran requisito de los marcadores para los mapas físicos es que han de ser fácilmente detectables. Se da el caso de que los STS sirven para hacer mapas físicos, pero pueden ser polimórficos.

Para construir mapas genéticos necesitamos meiosis informativas. Estas meiosis permiten reconocer las combinaciones paternas de los recombinantes. No valdrán entonces ni homocigotos ni la mitad de los casos en que los padres sean heterocigotos, porque en ese caso el hijo también lo será.

*Informatividad de un marcador*

La heterocigosidad (H) es la probabilidad de que una persona al azar sea heterocigota.

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j^2$$

Además, existe otra función, llamada PIC, Polimorfism Information Content, como se muestra a la izquierda. En la tabla inferior se muestran las diferencias entre ambas funciones.

Alelos	Heterocigosidad	PIC
2 (0,5/0,5)	0,5	0,375
2 (0,4/0,6)	0,48	0,365
2 (0,1/0,9)	0,18	0,164
4 (0,25 cada uno)	0,75	0,70
10 (0,1 cada uno)	0,90	0,89

El primer paso que se debe dar siempre es calcular las frecuencias de recombinación, que deberán ser significativamente inferiores a 0,5, para que no haya independencia. Una vez calculada la frecuencia de recombinación ( $\theta$ ) se debe calcular el “lod score”. Si es posible debemos determinar si dos alelos de loci diferentes están o no en el mismo cromosoma. Si sabemos cual con cual, conocemos la fase. Se ha de tener en cuenta para caso dudosos, con la frecuencia de recombinación baja.

El “lod score” compara 2 probabilidades. Se compara la probabilidad de tener los datos teniendo los loci ligados en una determinada frecuencia, con las probabilidades de tener esos datos si no están ligados.

$$\text{lod}(Z) = \frac{\text{Probabilidad Datos si hay ligamiento } (\theta=x)}{\text{Probabilidad Datos si no hay ligamiento } (\theta=0,5)}$$

El valor que da la Z más alta es el valor de  $\theta$  más probable. Normalmente se calculan con ordenadores, pero se podría hacer a mano.

Para calcular el lod deberemos tener en cuenta si los loci pueden estar ligados, con una frecuencia  $\theta$ , con lo que las probabilidades de que se una meiosis sin recombinación serán  $1-\theta$ , mientras que las probabilidades de que se de una recombinación será  $\theta$ . Si los loci no están ligados, las dos probabilidades serán 0,5. En las fotocopias vemos algunos ejemplos para calcular el lod score. Se ha de tener en cuenta que si hay recombinantes, a  $\theta=0$ , la  $Z=-\infty$ . Si la Z es mayor o igual a 3, se aceptará que hay ligamiento. Si la z es menor de  $-2$  no habrá ligamiento, se considerará como exclusión de ligamiento. Todos los valores entre estos 2 no serán concluyentes. Se trata de límites muy estrictos. A partir del lod score se pueden representar gráficas, que mostrarán las frecuencias de recombinación más probables. Se calcula que harían falta unas 20 meiosis informativas para llegar al nivel de significancia deseado.

Normalmente al analizar enfermedades no se tienen familias grandes. Para poder llegar a resultados concluyentes se deberán juntar familias. Se sumarán sus lod scores. Para poder sumar deberán ser homogéneas.

### **Mapas de múltiple puntos (Multipoint)**

Son útiles para establecer el orden de una serie de loci ligados. El objetivo es situar el gen de la enfermedad entre los marcadores. Para hacerlos se usan programas informáticos.

Estos programas colocan el locus en distintos puntos y calculan el lod con respecto a los marcadores. Entonces se hace una curva y donde esté el valor más alto, ese será el punto donde con mayor probabilidad se encontrará el locus. Normalmente no dará un pico, sino una meseta. Además, permitirá excluir algunos marcadores, allí donde la curva baje de  $-2$ .

En Paris encontramos las familias CEPH, que se usan para hacer mapas genéticos. Se trata de familias que tienen 4 abuelos disponibles y como mínimo 6 individuos de la tercera generación. Se hicieron células inmortalizadas de todos los miembros de esas familias.

Como siempre, para descubrir el locus será necesario conocer las características de la enfermedad, como puede ser heterogeneidad, herencia o penetrancia incompleta.

Se debe acotar el mapeado.

#### Análisis de recombinantes

Se miran otros marcadores que mapen cerca, tan cerca que no existe recombinación entre ellos. También es importante buscar marcadores que sí recombinen para acotar aún más el gen que buscamos.

Siempre será mejor usar recombinantes afectados, porque los no afectados podrán tener penetrancia incompleta.

#### Desequilibrio de ligamiento

Las proporciones en que se darán los diferentes ligamientos dependerán de las frecuencias génicas, siempre y cuando se esté en equilibrio. Hay excepciones si se da desequilibrio. Se puede dar asociación de diferentes alelos de diferentes loci en un marcador.

La explicación más corriente del desequilibrio es el efecto fundador. La mayoría de cromosomas que llevarán la enfermedad tendrán un antepasado común.

En los esquemas vemos un ejemplo de fibrosis quística y con el síndrome de rotura Nijmegen

#### Homocigosidad

Sólo se puede aplicar en el caso de familias consanguíneas. Permite deducir la posición del gen por la búsqueda de unos marcadores contiguos adyacentes. Es de más utilidad en casos de recesividad. Los alelos responsables serán copias de un mismo alelo en un antepasado común.

El mapaje permite acotar el gen de la enfermedad en una zona. Para aislarlo y estudiarlo es necesario volver al mapa físico, para lo que es necesario conocer la correspondencia entre los mapas.

## Métodos de identificación de genes

Existen 2 aproximaciones posibles.

### Inspección informática

La primera aproximación posible es la inspección informática de la secuencia, buscando características asociadas a genes. De hecho esto consiste básicamente en la búsqueda de ORFs. Todos se inicia con ATG, y deben concluir con un codón stop, que puede ser TAG, TAA o TGA. Pero cada secuencia tiene 6 posibles pautas de lectura.

Además, se han de considerar las posibilidades de que se den esas combinaciones por azar. Se dan por azar cada 100 – 200 pb. Consideraremos entonces sólo las secuencias más largas.

En procariontas resulta más sencillo, porque no hay intrones, lo que complica el proceso en eucariotas. Al analizar eucariotas los programas informáticos buscarán automáticamente las fronteras entre intrón y exón.

Se pueden buscar también las secuencias reguladoras en 5'.

### Métodos experimentales

#### Zoo Blot

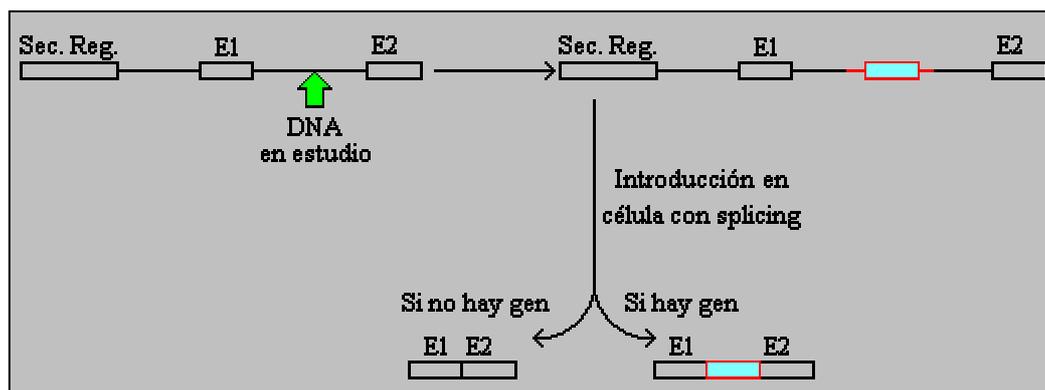
Se basa en la conservación de secuencias en la evolución y en el hecho de que la mayoría de mutaciones que afecten a un gen serán deletéreas. Básicamente consiste en un Southern de diferentes especies.

#### Hibridación sobre Northern

Se busca la expresión. Si es un gen se expresarán en forma de RNA. Se hace un Northern y se hibrida usando el clon como sonda.

#### Exon trapping

En un gen habrá exones e intrones que podrán sufrir splicing. Se requiere un vector especial para usar esta técnica.



#### cDNA selection

Se usa un clon de DNA genómico, ya sea un YAC, BAC,... como sonda sobre la genoteca de cDNA.

El último paso a realizar será compararlo con la copia de un individuo enfermo

### **Estrategia de clonación de genes**

#### **Clonaje funcional**

Sólo se puede hacer si se conoce la causa bioquímica de la enfermedad. A partir de la proteína se determina la secuencia de aminoácidos. A partir de ésta se establece la secuencia nucleotídica, que se usa como sonda sobre la biblioteca de cDNA. El clon resultante se usará como sonda sobre una genoteca genómica.

Esta fue la aproximación que permitió la identificación del gen de la hemofilia A, el factor VIII, y de muchas enfermedades lisosomales.

#### **Clonaje de genes candidatos**

Sólo se conocen los síntomas, pero a partir de estos se puede intentar determinar qué proteína está afectada. Se amplifica el gen de esa proteína para ver si es el responsable.

De hecho esta técnica ha servido más para descartar genes candidatos que para identificar responsable.

#### **Clonaje posicional**

No se conoce cuál puede ser la proteína responsable. Lo primero que se deberá hacer será mapear el gen en una determinada posición cromosómica, como ya hemos visto. Si se observa que los afectados tienen alguna anomalía cromosómica cabe suponer que el gen estará allí. Si no sucede así se deberán hacer análisis de ligamiento. La máxima resolución que podrán alcanzar será de 1 Mb, a partir de ahí se deberán analizar los genes uno a uno. Desde 1986 a 1995 se han conseguido identificar 50 genes responsables de enfermedades, tardando unos 2 años por gen. El gen que más ha costado ha sido el responsable de la corea de Huntington. Los genes responsables de la fibrosis quística y de la distrofia muscular de Duchenne también han sido identificados así.

Esto ha permitido la elaboración de un mapa transcripcional más complejo.

#### **Clonaje de genes candidatos posicional**

Lo primero que deberemos hacer será acotar el gen en una posición. Una vez hecho esto se podrá ir a las bases de datos para buscar los genes próximos. A partir de ahí se podrán buscar las mutaciones.

Hasta ahora se han identificado principalmente los genes responsables de enfermedades monogénicas, porque son los más fáciles.

### **Fibrosis quística (CF)**

Es una enfermedad autosómica recesiva.

Tiene una de las más elevadas prevalencias en la raza blanca.

Su incidencia es de 1 cada 2000 – 2500 niños, con una frecuencia de portadores de 1/25.

Provoca defectos generalizados en las glándulas exocrinas. Los órganos más afectados son páncreas y pulmones. Se da fibrosis en el páncreas desde el nacimiento. Se produce un moco muy espeso en los pulmones.

Se debe a un defecto en la secreción de cloro. Los enfermos tienen mucho cloro en el sudor.

La localización del gen se logró gracias al desequilibrio de ligamiento. Los marcadores empleados fueron RFLPs. Se observó que había ligamiento con un polimorfismo, la peroxonasa (PON).

Lo siguiente que se hizo fue aislar más de 200 RFLPs nuevos, de los cuales todos tenían PIC de 0,3 como mínimo. Los que tenían menos no se usaban. Se observó que el DOCRI 917 tenía ligamiento con la enfermedad.

Se hicieron tablas de lod a partir de 36 familias canadienses y 3 de HGCMR. Se alcanzaban valores de lod mayores a 3 con  $\theta$  de 0,1 o 0,2. Se encontró un máximo de lod de 3,96 con una  $\theta$  de 0,14. Daba una distancia de 25 cM.

Se comparó también el lod entre el marcador y el PON. Daba un lod máximo de 5 con una  $\theta$  de 0,05. El PON podía estar a ambos lados de 917.

Se hizo entonces un análisis multipoint.

Se identificaron marcadores en el cromosoma 7: pJ.3.11. y TCR $\beta$ . Se hicieron los lod de los diferentes marcadores con la CF. El pJ.3.11 presenta un lod de 5,24 a  $\theta=0$ , no recombina. Es un gran marcador. Se conoce también como D7S8. El TCR $\beta$  presentaba un lod de 2,06 a  $\theta=0,1$ .

Más adelante se identificó otro marcador, situado en el oncogen met, que implicaba la presencia o ausencia de una diana Tay I. Se observó que tenía un lod mayor de 8, 8,65, con  $\theta=0$ . Se hizo un gran estudio comparativo de más de 200 familias, con los dos marcadores, D7S8 y met. Se observó que los lod eran:

	$\theta$	Lod
CF Met	0,004	91,01
CF D7S8	0,003	71,28

Por lo tanto, se dedujo que el orden correcto era:

	0,3 cM		0,4 cM	
D7S8	————	CF	————	Met

El siguiente paso fue buscar desequilibrio de ligamiento, para ver si había alelos asociados a la CF. Se vio que sí que existía desequilibrio. Más adelante se encontraron marcadores entre D7S8 y Met, con los que se calculó el desequilibrio. Eran XV2 y KM19

Se hizo un gran estudio de 127 afectados y 159 sanos. Se vio que había asociación de un haplotipo con la CF. La mutación tuvo lugar entre dos marcadores, de manera que los que tengan ese haplotipo mutado deberán tener el mismo alelo mutante.

La zona se había limitado a 500 Kb.

Se intentó hacer el contig de la región, mediante chromosome walking. Se hizo a partir de una genoteca de cósmidos y fagos. Se puede ir avanzando, pero llega un punto en que no se podía avanzar más. Se evitó mediante lo que se conoce como chromosome jumping.

Se consiguió limitar a una zona de 280 Kb. Se construyó un mapa físico de la región, mediante enzimas de restricción de corte infrecuente, "rare cutters".

Una vez acotada la región se debían identificar los genes. Mediante zoo blot se encontraron 4 regiones conservadas, que eran 4 posible genes.

Tras eso se hizo la hibridación sobre Northern. De los 4 genes, 2 no encajaban con el patrón tisular esperado, 1 fue descartado y el último parecía no hibridar. Este último gen se hibridó sobre una genoteca de cDNA obtenido de glándulas sudoríparas. Resultó que sólo tenían un trozo del gen, pero que a partir de la genoteca se obtuvo el completo. El gen es de 250 Kb, con 28 exones. La proteína traducida tiene 1480 aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos indicaba que era una proteína de membrana, posiblemente relacionada con el transporte de iones. Se tuvieron que buscar mutaciones entonces en los parientes. Hay una mutación muy frecuente, la  $\Delta F508$ . Es muy frecuente, en más del 70% de los casos. Está presente en un haplotipo muy conservado.

Actualmente se han caracterizado unas 300 mutaciones mucho menos frecuentes.

Se nombró el gen como CFTR.

### ***Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)***

Está situado en el cromosoma X, Xp21.

El clonaje fue facilitado por una característica. Las mujeres afectadas, que tenían una translocación entre cromosoma X y autosoma. Fue suficiente buscar un gen en esa zona.